VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2019 - Thèse n° 052

MYCOPLASMOSE VAGINALE ET INFERTILITE CHEZ LA CHIENNE :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ET MISE EN PLACE D'UNE PCR QUANTITATIVE MYCOPLASMA CANIS

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 11 octobre 2019
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

SAVATIER Camille

VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2019 - Thèse n° 052

MYCOPLASMOSE VAGINALE ET INFERTILITE CHEZ LA CHIENNE :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ET MISE EN PLACE D'UNE PCR QUANTITATIVE MYCOPLASMA CANIS

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 11 octobre 2019
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

SAVATIER Camille

VetAgro Sup

UNIVERSITÉ DE LYON

Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon *(01-09-2019)*

ABITBOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JANKOWIAK	Bernard	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
JOSSON-SCHRAMME	Anne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
KODJO	Angeli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDOUX	Dorothée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEGROS	Vincent	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SABATIER	Philippe	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGENTET	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
THOMAS-CANCIAN	Aurélie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur JANIER
De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de Médecine de Lyon Sud,
Qui nous a fait l'honneur de présider le jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur BUFF
De VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon,
Pour votre accompagnement tout au long de ce travail,
Sincères remerciements.

A Madame la Professeure LE GRAND
De VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon,
Pour votre gentillesse et votre aide dans la réflexion sur les mycoplasmes,
Sincères remerciements.

A Madame la Docteure vétérinaire ROSSET
De VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon,
Pour avoir su éveiller mon intérêt en reproduction des animaux de compagnie,
Sincères remerciements.

Table des matières

TABLE DES ANNEXES 13
TABLE DES FIGURES 15
TABLE DES TABLEAUX 17
LISTE DES ABREVIATIONS 19
INTRODUCTION 21
PREMIERE PARTIE : MYCOPLASMES, MYCOPLASMA CANIS ET INFERTILITE CHEZ LA CHIENNE - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 23
1 Généralités sur les Mycoplasmes et Mycoplasma canis 25
1.1 Taxonomie et phylogénie 25
1.2 Morphologie 27
1.3 Structure et génome 28
1.3.1 Le génome 28
1.3.2 La membrane mycoplasmique 28
1.3.3 Le cytosquelette 29
1.4 Biologie 29
1.4.1 Milieux de vie 29
1.4.2 Nutrition et culture 30
1.5 Pouvoir pathogène 30
1.5.1 Action sur les cellules de l'hôte 31
1.5.2 Action sur le système immunitaire 33
2 Infertilité canine et mycoplasmose vaginale 35
2.1 Mycoplasmes et flore vaginale 35
2.2 Mollicutes et infertilité 36
2.2.1 Les études et suspicions chez la femme, la vache et la jument 36
2.2.2 Les mécanismes d'infertilité 37
2.3 Mycoplasmose, Mycoplasma canis et infertilité canine 38
2.3.1 Comparaison des prévalences de mycoplasmoses génitales selon la fertilité 38
2.3.2 Etude de la concentration en mycoplasmes vaginaux 38
2.3.3 Mycoplasma canis, principale espèce incriminée 39
2.3.4 Infections expérimentales 39

2.3.5 Mycoplasma canis est-il pathogène ? 40
2.4 Aspects cliniques et épidémiologiques 40
2.4.1 Aspect clinique des mycoplasmoses urogénitales chez la chienne 40
2.4.2 Aspect épidémiologique des mycoplasmoses urogénitales chez la chienne 41
3 Comment les diagnostiquer ? 42
3.1 Diagnostic différentiel 42
3.1.1 Causes infectieuses 42
3.1.2 Maladies endocriniennes 44
3.1.3 Maladies systémiques 45
3.1.4 Iatrogénique 45
3.1.5 Autres 45
3.2 Prélèvements 47
3.3 Analyses des échantillons 48
3.3.1 Culture bactériologique classique 48
3.3.2 Culture pour recherche de mycoplasmes 48
3.3.3 Polymerase chain reaction (PCR) 49
3.3.4 Sérologie 50
4 Faut-il traiter ? 50
4.1 Les possibilités thérapeutiques 50
4.2 Quand traiter ? 53
4.3 Ce qui est fait en pratique 53
4.4 Le développement d'antibiorésistance, un enjeu de santé publique 54
4.4.1 Observation d'antibiorésistance acquise chez les mycoplasmes 55
4.4.2 Mécanimes moléculaires des antibiorésistances 56
4.4.3 Potentiel de transfert de gène de résistance et santé publique 60
DEUXIEME PARTIE : MISE EN PLACE ET EVALUATION D'UNE PCR QUANTITATIVE MYCOPLASMA CANIS 63
1 Diagnostic et traitement actuels des mycoplasmoses génitales de la chienne 65
2 Pourquoi mettre en place une PCR quantitative Mycoplasma canis au sein du campus Vetagro Sup 68
2.1 Pourquoi une PCR ? 68
2.2 Pourquoi une PCR quantitative ? 69

2.3 Pourquoi une PCR quantitative spécifique de Mycoplasma canis ? 69
3 Mise en place de la PCR quantitative Mycoplasma canis 70
3.1 Mise en relation et rôle des principaux acteurs 70
3.2 Recherche d'un kit commercial 70
3.3 Validation de la PCR quantitative à Mycoplasma canis 71
3.3.1 Matériel et méthodes 71
3.3.2 Résultats 72
3.3.3 Discussion 76
4 Perspectives 77
CONCLUSION 79
BIBLIOGRAPHIE 81
ANNEXES 89

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Notice d'utilisation de l'AmpliTest Mycoplasma canis (PCR temps réel) 89

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique établi d'après la comparaison de la séquence de l'ARN 16s 26
Figure 2 : Forme en œuf au plat typique des colonies de mycoplasmes 27
Figure 3 : Schéma explicatif de la formation des colonies en « œuf au plat » de mycoplasmes 27
Figure 4 : Approche globale de l'infertilité 46
Figure 5 : Ecouvillonnage vaginal avec protection 47
Figure 6 : Pourcentage de résistance chez des micro-organismes isolés lors du pro-œstrus pour différents antibiotiques testés 55
Figure 7 : Résistance génotypique, intrinsèque et acquise, et résistance phénotypique à l'origine de l'observation de résistance aux antibiotiques 57
Figure 8 : Matériel d'écouvillonnage vaginal 65
Figure 9 : Réalisation de dilution en bouillon et mise en culture à l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants 67
Figure 10 : Ensemencement en milieu gélosé selon la technique de la goutte roulante 67
Figure 11 : Courbes obtenues à l'issue de la manipulation n°1 73
Figure 12 : Courbes obtenues à l'issue de la manipulation n°2 74
Figure 13 : Courbes obtenues à l'issue de la manipulation n°3 75

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Propriétés biochimiques des mycoplasmes canins et identification 49
Tableau II : Familles antibiotiques actives et non actives contre les mycoplasmes 52
Tableau III : Résistances aux fluoroquinolones, tétracyclines et macrolides en lien avec une mutation des gènes cibles 59
Tableau IV : Résumé des résultats obtenus lors de la manipulation n°1 73
Tableau V : Résumé des résultats obtenus lors de la manipulation n°2 74
Tableau VI : Résumé des résultats obtenus lors de la manipulation n°3 75

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

BID : Bis In Die

CERREC : Centre d'Etude et de Recherche en Reproduction et Elevage Canin

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMI : Concentration Minimale d'Inhibition

CO_2 : Dioxyde de carbone

Da : Dalton

IFN γ : InterFéroN gamma

IIE : intervalle inter-oestrus

IL-6 : InterLeukine 6

IL-10 : InterLeukine 10

Kpb : kilo paires de bases

LVD : Laboratoire Vétérinaire Départemental

MF-dot : Membrane Filtration dot immunobinding

NADH oxydase : dihydro-nicotinamide adénine dinucléotide oxydase

ND : Nom Déposé / Non Déterminé

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR -RFLP : Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Lenght Polymorphism

PO : Per Os

ResaPath : Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales

ROX : marqueur fluorescent utilisé en PCR

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise

Th-1, Th-2 : T-helper 1, T-helper 2

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

UMR : Unité Mixte de Recherche

VigiMyc : réseau d'épidémiosurveillance des mycoplasmoses des ruminants en France

INTRODUCTION

L'infertilité canine est définie comme étant l'incapacité à produire des chiots sains et viables. L'étiologie de l'infertilité canine étant fréquemment bactérienne, cette problématique est à l'origne de nombreux traitements antibiotiques souvent longs et répétés, en raison d'une dérive des pratiques des éleveurs canins et parfois des vétérinaires.

Les mycoplasmes, bactéries de petite taille et dépourvues de paroi, sont impliqués dans certaines maladies notamment de la sphère urogénitale. Ces bactéries font partie de la flore commensale urogénitale. Le rôle pathogène, plus ou moins opportuniste, des mycoplasmes dans le cadre de l'infertilité est reconnu chez la femme et la vache. Mais qu'en est-il des chiennes ?

La mycoplasmologie a fait d'importants progrès en médecine humaine et en médecine des animaux de rente au cours des vingt dernières années. Malheureusement la médecine des animaux de compagnie est en retard dans ce domaine et il n'existe que très peu de données sur les mycoplasmes canins. Pourtant, de nombreuses avancées technologiques permettent de nouvelles approches et facilitent aujourd'hui certaines recherches.

Les mycoplasmoses vaginales sont tout-de-même considérées aujourd'hui comme une cause potentielle dans le diagnostic différentiel de l'infertilité canine. Les mycoplasmes sont parfois recherchés, plus rarement quantifiés en raison de méthodes diagnostiques fastidieuses. Toutefois, leur simple présence (ou sa suspicion) suffit souvent à motiver un traitement antibiotique de plusieurs semaines sur des chiennes reproductrices.

Le rôle à jouer par les vétérinaires en matière de santé publique est primordial. L'information des vétérinaires est donc nécessaire pour que leur rôle de conseil et d'accompagnement des éleveurs canins dans la démarche diagnostique prenne tout son sens. Dans une société où l'apparition des antibiorésistances représente un danger majeur pour la santé publique, il semble urgent de produire de nouvelles données sur les mycoplasmoses et leur implication dans l'infertilité canine. Ces connaissances permettraient ainsi de mieux gérer les mycoplasmoses vaginales de la chienne, de justifier et d'adapter l'antibiothérapie ou, au contraire, de la déconseiller.

C'est pourquoi, en tant que vétérinaire, j'ai choisi de travailler sur le sujet des mycoplasmoses vaginales chez la chienne et leur impact sur la fertilité. Dans un premier temps, une synthèse bibliographique permettra de faire le point sur les connaissances actuelles concernant les mycoplasmes et plus particulièrement *Mycoplasma canis* qui semble être le mycoplasme le plus fréquemment isolé dans la sphère urogénitale. Dans un second temps, la mise en place et l'évaluation d'une méthode de quantification par PCR temps réel spécifique de *Mycoplasma canis* seront exposées.

PREMIERE PARTIE : MYCOPLASMES, MYCOPLASMA CANIS ET INFERTILITE CHEZ LA CHIENNE - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Généralités sur les Mycoplasmes et Mycoplasma canis

1.1 Taxonomie et phylogénie

Mycoplasma canis est une bactérie appartenant à la classe des Mollicutes. D'après la taxonomie actuelle, les Mollicutes sont dérivés de bactéries gram positives par réductions génétiques (1–3). En effet les Mollicutes appartiennent au phylum des Firmicutes qui désignent l'ensemble des bactéries gram positives avec une composition faible en guanosine-cytosine (4).

Les Mollicutes sont classés en grandes familles selon des critères morphologiques, nutritionnels, la taille de leur génome et la localisation de certaines enzymes. Les grandes familles de Mollicutes sont les Mycoplasmatacées, les Spiroplasmatacées et les Acheloplasmatacées. Les Mycoplamatacées nécessitent du cholestérol pour leur croissance, la taille de leur génome est d'environ 5 x 10^8 Da et la NADH oxydase est cytoplasmique (5).

Au sein des Mycoplasmatacées, la capacité à hydrolyser l'urée permet de différencier le genre Ureaplasma du genre Mycoplasma (5).

Enfin les espèces sont classées au sein des genres selon leur génome. Les progrès en biologie moléculaire ont permis de classer *M. canis* parmi le groupe taxonomique Hominis au sein du sous-groupe *M. synoviae* (4,6) (cf figure 1 ci-dessous). Cette taxonomie a été réalisée selon l'étude des séquences de l'ARNr 16s et de la région intergénique des ARNr 16S/23S des mycoplasmes retrouvés chez le chien. Les numéros d'accès aux séquences sur GenBank sont donnés entre parenthèses.

Cependant, il existe des divergences entre la taxonomie et la phylogénie, principalement en dehors du groupe taxonomique Hominis. La taxonomie pourrait donc être amenée à changer dans les prochaines années selon les décisions prises par le Sous-comité sur la Taxonomie des Mollicutes (4).

Aujourd'hui, dans l'usage commun, le terme de « mycoplasmes » peut à la fois désigner le genre *Mycoplasma* mais aussi la famille des Mycoplasmatacées regroupant les genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma.* Pour cette raison, l'étude des mycoplasmes inclue souvent celle des uréaplasmes.

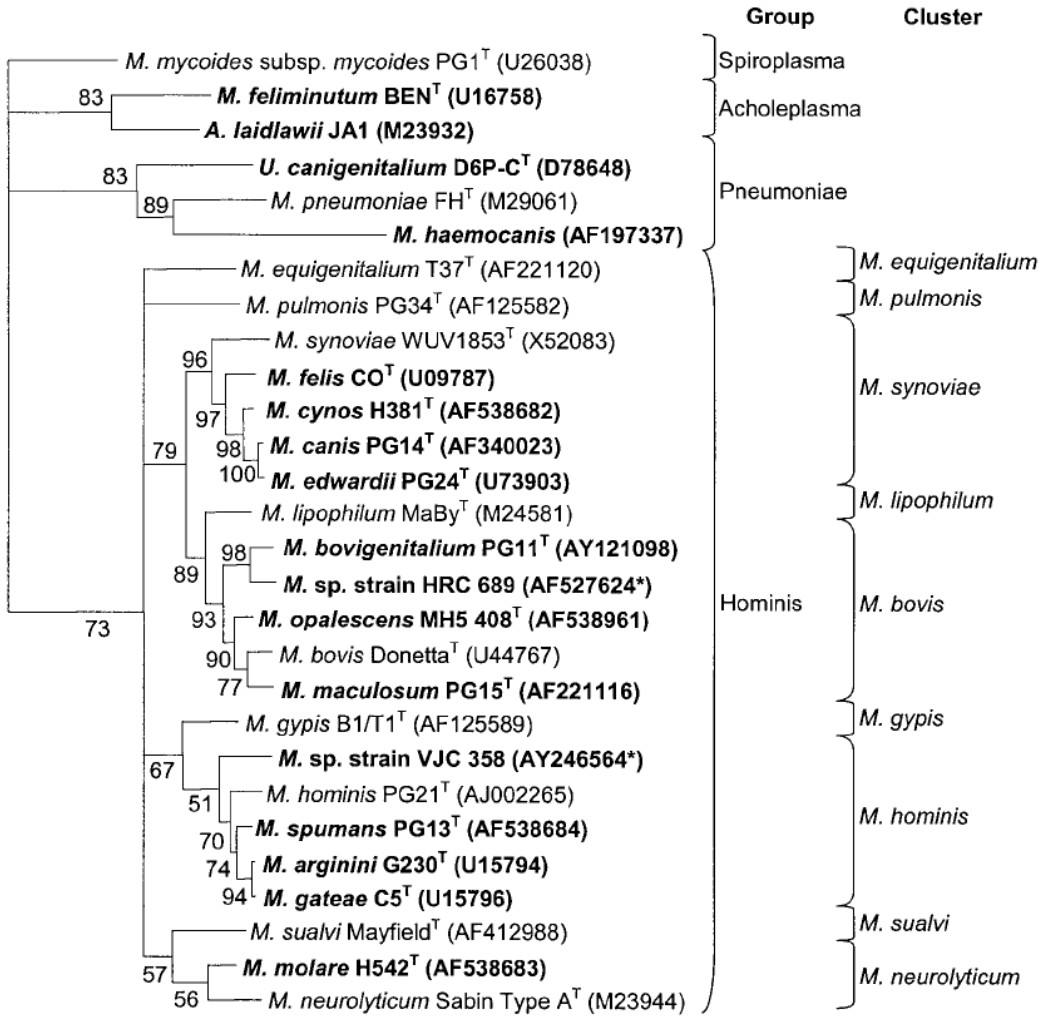


Figure 1 : Arbre phylogénétique établi d'après la comparaison de la séquence de l'ARN 16s – Source : Chalker et Brownlie (2004)

1.2 Morphologie

Mycoplasma canis est une bactérie de petite taille (0,2 à 0,35 µm), sans paroi rigide et donc coccoïde (2,4) la plupart du temps bien que la plasticité de sa seule membrane trilaminaire lui permette un certain polymorphisme. Les mycoplasmes comportent un cytosquelette qui peut leur conférer des morphologies particulières (forme de poire par exemple).

En culture, les colonies de mycoplasmes cultivées en conditions satisfaisantes ont un aspect typique en œuf sur le plat comme on peut le voir sur la figure 2 ci-après.

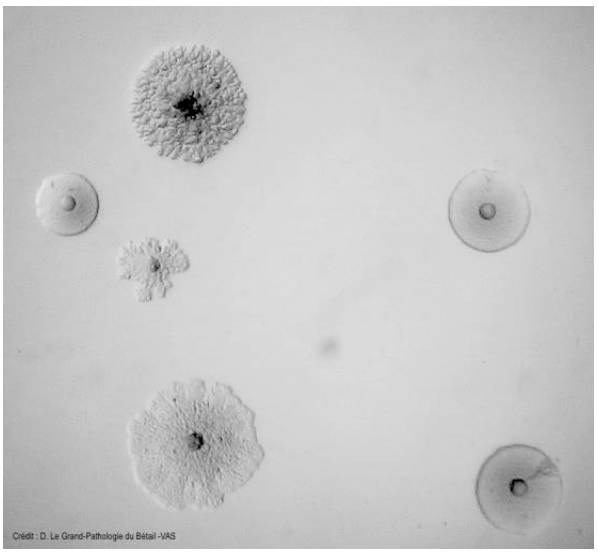


Figure 2 : Forme en œuf sur le plat typique des colonies de mycoplasmes (photos, source : D. Le Grand UMR Mycoplasmose des Ruminants)

Les mycoplasmes étant suffisamment petits pour traverser la surface de la gélose, ils croissent d'abord en profondeur. Ce n'est qu'une fois la surface atteinte qu'ils se multiplient et s'étalent en surface. Cette formation en deux temps d'une colonie explique cet aspect en œuf sur le plat (cf fig. 3 ci-dessous). Un œil avisé pourra reconnaître de grands types grâce à des reflets ou des granulations variables mais l'identification nécessite une visualisation au microscope (7).

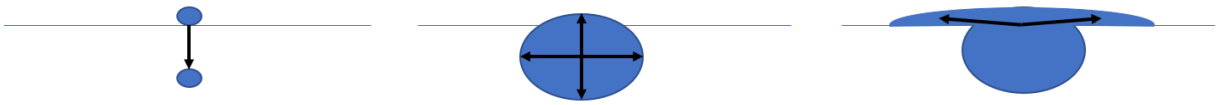


Figure 3 : Schéma explicatif de la formation des colonies en « œuf au plat » de mycoplasmes (schéma, Savatier Camille)

1.3 Structure et génome

1.3.1 Le génome

Les mycoplasmes sont les entités les plus simples pouvant s'autorépliquer. La taille du génome du genre *Mycoplasma* varie d'un peu moins de 600 à 1350 kpb (kilo paires de bases) avec une proportion de paires guanine-cytosine comprise entre 23 à 40% (8). Le plus petit génome est celui de *Mycoplasma genitalium* avec 580 kpb. Le génome de *Mycoplasma canis* est de taille réduite, avec 795 kpb pour la souche PG14, et avec une faible proportion de paires guanine – cytosine comprise entre 27 et 29,1% selon les sources (7,9). Le nombre de gènes est estimé à 700 en moyenne. *M. genitalium* ne présente que 470 gènes environ (10,11). La taille du génome peut être amenée à varier d'une souche à l'autre en raison d'éléments de répétition ou d'insertion. Le matériel génétique se présente sous la forme d'un double brin d'ADN circulaire. La présence de plasmide n'a été observée que très rarement chez certains mollicutes et jamais chez *M. canis* (3).

Il semblerait qu'au cours de l'évolution, la réduction du génome ait entraîné la perte d'une partie du système de réparation de l'ADN. Cela a pour conséquence un taux de mutation important et donc des répercussions sur la diversité au sein d'une population de mycoplasmes (résistances aux antibiotiques, variabilité antigénique) (3).

1.3.2 La membrane mycoplasmique

Les mycoplasmes présentent une membrane plasmique trilaminaire composée de protéines, de glycoprotéines, de lipoprotéines, de phospholipides et de stérols.

La synthèse de la membrane plasmique est dépendante des apports du milieu extérieur puisque les mycoplasmes sont quasiment incapables de synthétiser des acides gras en raison de leur génome limité. C'est cette propriété qui explique que les mollicutes (notamment *Acheloplasma laidlawii*) ont été utilisés dans la recherche sur la membrane plasmique du fait de la facilité de son étude en modifiant simplement la composition du milieu. (11)

D'une part, la membrane de *Mycoplasma canis* est riche en cholestérol non estérifié issu du milieu extérieur. Combiné à l'absence de paroi, cette richesse en cholestérol permet la fusion avec la membrane d'une cellule hôte, mais aussi des échanges membranaires voire la position intracellulaire de Mycoplasma canis (2,12) au sein même de cette cellule hôte.

D'autre part, les mycoplasmes présentent un taux important de protéines membranaires qui peuvent représenter jusqu'à plus des deux tiers de la masse membranaire

(13). Cette particularité est probablement en lien avec l'absence de paroi et à l'origine de l'importance de la variation antigénique des mycoplasmes.

Malgré un génome limité, *Mycoplasma canis* présente une membrane plasmique riche qui lui offre différentes propriétés comme la fusion membranaire, la possibilité d'échanges membranaires et une variabilité antigénique importante.

1.3.3 Le cytosquelette

Le cytosquelette des mycoplasmes et ses rôles sont encore peu étudiés. Les différentes formes observées chez les espèces de mycoplasmes (en poire, coccoïde, allongée) suggèrent son existence. Les premières recherches ont montré un cytosquelette atypique et différent de celui des bactéries présentant une paroi (14). Celles-ci se concentrent principalement sur une protrusion cytoplasmique et des filaments observés notamment chez M. pneumoniae. Ces structures joueraient un rôle dans l'adhésion aux cellules hôtes, la division cellulaire et la motilité des mycoplasmes par glissement (11,14,15).

1.4 Biologie

1.4.1 Milieux de vie

Mycoplasma canis est une bactérie commensale des muqueuses et pathogène opportuniste. On la retrouve chez les animaux, principalement bovins et canins, et l'homme (7,11) au niveau du tractus digestif, respiratoire et urogénital mais aussi du cœur, du foie, des reins, de la rate et des nœuds lymphatiques (7).

Les mycoplasmes sont des bactéries fragiles sensibles au choc osmotique, aux détergents et aux solvants organiques. Toutefois un milieu humide et riche en protéines leur permet de résister plus longtemps. Les mycoplasmes peuvent supporter plusieurs jours au réfrigérateur et plusieurs mois à – 20 °C (10,16). Certains mycoplasmes semblent capables de former des biofilms et d'être ainsi plus résistants dans le milieu extérieur. Cette propriété n'a pas été étudiée chez *Mycoplasma canis* (17).

1.4.2 Nutrition et culture

De par la petite taille de leur génome, les mycoplasmes ont une capacité de biosynthèse limitée et sont donc dépendants du milieu environnant pour l'apport en nutriments (notamment en acide gras, stérols, acides aminés, acides nucléiques et vitamines). *Mycoplasma canis* produit son énergie sous forme d'ATP par fermentation du glucose. En effet*, M. canis* n'est pas capable d'hydrolyser l'arginine et ne possède pas de phosphatase (7). Ce glucose doit donc être présent dans l'environnement. L'adjonction de sérum au milieu de culture permet un apport intéressant en nutriments (13,16,18). De plus, certains composants classiquement présents dans des milieux de culture (acide gras libre, extrait de levure,…) peuvent se révéler être toxique pour les mycoplasmes (4,13). C'est ce qui fait que la culture de certains mycoplasmes est souvent fastidieuse.

La température optimale de croissance des mycoplasmes est comprise entre 35 et 37°C. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives pour la plupart qui peuvent se développer dans l'air avec 5% de CO_2 (10,16).

Les mycoplasmes sont des bactéries auto-réplicatives, elles n'ont pas recours à des cellules hôtes pour se reproduire. La division cellulaire se déroule parfois en deux étapes : la réplication du matériel génétique puis la scission en deux cellules filles. Cette chronologie explique l'observation de filaments plurinucléés lors de culture *in vitro* et parfois *in vivo* (13).

Les conditions de culture étant complexes et la faible vitesse de croissance des mycoplasmes par rapport à d'autres bactéries rendent la culture plus lourde. D'autres techniques telles que la PCR offrent de nouvelles possibilités de recherche et de diagnostic.

1.5 Pouvoir pathogène

Les mycoplasmes présentent certaines propriétés qui peuvent se révéler néfastes pour les cellules hôtes. Ces propriétés constituent le pouvoir pathogène des mycoplasmes et expliquent leur tropisme et leur mode d'infection.

1.5.1 Action sur les cellules de l'hôte

Compétition pour les précurseurs

Les mycoplasmes ayant des capacités de biosynthèse très limitées, ils dépendent de leur environnement, qui est aussi celui de la cellule hôte, pour l'apport des principaux précurseurs biosynthétiques. Cette compétition peut entraîner des dysfonctionnements du métabolisme de la cellule hôte. La spoliation en cholestérol entraîne des modifications dans le transport et le métabolisme des lipides, la neurotransmission (cholinergiques et intégrité membranaire). La spoliation en arginine par des mycoplasmes entraîne une modification de la synthèse des protéines et impacte ainsi la division cellulaire et la croissance. Certains mycoplasmes ont même montré une capacité à modifier le matériel génétique (translocation, modification du nombre de chromosomes, …) via l'inhibition de la synthèse d'histones, riches en arginine (19). Toutefois *Mycoplasma canis* n'étant pas capable d'hydrolyser l'arginine, cette spoliation semble plus limitée.

Attachement à la membrane des cellules eucaryotes

Mycoplasma canis est capable de diverses actions pathogènes pour la cellule hôte. Le premier contact se fait par attachement. Il a été particulièrement étudié dans le cas de *Mycoplasma pneumoniae*. Les mycoplasmes dépourvus de capacité d'attachement sont avirulents (1,19). Chez *M. pneumoniae*, cet attachement est médié par une protrusion cytoplasmique terminale effilée. Au niveau de cette structure se concentrent des adhésines et autres protéines membranaires jouant un rôle dans l'attachement. Des protéines accessoires permettent sa formation et d'y concentrer les protéines d'adhésion (19). Chez *Mycoplasma canis*, la présence de cette protrusion n'est pas documentée et mériterait d'être étudiée à l'avenir. Si elle se révélait être absente, l'étude des modalités d'attachement et d'une potentielle polarisation de la cellule mycoplasmique serait intéressante.

Invasion cellulaire

Longtemps considérée comme l'apanage de *Mycoplasma penetrans*, de récentes études ont montré que d'autres espèces de mycoplasmes pouvaient envahir les cellules hôtes.

L'invasion de la cellule hôte fait suite à l'attachement du mycoplasme. Cette capacité d'invasion intracellulaire n'est pas observée chez toutes les souches de *Mycoplasma canis* mais les souches retrouvées dans la sphère urogénitale de la chienne (UF31 et UF33) en sont capables (2). Cette position intracellulaire permet aux mycoplasmes d'échapper au système immunitaire et à certains antibiotiques. C'est le cas pour la gentamicine qui est utilisée pour différencier les mycoplasmes intra- et extracellulaire dans différentes études.

Les mécanismes en jeu dans l'invasion cellulaire par les mycoplasmes sont encore méconnus et sembleraient faire intervenir le cytosquelette de la cellule hôte après transduction d'un message induit par l'adhésion (2).

Les sialidases jouent un rôle dans l'invasion bien qu'elles ne soient pas déterminantes. La liaison avec des acides sialiques présents sur les glycoprotéines membranaires de la cellule hôte entraîne l'internalisation des mycoplasmes qui les possèdent. La variété de ces sialidases et leur spécificité de liaison pourraient expliquer la spécificité des mycoplasmes pour certaines espèces hôtes et leur localisation dans l'organisme. Ils sembleraient qu'elles aient aussi un rôle dans le détachement entre les mycoplasmes et la cellule hôte. Les sialidases permetttaient ainsi la colonisation des cellules voisines et donc des tissus.(2)

Fusion cellulaire

Certains mycoplasmes présentent des capacités de fusion avec la cellule hôte. La composition en cholestérol non estérifié de la membrane des mycoplasmes est une condition à la fusogénicité (12). Certains mycoplasmes nécessitent aussi le maintien d'un gradient membranaire de protons ce qui explique l'altération de la fusogénicité par des protons ionophores (20).

Il y a alors émission au sein de la cellule hôte d'enzymes dont des nucléases qui vont dégrader le matériel génétique, des protéases et des phosphatases qui vont interagir dans le mécanisme de transduction de message (19). Des composants mycoplasmiques peuvent aussi être intégrés à la membrane de la cellule hôte, entraînant ainsi la modification de récepteurs et des interactions cellulaires au sein du tissu infecté.

Synthèse de toxiques

La synthèse de peroxyde d'hydrogène et de radicaux libres par les mycoplasmes adhérents est à l'origine d'un stress oxydatif et de dommages membranaires des cellules hôtes (1,11,19,20). Cependant cette production est très faible pour les souches de *M. canis* retrouvées dans la sphère urogénitale (2).

Effets cytopathiques

Les études *in vitro* sur *M. canis* n'ont pas montré d'effet cytopathique fréquent et important (2,19) ce qui laisse à penser que les dommages tissulaires sont dus à l'action du système immunitaire plutôt qu'à *M. canis* directement (2).

Autres

Certaines études rapportent le pouvoir oncogénique des mycoplasmes retrouvés chez l'homme. Des mycoplasmes peu virulents sont en contact étroit avec les cellules eucaryotes sur de longues durées et peuvent entraîner des modifications chromosomiques (19) aboutissant à une transformation de la cellule et l'apparition de tumeurs. Cette transformation se fait toutefois en plusieurs étapes et sur le long terme (21–23).

La colonisation par des mycoplasmes peut entraîner la modification des récepteurs et des mécanismes de transport de la cellule. Par exemple, dans le cas de *M. hyopneumoniae*, la modification des canaux potassiques entraîne la modification du gradient membranaire et ainsi la ciliostase des cellules ciliées de l'épithélium bronchique (11,20,24). La modification du contrôle muscarinique des canaux potassiques dans le cas d'infection par *M. orale*, ainsi à l'origine de sécheresse des muqueuses buccales, est un autre exemple (25).

1.5.2 Action sur le système immunitaire

Le caractère chronique et plus ou moins symptomatique des infections par des mycoplasmes est en grande partie expliqué par l'action de ceux-ci sur le système immunitaire. Les mycoplasmes exercent leurs actions sur les monocytes, les macrophages, les polynucléaires et les lymphocytes B et T.

Stimulation lymphocytaire

Les mycoplasmes sont capables de stimuler de manière non spécifique et polyclonale des lymphocytes B et T par action mitogène. Cette stimulation n'entraîne pas forcément de différenciation (11,19,20,26). Il y a alors amplification de la réponse immunitaire par synthèse de cytokines suite à la stimulation des lymphocytes T. On observe alors un recrutement et une infiltration lymphocytaire des épithélia (16).

Synthèse de cytokines

Via la stimulation de la sécrétion de certaines cytokines par la cellule hôte, *M. canis* est capable de moduler la réponse immunitaire de l'organisme hôte. Cette modulation est variable selon les souches et le seraient aussi selon les cellules hôtes (20). Les mycoplasmes sont ainsi capables de stimuler ou d'inhiber la synthèse de différentes cytokines (27). Il en résulte des synergies et des antagonismes qui participent aux interactions complexes avec le système immunitaire. Concernant les souches retrouvées dans la sphère urogénitale (UF31 et UF33), on observe un profil de cytokines (TNF alpha, IL-6, IFN gamma, IL-10) pro-inflammatoire

avec un fort rapport TNF alpha / IL-10 qui oriente vers une réponse Th1. Les autres souches étudiées présentent des effets plutôt anti-inflammatoires (2).

La stimulation de la sécrétion de cytokines est permise par des lipides et lipoprotéines membranaires avec une terminaison aminée, appelés immunomodulines qui interagissent avec des Toll-like Recepteurs. Ces mêmes immunomodulines active les macrophages et permettent le recrutement de leucocytes (19,28).

Bien que la synthèse des cytokines permette la mise en place d'une réaction immunitaire de la part de l'hôte, elle est aussi à l'origine de nombreux dégâts tissulaires et de l'aspect symptomatique des infections à mycoplasmes.

Inhibition de la sécrétion de CMH II

La colonisation par certaines souches de *M. canis* entraîne l'inhibition de la sécrétion de CMH-II. Cela permet ainsi de détourner l'immunité cellulaire et de faciliter la dissémination de *M.canis* (2). Cependant cette inhibition n'a été évaluée que pour les souches non génitales. Or ces mêmes souches étaient à l'origine d'un profil de cytokines anti-inflammatoire à l'inverse des souches génitales. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de ces souches génitales sur l'expression du CMH-II. D'autres espèces de mycoplasmes stimulent cette expression (11), il est donc possible que ce soit aussi le cas des souches urogénitales UF31 et UF33 étudiées par Michaels et al. (2)

Variabilité antigénique

Au sein d'une même population de mycoplasmes, de nombreux variants antigéniques peuvent être observés et cela même avant toute réponse immunitaire. Cette observation découle de l'hypervariabilité antigénique de certaines protéines et lipoprotéines des mycoplasmes. *M. pneumoniae* et *M. genitalium* ont particulièrement été étudiés dans le cadre de la variabilité antigénique.

Les mycoplasmes sont capables à partir d'un même génotype, certes de taille réduite, de générer de manière spontanée et aléatoire des protéines et lipoprotéines avec une antigénicité variable. Ainsi au sein d'une même population on retrouve différents variants antigéniques, ce qui permet aux mycoplasmes de s'adapter au mieux aux récepteurs présentés pas le tissu infecté, d'échapper à la réponse immunitaire et d'infecter d'autres tissus avec des récepteurs différents au sein de l'organisme hôte. Cette hypervariabilité antigénique est réversible, c'est-à-dire qu'à partir d'un variant donné il est possible de retrouver une multiplicité de variants antigéniques.

Cette variation se fait à haute fréquence (100 fois à 10^6 fois plus fréquent qu'une mutation normale (11)) et de manière aléatoire. Elle est de différente nature : 1) variation de la taille des protéines et lipoprotéines par répétition de séquence en partie terminale ; 2) alternance ON/OFF dans leur expression ; et 3) variation de la partie exposée (1,10,11,19,20,28).

Cette variabilité antigénique explique la réponse inadaptée du système immunitaire et ainsi la chronicité des infections à mycoplasmes.

Induction de phénomènes auto-immuns

La capacité des mycoplasmes à stimuler des lymphocytes de manière non spécifique, la perturbation des mécanismes d'inhibition, de potentielles homologies protéiques (1,29) entre les mycoplasmes et l'organisme hôte (1,29) et les imitations antigéniques sont autant de raisons pouvant expliquer le développement de réactions auto-immunes au cours d'infections par des mycoplasmes (11,27). Ces réactions auto-immunes sont à l'origine du caractère protéiforme des mycoplasmoses (arthrite, troubles cardiovasculaires, neurologique, hématopoïétique …) (1).

Les propriétés des mycoplasmes précédemment présentées permettent donc d'imaginer et de suspecter le potentiel impact des mycoplasmoses sur la reproduction.

2 Infertilité canine et mycoplasmose vaginale

2.1 Mycoplasmes et flore vaginale

Les mycoplasmes font partie de la flore vaginale et des espèces potentiellement pathogènes sont fréquemment retrouvées chez des individus sains de nombreuses espèces (humaine, bovine, équine, canine, …). Dans le cas de la femme, on retrouve des uréaplasmes chez 40 à 80% des femmes, *Mycoplasma hominis* chez 20 à 50% et *Mycoplasma genitalium* dans une moindre mesure (0 à 5%) (30) sans impact sur la fertilité.

Les mycoplasmes vaginaux ont été mis en évidence pour la première fois chez la chienne en 1951 (31). La prévalence de portage de mycoplasmes dans la flore vaginale varie selon les études de 16% à 88% des chiennes (7,31–33), ce qui peut s'expliquer par des techniques

d'échantillonnage et d'analyse différentes. Onze espèces de Mollicutes ont été isolées dans le tractus génital de chiennes saines (7,8,10) :

- *Acheloplasma laidlawii*
- *Mycoplasma bovigenitalium*
- ***Mycoplasma canis***
- ***Mycoplasma cynos***
- ***Mycoplasma edwardii***
- *Mycoplasma feliminutum*
- *Mycoplasma gateae*
- *Mycoplasma maculosum*
- ***Mycoplasma molare***
- ***Mycoplasma spumans***
- *Mycoplasma opalescens*

Les espèces notées ci-dessus en gras sont les plus fréquentes*, Mycoplasma canis* étant la plus fréquemment isolée (31,33). Ces mycoplasmes sont aussi retrouvés pour la plupart chez le chien mâle, souvent avec des prévalences différentes. D'autres espèces, comme *Ureaplasma canigenitalium*, ont été isolées chez le mâle au niveau du prépuce et/ou de la prostate (7).

2.2 Mollicutes et infertilité

2.2.1 Les études et suspicions chez la femme, la vache et la jument

Plus souvent évoqués lors d'avortements tardifs, de prématurité ou de mortalité néonatale, les Mollicutes seraient aussi responsables d'infertilité. La présence de ces espèces dans la flore commensale rend la preuve de leur pathogénicité difficile à établir et leur rôle pathogène n'est pas établi bien que fortement suspecté chez différentes espèces.

Chez la femme, les espèces de mycoplasmes principalement incriminées sont *Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma parvum* et *Ureasplasma urealyticum*. Celles-ci sont fortement associées à des vaginoses bactériennes, des cervicites, des endométrites, des salpingites et des accouchements avant terme (34–38). Mais de nombreuses études se contredisent encore sur leur implication lors d'infertilité. L'inoculation de *M. genitalium* chez des primates (chimpanzés et ouistitis) a entraîné une immunisation contre *M. genitalium*, le développement de salpingites, d'endométrites et d'infections des voies génitales basses (39). Cette étude suggère fortement le caractère pathogène de *M. genitalium.*

Chez la vache, les espèces de mycoplasmes suspectées jouant un rôle dans l'infertilité sont *M. bovigenitalium* et *U. diversivum*. Ruhnke et son équipe ont montré que ces bactéries étaient significativement associées avec des vulvites granuleuses (40), elles-mêmes à l'origine d'infertilité (41). D'autres études montrent que les uréaplasmes sont à l'origine *in vivo* d'une ciliostase et de lésions tissulaires sur des oviductes bovins pouvant entraîner une infertilité dans un second temps (42).

Enfin **chez la jument**, c'est l'espèce *Mycoplasma equigenitalium* qui est associée avec des vulvites, des vaginites, des endométrites et de l'infertilité (43–45). Les études concernant les mollicutes génitaux chez le cheval restent très peu nombreuses et les affections peu traitées.

2.2.2 Les mécanismes d'infertilité

Bien que le rôle pathogène des mycoplasmes dans l'infertilité ne soit pas clairement prouvé, certains phénomènes permettent d'expliquer cet éventuel rôle.

D'une part, les mycoplasmoses peuvent être à l'origine d'un environnement inflammatoire et d'une infiltration lymphocytaire des épithélia constituant alors un environnement néfaste pour les spermatozoïdes sensibles au stress oxydatif et pour les ovules (16).

D'autre part, comme mentionné ci-dessus, des uréaplasmes sont capables d'induire in vitro une ciliostase et des lésions tissulaires dans les voies génitales. Cependant ce mécanisme n'a pas été mis en évidence in vivo (36,42).

De plus, la capacité d'adhésion des mycoplasmes aux spermatozoïdes seraient à l'origine d'une modification de la motilité de ces derniers (34,36,46), mais aussi de la transmission sexuelle des mycoplasmes et de la stimulation de la production d'anticorps anti-spermatozoïdes.

Enfin, certains mycoplasmes seraient capables de se lier et de masquer les récepteurs sulfoglycolipidiques nécessaires à la reconnaissance ovule-spermatozoïde et donc à la fécondation (47).

2.3 Mycoplasmose, Mycoplasma canis et infertilité canine

2.3.1 Comparaison des prévalences de mycoplasmoses génitales selon la fertilité

D'après l'étude de Janowski et coll. (32), la proportion de chiennes saines porteuses de *Mycoplasma canis* varie selon le groupe étudié (de 16 à 68 %) ce qui pourrait s'expliquer par des conditions environnementales différentes, une méthode de prélèvement, acheminement et analyse des échantillons différentes et des stades physiologiques et hormonaux variables (48,49). En effet la phase lutéale correspond à une période de susceptibilité de l'appareil génital aux colonisations bactériennes (50,51) et peut représenter un facteur de variation du portage de *M. canis* au sein de la flore génitale.

Doig et coll. (31) se sont intéressés à la prévalence de portage chez des chiens fertiles et infertiles. Le portage de mycoplasmes est significativement plus élevé chez les mâles infertiles (92% contre 72% au niveau du prépuce). Chez les femelles et dans cette étude, ce portage ne se révèle pas statistiquement plus élevé. Par la suite, les travaux de thèse de O. Martin (16) ont permis de mettre en évidence un portage plus fréquent chez les chiennes infertiles (80%) que chez les chiennes saines (45%). Ces résultats inférieurs à ceux retrouvés par Doig et coll. peuvent s'expliquer par des méthodes de prélèvement différentes et notamment par l'utilisation d'écouvillons protégés.

2.3.2 Etude de la concentration en mycoplasmes vaginaux

Puisque les mycoplasmes peuvent faire partie de la flore commensale génitale (49,52,53), plus que la prévalence de portage, il peut être intéressant de s'intéresser plutôt à la charge en mycoplasmes vaginaux. D'après Mimouni (54), en dessous de 10^4 UFC/mL les mycoplasmes n'ont pas d'incidence sur la reproduction, entre 10^4 et 10^6 UFC/mL cette incidence est variable, et au-dessus de 10^6 UFC/mL les troubles de la reproduction sont quasiment certains. L'étude dont sont issus ces seuils n'est pas publiée et les résultats sont donc à nuancer. Ils ont été retrouvés partiellement par O. Martin (16).

Ce dernier a comparé la présence de mycoplasmes et la concentration en *Mycoplasma canis* sur des écouvillons vaginaux issus de chiennes fertiles et infertiles. Après culture et identification, Mycoplasma canis est l'espèce principalement retrouvée. Le dénombrement en microplaques a montré que les chiennes fertiles ne présentaient pas de concentration mycoplasmique supérieure à 10^6 UFC/mL. En revanche chez les chiennes ayant eu des troubles de la reproduction, cette concentration est très variable.

On peut donc retenir qu'au-delà de 10^6 UFC/mL, des troubles de la reproduction sont présents. Aujourd'hui c'est le seuil de 10^4 UFC/mL qui est retenu et utilisé en pratique par le CERREC et l'UMR Mycoplasmose des Ruminants à VetAgro Sup. Il peut être intéressant de se demander si une élévation de ce seuil de traitement à 10^6 UFC/mL serait utile.

2.3.3 Mycoplasma canis, principale espèce incriminée

Comme vu précédemment, *Mycoplasma canis* est l'espèce de mycoplasmes principalement retrouvée au sein de la flore vaginale (33) et lors de maladies urogénitales (16,31,32). Différentes souches de *M. canis* ont été isolées au sein de la flore vaginale et certaines seraient plus pathogènes que d'autres. D'après Michaels et al. (2), les souches de *M. canis* principalement retrouvées dans le vagin sont les souches UF31 et UF33. Ces deux souches entraînent notamment la production d'un profil de cytokines différent de celui causé par d'autres souches. Il serait donc éventuellement intéressant d'étudier les souches présentes au sein de la flore vaginale de chiennes fertiles et infertiles.

2.3.4 Infections expérimentales

Les seules études expérimentales ont été réalisées en 1977 et 1979 sur des chiens de races Beagle (4 mâles et 12 femelles) par Holzmann et coll. (55,56).

Une souche de Mycoplasma canis issue de chiennes présentant une maladie urogénitale a été inoculée *in utero* chez des chiennes. L'inoculation a entraîné une immunisation contre M. canis lors d'endométrite, une endométrite purulente, une fibrose, un phlegmon pariétal et une réaction glandulo-kystique, pouvant très probablement être à l'origine d'infertilité. Au cours de l'expérimentation, l'isolement de M. canis était plus important au niveau du col utérin. Aucun mycoplasme n'a été isolé en post-mortem au niveau de l'utérus mais cela pourrait être dû à un manque de sensibilité de la méthode d'isolement qui n'est pas décrite dans l'étude (55).

L'inoculation expérimentale de la souche de *Mycoplasma canis* de même origine dans le canal déférent de chiens mâles est à l'origine d'une orchite et d'une épididymite ainsi que d'une augmentation de spermatozoïdes anormaux et d'une diminution de leur motilité. Les résultats sont à nuancer car les mycoplasmes n'ont pas été retrouvés au sein des testicules et très rarement dans le sperme, la méthode d'inoculation par fistule est invasive et le nombre d'individus inoculés est faible (seulement 3). Enfin la fertilité des individus inoculés n'a pas été évaluée (56).

Bien que les lésions décrites soient compatibles avec les troubles associés à l'isolement de *M. canis*, le petit nombre d'animaux inoculés ne permet pas d'affirmer avec certitude le rôle pathogène de *Mycoplasma canis* dans les infections observées.

2.3.5 Mycoplasma canis est-il pathogène ?

Bien que le rôle pathogène de *Mycoplasma canis* soit fortement suspecté et parfois affirmé par certains auteurs, aucune preuve selon le postulat de Koch n'a été apportée jusqu'à aujourd'hui. La prévalence et la charge en *Mycoplasma canis* plus élevée chez les chiennes présentant de l'infertilité et une maladie urogénitale, les données obtenues chez la femme et la vache, l'obtention de cultures pures de *Mycoplasma canis* lors de maladie urogénitale (54,57) et les lésions entraînées par une inoculation expérimentale intra-utérine de *M. canis* sont autant d'arguments en faveur du rôle pathogène. Mais le fait que *M. canis* soit souvent retrouvé en co-infection (16,32) avec des germes dont la potentielle pathogénicité est connue ou suspectée rend difficile le fait de discerner si *M. canis* est un pathogène opportuniste ou un facteur favorisant les infections par d'autres germes.

L'apport d'une méthode de dénombrement standardisée, de méthodes de détection sensibles comme la PCR, est susceptible de permettre la preuve de pathogénicité des mycoplasmoses vaginales chez la chienne dans les années à venir. Des prélèvements utérins, au niveau de l'oviducte permettraient de s'affranchir de la difficulté représentée par le portage sain puisque ces zones sont censées être dénuées de mycoplasme (33,58). Mais ces prélèvements restent invasifs, plus difficilement réalisables et nécessitent une méthode de détection sensible puisque par le passé, même après inoculation utérine (55), les mycoplasmes n'ont pas été détectés. La recherche de mycoplasmes doit être accompagnée de recherches d'autres germes notamment à travers une culture bactériologique classique afin d'identifier des co-infections ou des relations entre infections. Par ailleurs, l'étude des souches de *M. canis* et leur virulence aura probablement sa place dans les années à venir.

2.4 Aspects cliniques et épidémiologiques

2.4.1 Aspect clinique des mycoplasmoses urogénitales chez la chienne

Les mycoplasmes faisant partie intégrante de la flore vaginale, il existe de nombreux porteurs sains et une partie des mycoplasmoses ne sont pas cliniques. Lorsque c'est le cas, les troubles associés aux mycoplasmoses urogénitales sont des troubles de la fertilité, des infections génitales, des infections du tractus urinaires.

Les troubles de la fertilité constituent le principal motif de recherche des mycoplasmes. Au CERREC, les mycoplasmes sont recherchés systématiquement lors de suivis de chaleurs de chiennes ayant des antécédents d'infertilité (faible taux de conception, mortinatalité, avortement, mortalité embryonnaire précoce et résorption embryonnaire ou fœtale). Toutefois, les résultats doivent être interprétés avec précautions puisque le rôle pathogène des mycoplasmes n'est pas établi chez la chienne. L'implication des mycoplasmes dans les phénomènes de mortalité embryonnaire précoce, de résorption embryonnaire et fœtale n'a jamais été étudiée. L'étude *in vitro* de l'évolution d'embryons en milieu riche en mycoplasmes pourrait constituer un début de réflexion.

Les infections des voies génitales associées aux mycoplasmoses sont principalement des vulvovaginites avec écoulements vulvaires, des endométrites et des salpingites. Selon l'étude de Doig et al. (31), les mycoplasmes sont significativement plus fréquemment isolés chez des chiennes présentant une vaginite avec des écoulements vulvaires purulents que chez les chiennes fertiles. De même, des mycoplasmes ont été isolés en cultures pures et abondantes chez des chiennes présentant une vaginite chronique (59). Dans une étude en 1989 (A. Mattson, P. Schultheiss, P. Olson, données non publiées (60)), des mycoplasmes ont été isolés chez 16% des chiennes présentant un pyomètre (n=19). Ces données n'ayant pas été publiées, elles doivent être considérées avec précautions (culture pure, méthode de prélèvement, etc).

Dans le cadre des **infections du tractus urinaire**, le rôle pathogène des mycoplasmes (principalement M. canis mais aussi M. cynos et M. spumans) est plus clairement établi (57,61,62). En effet, dans la grande majorité des cas, lorsque les mycoplasmes sont isolés, il s'agit de cultures pures. Toutefois la fréquence des infections du tractus urinaires conduisant à l'isolement de mycoplasmes reste faible (quelques cas sur une centaine). Il s'agit notamment d'infections du tractus urinaire réfractaires au traitement antibiotique (57).

2.4.2 Aspect épidémiologique des mycoplasmoses urogénitales chez la chienne

La présence du même type de mycoplasmes chez des chiens évoluant dans le même milieu suggère la transmission de ceux-ci. La faible résistance des mycoplasmes dans le milieu extérieur entraîne la nécessité d'un contact direct pour leur transmission. Les mycoplasmes génitaux peuvent être transmis sexuellement, lors de contact rapproché, lors de mise-bas, par voie aérienne ou contact nasal. La transmission verticale serait possible d'après les données disponibles chez l'humain et les bovins. (16,34,38,47,54,63)

Les conditions d'élevage favorisent donc la transmission de mycoplasmes avec une densité de chiens souvent élevée. Les mycoplasmoses se traduisent dans une collectivité par l'observation de vaginites résistantes aux traitements classiques chez de nombreuses chiennes, associées à des troubles de la fertilité d'allure contagieuse (diminution de la taille des portées, mises bas prématurées, mortinatalité) (63). Toutefois, il faut garder à l'esprit que

les conditions de transmission des mycoplasmoses favorisent aussi la transmission d'autres germes (54).

Lors de mycoplasmoses au sein d'un élevage, l'isolement des chiennes porteuses et infertiles est nécessaire pour limiter la propagation du type de mycoplasmes en cause (éventuelle souche pathogène) (64,65). Une recherche des mycoplasmes chez les étalons utilisés dans l'élevage est également nécessaire car il s'agit de l'un des principaux vecteurs (63).

3 Comment les diagnostiquer ?

3.1 Diagnostic différentiel

Face à des troubles de la reproduction, il est essentiel de présenter une démarche systématique. L'exclusion des causes les plus fréquentes est nécessaire au diagnostic de mycoplasmose génitale.

3.1.1 Causes infectieuses

Brucella canis

La brucellose canine est responsable d'avortements tardifs qui sont souvent la première manifestation en élevage, plus rarement de mortalité embryonnaire précoce et avortement précoce. Par la suite, une chienne porteuse peut produire des chiots présentant certaines anomalies (adénomégalie, fièvre récurrente, troubles neurologiques, ostéomyélite, etc). Chez le mâle, la brucellose peut être responsable d'orchi-épididymite, voire d'infertilité dans certains cas.

Il s'agit d'une infection transmissible par contact avec des matières virulentes (sécrétions génitales, avortons, fèces, urine), par contacts rapprochés et lors d'accouplements. Son caractère zoonotique est à retenir. Cette maladie sévit principalement dans les élevages, sur le continent nord-américain, en Amérique latine et au Japon. Elle est en émergence en Europe et probablement sous diagnostiquée.

Le diagnostic peut se faire par culture bactériologique à partir du sang, de l'urine, de l'avorton, des enveloppes fœtales et éventuellement de prélèvements vaginaux. La PCR est aussi un moyen diagnostic à privilégier (seul ou en complément de la bactériologie). Une

sérologie peut être utilisée dans le cadre du diagnostic entre 10 et 30 semaines post-infection, mais de nombreux faux positifs sont observés et seul un résultat négatif peut être raisonnablement interprété.

Compte tenu de sa gravité en élevage et de son émergence, la brucellose doit être recherchée pour tout cas d'avortement, en particulier après introduction de nouveaux reproducteurs. (10,16,63,66–69)

Herpès virose

L'herpès virose est responsable de mortinatalité, et suspectée dans le cadre d'avortements et d'infertilité. Les chiots atteints présentent le plus souvent des troubles digestifs avec une douleur abdominale, suivis de troubles neurologiques. La mort survient en 2 à 5 jours. Des toux du chenil peuvent aussi être observées en raison d'un tropisme génital et respiratoire du virus de l'herpès. Des lésions sur le pénis et la vulve (parfois seulement au moment de l'œstrus) peuvent être observées périodiquement et sont à l'origine de la transmission sexuelle.

Le virus est transmis par un contact rapproché avec les matières virulentes (sécrétions oronasales, vaginales et sperme, avorton et enveloppes fœtales). Le virus étant capable de rester latent, l'expression clinique peut se faire à la faveur d'une immunodépression notamment autour du pro-œstrus et de la mise-bas. Elle est répandue mondialement et on la retrouve principalement au sein de collectivités.

La suspicion clinique et nécropsique (chiots morts avec piqueté hémorragique sur les poumons, la rate, le foie, gros reins déformés, épanchements hémorragiques, placenta nécrosé) de l'herpès virose doit mener à des examens complémentaires pour confirmer cette suspicion. La PCR et l'analyse histologique sont les principaux outils diagnostiques. La sérologie peut s'avérer peu significative car, le virus étant peu immunogène et les anticorps ne persistant pas longtemps, la séropositivité n'indique pas toujours une infection récente en raison du phénomène de latence.

En raison de sa forte présence, l'herpès virose doit être envisagée pour tout cas de mortinatalité (10,63,66,67,69).

Autres maladies infectieuses

Dans le cadre du diagnostic différentiel, une culture bactériologique vaginale et/ou cervicale est recommandée. Le vagin de la chienne n'étant pas un milieu stérile, le développement de germes est attendu. Les germes communément retrouvés sont des entérobactéries, des coques gram positives et des mycoplasmes, qui peuvent être pathogènes

opportunistes (68). Si on obtient une culture bactérienne abondante et pure, le rôle pathogène du germe isolé est à envisager et un traitement peut s'avérer nécessaire. En revanche, les bactéries des genres *Brucella, Listeria, Salmonella, Leptospira, Campylobacter* n'appartiennent pas à la flore vaginale et sont des agents pathogènes avérés.

Certaines autres causes infectieuses non bactériennes doivent être envisagées. La clinique permettra de s'orienter (chienne qui semble ne pas remplir, avortement précoce, avortement tardif, mortalité néonatale). Pour les causes virales, la maladie de Carré et l'hépatite de Rubarth sont responsables d'avortements. Pour les causes parasitaires, *Toxoplasma gondii* peut être à l'origine d'avortements tardifs et *Neospora caninum* de mortalité chez les chiots. (10,63,67,69)

3.1.2 Maladies endocriniennes

Hypothyroïdie

L'hypothyroïdie est associée avec de l'infertilité caractérisée par des anoestrus, des irrégularités du cycle, un pro-oestrus prolongé, un oestrus plus court, et un risque plus élevé d'avortements, de chiots mort-nés ou de faible poids à la naissance (67,70). Les hormones thyroïdiennes sont nécessaires à la maturation des gamètes, en stimulant les cellules de la granulosa, mais aussi à la bonne fonction du placenta. A l'inverse, l'hyperthyroïdie étant aussi responsable d'infertilité chez la femme, une hyperthyroïdie iatrogénique (i.e. dans le cadre d'un traitement de l'hypothyroïdie) pourrait donc être à l'origine d'une infertilité chez la chienne (71).

Enfin, l'hypothyroïdie étant considérée comme héréditaire, il est préférable de retirer les animaux hypothyroïdiens de la reproduction.

Tumeurs et kystes ovariens

Lors de kyste lutéal, le taux de progestérone sérique est élevé (>2ng/mL) ce qui entraîne un feedback négatif sur l'hypophyse et donc une diminution de la sécrétion de gonadotropines, inhibant ainsi le cycle ovarien (71).

Lors de kyste folliculaire et de tumeurs de la granulosa, le fort taux d'oestrogènes sécrétés implique un oestrus prolongé voire persistent.

L'examen échographique et les dosages hormonaux permettent le diagnostic de ces anomalies ovariennes.

Insuffisance lutéale

La progestérone sécrétée par le corps jaune est indispensable au maintien de la gestation. En situation physiologique, une chute du taux de progestérone en dessous de 1 à 2 ng/mL est observée 24 à 36h avant l'induction du part (72). Lors de suspicion d'insuffisance lutéale, le dosage de la progestérone peut être réalisé toutes les semaines. La progestéronémie au cours de la gestation ne doit pas être inférieur à 2ng/mL pendant plus de 48h sinon l'avortement est quasi-systématique (71).

3.1.3 Maladies systémiques

Les chiennes présentant une maladie systémique telle qu'une insuffisance rénale ou une cachexie sont moins disposées à cycler normalement. Par exemple, l'hypercorticisme est à l'origine d'une baisse de la synthèse et de la sécrétion de LH entraînant une baisse de fertilité. Un bilan biochimique et une numération formule sanguine peuvent être utiles à réaliser. (68,71)

3.1.4 Iatrogénique

Pour les raisons évoquées plus haut, l'administration de progestagènes, d'œstrogènes, de glucocorticoïdes et d'hormones thyroïdiennes sont à l'origine d'une diminution de la fertilité (67,71,73).

3.1.5 Autres

D'autres causes peuvent être envisagées selon l'anamnèse du patient comme un cycle anovulatoire (le suivant est souvent ovulatoire), une anomalie du tractus génital (par exemple à la suite d'une césarienne), un âge avancé, etc.

Les mycoplasmoses vaginales sont donc envisagées dans le cadre d'une approche globale de l'infertilité (cf fig. 4 ci-après).

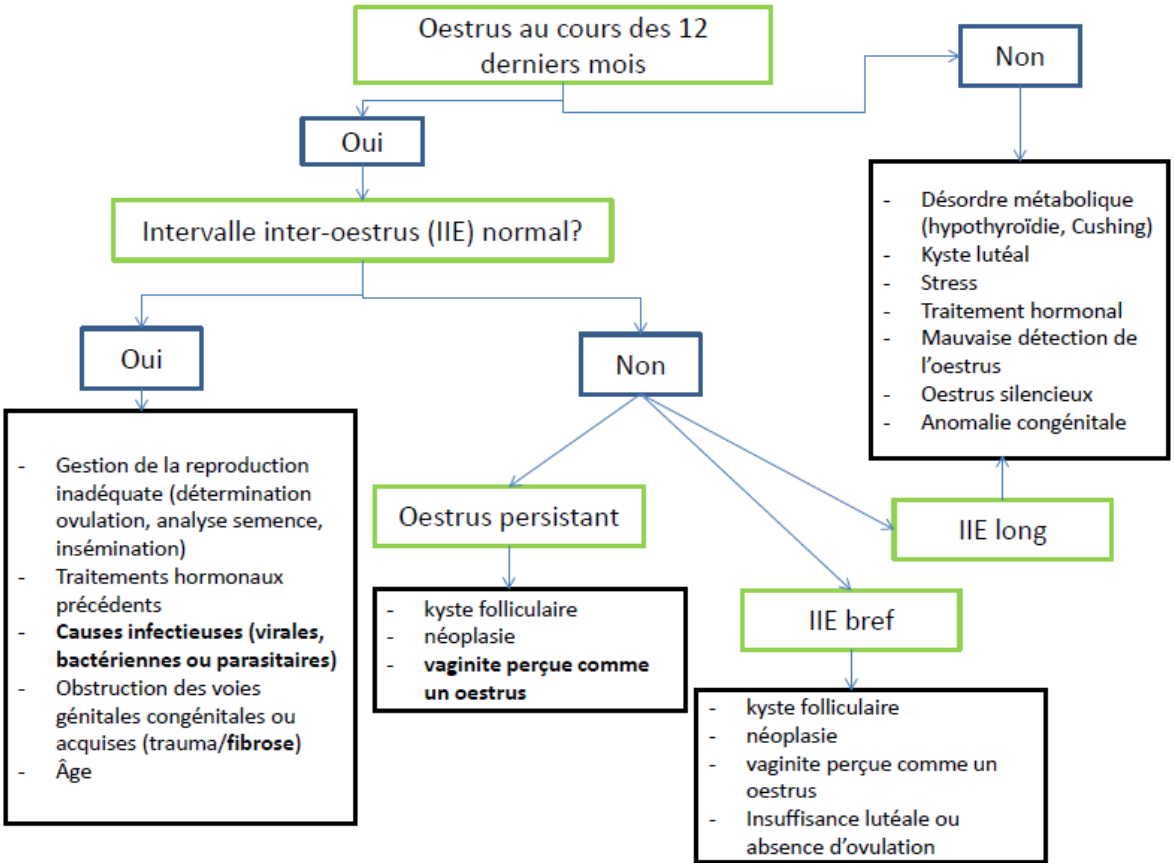


Figure 4 : Approche globale de l'infertilité (schéma Savatier Camille, d'après Wilborn et Maxwell (2012))

3.2 Prélèvements

L'écouvillonnage vaginal est la technique de prélèvement la plus fréquemment réalisée car peu invasive et facilement réalisable. Après nettoyage des lèvres vulvaires voire désinfection à l'alcool à 70%, un spéculum stérile est mis en place. En l'absence de speculum, l'écouvillon peut être introduit avec une protection (par exemple la gaine de protection de l'écouvillon sectionnée à son extrémité, cf figure 5 ci-dessous) afin d'éviter les contaminations par le vestibule du vagin. Un écouvillon, éventuellement humidifié avec une solution tampon stérile (PBS), est introduit dans le vagin jusqu'à sa partie proximale. Des mouvements rotatoires de l'écouvillon contre la paroi vaginale permettent la récolte d'un échantillon suffisant. L'écouvillon est ensuite retiré en prenant soin de ne pas le contaminer. Il est par la suite conditionné selon son utilisation et les recommandations des laboratoires (milieux spéciaux, sous couvert de froid, etc).

Figure 5 : Ecouvillonnage vaginal avec protection (photos Savatier Camille)

En général, deux prélèvements vaginaux sont réalisés : un premier pour une culture bactériologique classique et un second pour une culture de mycoplasmes.

D'autres prélèvements sont possibles au niveau de l'utérus (biopsie ou rinçage), des oviductes ou de l'avorton (rate, foie). Les modalités de prélèvements et d'analyse sont similaires.

3.3 Analyses des échantillons

3.3.1 Culture bactériologique classique

La culture bactériologique classique est réalisée auprès d'un laboratoire vétérinaire. L'échantillon doit être acheminé sous couvert de froid (+2 à +8°C) dans un délai de 2 jours.

3.3.2 Culture pour recherche de mycoplasmes

L'extrémité de l'écouvillon destiné à la culture de mycoplasmes est alors coupée et placée dans un milieu adapté aux mycoplasmes (Amies, Stuart modifié, solution saline type PBS), recommandé et éventuellement fourni par le laboratoire puis décongelé au bain marie au préalable. L'acheminement au laboratoire doit avoir lieu dans un délai de 24h. Il faut retenir que l'échantillon doit être maintenu humide, en milieu réfrigéré et rapidement acheminé. (10,16,54,74)

L'utilisation d'un milieu de type Hayflick modifié est recommandé par Whitford et Lingsweiler (64). Pour augmenter la probabilité d'isolement, une culture en bouillon peut être réalisée avant l'ensemencement de géloses. Ces bouillons peuvent aussi être utilisés pour réaliser des dilutions au dixième et ainsi titrer les mycoplasmes.

La plupart des mycoplasmes se développent peu dans des conditions d'aérobie. Ils nécessitent un environnement humide et peu concentré en oxygène. Une incubation en étuves à 36°C et avec une atmosphère de 5 à 10% de CO_2 est recommandée par Whitford (74). Certains mycoplasmes peuvent apparaître en 48 à 72h comme c'est le cas pour Mycoplasma canis. D'autres mycoplasmes nécessitent 10 à 14 jours avant de pouvoir observer les colonies. Les colonies peuvent être facilement observées à l'aide d'un microscope avec un objectif x10.

L'identification des mycoplasmes nécessite souvent des cultures pures et peut être réalisée de différentes manières (10,16,75):

- par des méthodes biochimiques souvent longues et peu simples à mettre en place (fermentation du glucose, hydrolyse de l'arginine ou de l'urée, production et activité de la phosphatase, etc) (cf tab. 1 ci-après) ;

Tableau I : Propriétés biochimiques des mycoplasmes canins et identification

		Hydrolyse de l'arginine	Absence d'hydrolyse de l'arginine
Fermentation du glucose	Phosphatase +		M. cynos M. felis
	Phosphatase -		M. canis M. edwardii M. feliminutum M. molare
Absence de fermentation du glucose	Phosphatase +	M. maculosum M. opalescens M. spumans	M. bovigenitalium
	Phosphatase -	M. arginini	M. bovigenitalium M . feliminutum

- par des méthodes sérologiques : méthode immuno-enzymatique (MF Dot), test d'inhibition de croissance, test d'inhibition métabolique, l'immunofluorescence (ELISA) qui peut être utilisée lors de culture mixte ;
- par utilisation du génie génétique : la PCR, l'association PCR-RFLP plus rapide et moins coûteuse que la PCR et l'hybridation *in-situ*. Ces méthodes sont encore peu répandues en France.

3.3.3 Polymerase chain reaction (PCR)

Les méthodes PCR disponibles aujourd'hui sont principalement qualitatives et permettent l'identification de l'espèce de mycoplasme isolée. La présence des mycoplasmes au sein de la flore commensale vaginale limite l'apport de la PCR point final dans la démarche diagnostique.

3.3.4 Sérologie

La sérologie n'est pas utile aujourd'hui au diagnostic clinique et reste utilisée dans des conditions expérimentales pour étudier d'éventuelles séroconversions. En effet, les mycoplasmes faisant partie de la flore commensale, une stimulation de la production d'anticorps peut être observée chez des chiennes saines. De plus, les infections pouvant être très localisées, les anticorps sont souvent présents en très faible concentration dans le sang. Enfin, il faudrait cibler la sérologie à une ou quelques espèces et non à toutes les espèces de mycoplasmes. Dans le cas d'une recherche de *M. canis* uniquement, la sérologie pourrait être une piste à envisager ultérieurement. Aujourd'hui le diagnostic est uniquement direct.

4 Faut-il traiter ?

4.1 Les possibilités thérapeutiques

Mycoplasma canis a été isolé en culture pure chez des chiens présentant une maladie urogénitale réfractaire au traitement antibiotique (57). La plupart de ces chiens avaient été traités à l'aide de triméthoprime sulfamide ou d'amoxicilline sans résultat et la modification du traitement antibiotique en conséquence de la présence des mycoplasmes a parfois permis une amélioration. On peut donc penser que soit l'antibiothérapie non ciblée n'a pas permis l'élimination des mycoplasmes et donc la guérison, soit que les mycoplasmes isolés ont été promus par l'antibiothérapie et ne seraient pas le pathogène primaire. Des résultats similaires ont été observées par Ström et Linde-Forsberg en 1992 (76) sur des chiennes traitées à l'aide d'ampicilline et de triméthoprime sulfaméthoxazole entraînant la prolifération de mycoplasmes et E. coli. Par ces exemples, il est important de retenir qu'une antibiothérapie non adaptée peut ne pas résoudre la mycoplasmose ou même la promouvoir. Les recommandations de bonnes pratiques d'antibiothérapie rappellent que les traitement antibiotiques de longues durées (supérieures à 3 semaines) sont à éviter en raison du risque de développement de mycoplasmose (77).

Les mycoplasmes étant dépourvus de paroi, ils présentent une insensibilité naturelle aux antibiotiques agissant sur la synthèse de la paroi comme les bétalactamines et les polypeptides (polymyxine, bacitracine). Mais ce ne sont pas les seuls antibiotiques inactifs contre les mycoplasmes. L'absence d'enzyme nécessaire au métabolisme de l'acide folique rend les mycoplasmes insensibles aux sulfamides et au triméthoprime(10,54,78). Une partie des mycoplasmes présente une résistance intrinsèque à la rifampicine par modification de leur ARN-polymérase. Certaines quinolones, surtout de la première génération comme l'acide nalidixique, ne sont pas efficaces contre les mycoplasmes (79).

Les principales familles d'antibiotiques utilisées aujourd'hui pour traiter les mycoplasmoses sont les suivantes :

- Les macrolides et apparentés (lincosamides et pleuromutilines)

Les molécules de cette famille antibiotique se lient à l'ARN 23S du complexe ribosomal, inhibant ainsi la synthèse protéique. La josamycine et la tylosine sont actives sur les mycoplasmes et les uréaplasmes et sont parmi les plus efficaces. M.canis présente une résistance intrinsèque à l'érythromycine (54,63,80). Les uréaplasmes sont résistants aux lincosamides et certains à l'érythromycine, moins à la clarithromycine et l'azithromycine. La tulathromycine et la gamithromycine, molécules avec un cycle à 15 carbones, sont de plus en plus utilisées dans le traitement des mycoplasmoses, principalement respiratoires, chez les animaux de rente (81) mais il n'existe pas encore d'AMM pour chien ni d'étude de la sensibilité de M. canis à ces molécules. Enfin l'utilisation de pleuromutilines (valnemuline et tiamuline) est rapportée, là encore chez les animaux de rente seulement.

Les macrolides présentent un effet anti-inflammatoire, notamment utile en pneumologie (82), et pourraient entraîner une « fausse réponse clinique » par diminution de l'inflammation mais sans pour autant traiter la cause.

- Les tétracyclines,

Les molécules de cette famille empêchent le transfert des acides aminés vers les complexes ribosomiques en se fixant à l'ARN 16S faisant partie de la sous-unité ribosomique 30S, inhibant ainsi la croissance des chaines peptidiques. L'inhibition de la synthèse protéique stoppe alors la croissance bactérienne. Il s'agit de molécules bactériostatiques. Elles sont actives sur les mycoplasmes et les uréaplasmes.

- Les fluoroquinolones

L'activité de l'ADN-gyrase et de la topo-isomérase IV (83) est bloquée par ces molécules, induisant alors des dommages de l'ADN. De plus, en se fixant directement à l'extrémité des brins d'ADN, elles empêchent les brins de se rassembler ce qui conduit à une mort cellulaire (81). Ce sont donc les seules molécules bactéricides de l'arsenal thérapeutique. Elles sont actives sur les mycoplasmes mais inactives sur certains uréaplasmes. En raison du contexte de lutte contre l'apparition de résistance, les fluoroquinolones sont à réserver aux individus immunodéprimés ou aux infections génitales hautes en association avec un autre antibiotiques pour limiter l'apparition de nouvelles résistances (84).

Le tableau II ci-après reprend les familles antibiotiques actives et non actives contre les mycoplasmes.

Tableau II : Familles antibiotiques actives et non actives contre les mycoplasmes

Toujours inactifs	Actifs
Bétalactamines Sulfamides Triméthoprime Acide nalidixique (quinolone 1ère génération) Polymyxines (Rifampicine)	Tétracyclines Macrolides, lincosamides et pleuromutilines Fluoroquinolones *(pas en première intention)*

L'utilisation d'aminoglycosides comme la spectinomycine et de phénicolés est documentée mais controversée (10,16,79,81).

Une nouvelle molécule bactériostatique dont les premiers résultats sont prometteurs, le peptide déformylase, est en cours d'essais notamment dans le cadre des mycoplasmoses urogénitales humaines (85,86). Cependant il est possible que celui-ci ne soit pas disponible *in fine* en médecine vétérinaire.

Le choix de la molécule à utiliser doit être fait selon le stade physiologique du patient. Un traitement autour de l'insémination, de la saillie ou en cours de gestation nécessitera une molécule non tératogène ni embryotoxique. Les fluoroquinolones doivent être évitées en cours de gestation et sur les animaux en croissance car elles peuvent entrainer des troubles articulaires et ligamentaires (63). Il en est de même pour les tétracyclines qui peuvent être responsables de troubles dentaires. Sur une femelle en gestation, les macrolides sont les molécules antibiotiques de choix (tylosine et josamycine principalement). Il est cependant fréquent que l'AMM chez le chien n'existe pas ou que les données d'embryotoxicité ne soient pas disponibles pour les médicaments présentant une AMM chez le chien comme c'est le cas du Linco-spectin ND. Ceci rend le choix de l'antibiotique encore plus délicat.

La durée de traitement est peu documentée, mais une durée de traitement supérieure à 2 semaines semblent recommandée en raison du caractère non bactéricide des antibiotiques principalement utilisés (12,49,58,68).

La réalisation d'un antibiogramme serait idéale, mais les conditions de culture différentes pour les mycoplasmes ne permettent pas de le réaliser en routine (87) (54). Des méthodes de détermination des CMI par dilution sont applicables mais leur faible standardisation - seules des lignes directives et des recommandations sont disponibles - rend l'interprétation des résultats délicate (10,81). Le E-test semble une alternative envisageable mais ne permet de tester la sensibilité des mycoplasmes que pour un nombre limité d'antibiotiques. Ce test a été utilisé de manière expérimentale pour des mycoplasmes humains et bovins (88,89).

Il est donc conseillé de contrôler l'efficacité du traitement avant la remise à la reproduction par la réalisation d'une nouvelle culture de mycoplasmes avec quantification si possible.

4.2 Quand traiter ?

Certains auteurs recommandent un traitement lorsque la culture dépasse 10^4 UFC/mL, tous germes confondus même en l'absence de signe clinique (90). Cependant tout traitement antibiotique entraîne des dérèglements de la flore vaginale, notamment la prolifération de mycoplasmes et de *E. Coli* (76), pouvant avoir des répercussions sur la fertilité. La balance bénéfice/risque tend donc plutôt vers la mise en place d'un traitement uniquement en présence de signes cliniques (infections urogénitales, infertilité). L'adaptation de l'antibiothérapie en conséquence de la présence de mycoplasmes doit être réalisée lorsque ceux-ci sont mis en cause, c'est-à-dire lorsque leur culture est abondante, voire pure. En effet, lors d'une culture abondante de mycoplasmes en présence de *Brucella canis*, le traitement consistera à éliminer la brucellose et non la mycoplasmose. Pour cela, une quantification des mycoplasmes est nécessaire ainsi qu'une culture bactériologique classique.

Le consensus actuel est donc de traiter les mycoplasmoses urogénitales lorsqu'il y a des signes cliniques (vaginite, métrite, infertilité) associés à l'obtention d'une culture abondante de mycoplasmes (au-delà de 10^4 UFC/mL), voire pure, en l'absence d'autres pathogènes avérés. En raison d'un rôle pathogène non démontré et dans le contexte du plan EcoAntibio, la question de ce seuil doit être reconsidérée.

Face à des signes cliniques d'infections urogénitales ou à de l'infertilité, il est souvent difficile d'en déterminer la cause. Il est alors essentiel de tenir compte de l'antibio-sensibilité des principaux agents pathogènes potentiels pour adapter l'antibiothérapie si celle-ci est nécessaire.

4.3 Ce qui est fait en pratique

La phase lutéale correspond à une susceptibilité accrue aux colonisations bactériennes, pouvant alors motiver une antibiothérapie pré-insémination (46). Cette pratique semble répandue au sein des élevages canins français face à l'infertilité comme j'ai pu le découvrir au cours de discussions informelles avec des éleveurs. Ceux-ci traitent régulièrement leurs chiennes autour de l'insémination et autour de la mise-bas à l'aide d'antibiotiques, souvent achetés à l'étranger via internet.

Une étude des pratiques d'antibiothérapie des éleveurs au sein de leur élevage pourrait être intéressante. Les résultats pourraient alors motiver une campagne de communication ou de sensibilisation autour des bonnes pratiques d'antibiothérapie et des dangers de l'antibiothérapie abusive auprès des éleveurs canins. La visite annuelle de Bilan Sanitaire d'Elevage pourrait être un véhicule de cette campagne.

La contractualisation grandissante entre les éleveurs et les vétérinaires pourrait permettre d'améliorer la prise en charge et le diagnostic d'infertilité. Les éleveurs auraient ainsi plus facilement recours à leur vétérinaire qu'à une antibiothérapie souvent non adaptée ou non justifiée.

Pour ce faire, l'information et la formation des vétérinaires est indispensable. Car aujourd'hui de nombreux vétérinaires semblent encore préférer l'essai thérapeutique que représente l'antibiothérapie plutôt que de se lancer dans une démarche diagnostique d'infertilité parfois longue, fastidieuse et souvent coûteuse pour le propriétaire.

4.4 Le développement d'antibiorésistance, un enjeu de santé publique

Le développement d'antibiorésistance acquise observé chez de nombreuses bactéries est une problématique actuelle importante et probablement due à la pression de sélection exercée par la mauvaise ou trop importante utilisation des antibiotiques.

Les mycoplasmes possédant un système de réparation ADN peu développé (3,79), leur taux de mutations est important. A cela s'ajoutent des points chauds de mutations dans des zones associées à des résistances. Ces particularités expliquent le développement rapide au cours des dernières années d'antibiorésistance au sein de la population de mycoplasmes humains et animaux sous une pression de sélection antibiotique. L'étude des mécanismes de résistance et la mise au point de méthodes standardisées de détermination des sensibilités aux antibiotiques sont aujourd'hui au cœur de l'actualité de la recherche sur les mycoplasmes.

Mycoplasma canis n'a été l'objet que de peu de recherches et les phénomènes d'antibiorésistance acquise par cette espèce ne sont pas documentés. Ces phénomènes étant largement répandus au sein des autres espèces mycoplasmiques, il paraît peu vraisemblable que cela ne soit pas le cas pour *Mycoplasma canis.*

M. canis a été isolé en association avec *M. bovis* dans des cas de pneumonie chez des bovins (81) et même parfois seul. Et l'inoculation expérimentale de *M. canis* chez des bovins est à l'origine de pneumonie dont les lésions histologiques sont compatibles avec celles observées lors de mycoplasmoses. On peut donc considérer *M. canis* comme appartenant à la flore bovine (91). Il est donc probablement soumis aux mêmes contraintes que les mycoplasmes bovins, présent dans la même niche, et avec la même possibilité de développer

des mécanismes de résistance similaires à ceux observés chez d'autres mycoplasmes bovins. Cependant il s'agit probablement d'une souche différente de celles retrouvées dans la sphère génitale canine et cela n'aurait pas d'impact direct sur la reproduction des chiennes.

A travers l'observation et l'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez d'autres mycoplasmes, on peut ainsi espérer avoir une idée de ce qui peut se passer chez *M. canis* en termes d'antibiorésistance.

4.4.1 Observation d'antibiorésistance acquise chez les mycoplasmes

Les échecs thérapeutiques après une antibiothérapie lors d'une affection de la reproduction ne sont pas rares et laissent supposer que des résistances à ces antibiotiques peuvent en être à l'origine.

Une étude italienne réalisée en 2012 (90) a étudié la sensibilité aux antibiotiques de la flore vaginale de chiennes. Une forte résistance à l'amoxicilline, au triméthoprime-sulfamide et à l'ampicilline (plus de 56% de la flore) a été mise en évidence (cf fig. 6 ci-après). Des bactéries multi-résistantes à plus de quatre antibiotiques supposés actifs ont été isolées. Aucun mycoplasme n'a été détecté sur plus de 43 chiennes ce qui n'est pas en accord avec les autres études mentionnées jusqu'ici. On peut supposer que cela est dû à un manque de sensibilité de la technique d'isolement. Néanmoins cette étude témoigne du niveau de pression de sélection exercée par l'utilisation d'antibiotiques au sein de la flore génitale des chiennes.

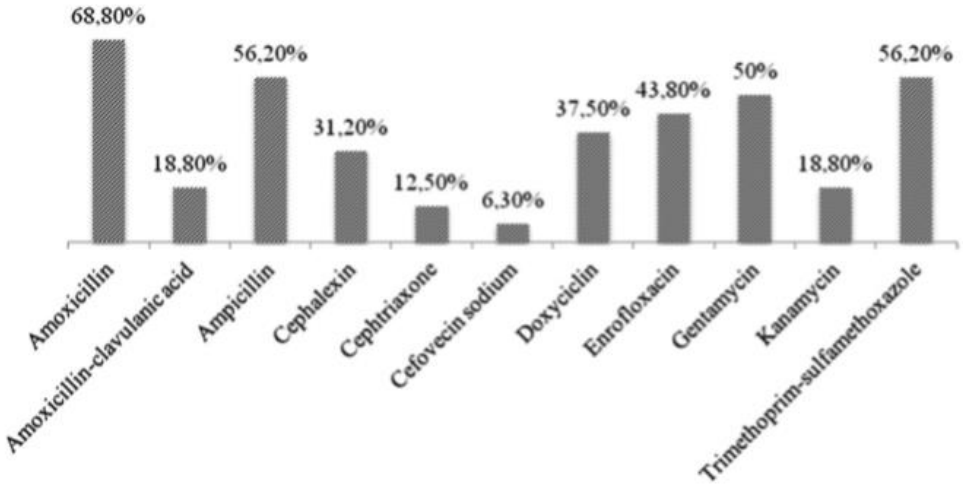


Figure 6 : Pourcentage de résistance chez des micro-organismes isolés lors du pro-œstrus pour différents antibiotiques testés (graphique, Groppetti et coll. (2012))

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques de *Mycoplasma bovis* par un E-test a mis en évidence la présence de résistances acquises pour la tétracycline, l'érythromycine, l'azithromycine et la clindamycine (88). Et l'étude de l'évolution au cours du temps de la sensibilité in vitro de *Mycoplasma bovis* à différents antibiotiques a permis de montrer une augmentation des résistances aux tétracyclines, à la tilmicosine et la tylosine. Toutefois, le niveau de sensibilité de *M. bovis* aux fluoroquinolones semble se maintenir (92).

Deux études en médecine humaine ont montré que les résistances aux fluoroquinolones et aux macrolides sont en forte progression chez *Mycoplasma genitalium* au Japon et en Nouvelle Zélande (93,94), et chez *Mycoplasma hominis* en Chine (22). Aux Etats-Unis, plus d'un tiers des mycoplasmes isolés dans l'urine de femmes présentant une infection du tractus urinaire seraient résistants à la tétracycline (95). De même Mycoplasma hominis peut atteindre plus de 30% de résistance aux tétracyclines dans certaines régions (96) probablement en raison d'une importante utilisation des tétracyclines.

Le phénomène de résistance aux antibiotiques est donc un enjeu mondial autant en médecine vétérinaire qu'humaine. La progression de ce phénomène montre la nécessité de nouvelles méthodes thérapeutiques, par apport de nouvelles molécules antibiotiques et/ou par une utilisation différente et plus adaptée des molécules déjà disponibles. Pour cela, une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de la perte de sensibilité à certains antibiotiques est indispensable.

4.4.2 Mécanimes moléculaires des antibiorésistances

Les mécanismes d'antibiorésistance développés chez les mycoplasmes sont principalement des modifications ou des protections de la cible des molécules antibiotiques. La figure 7 ci-après reprend les principaux grands mécanismes de résistance aux antibiotiques.

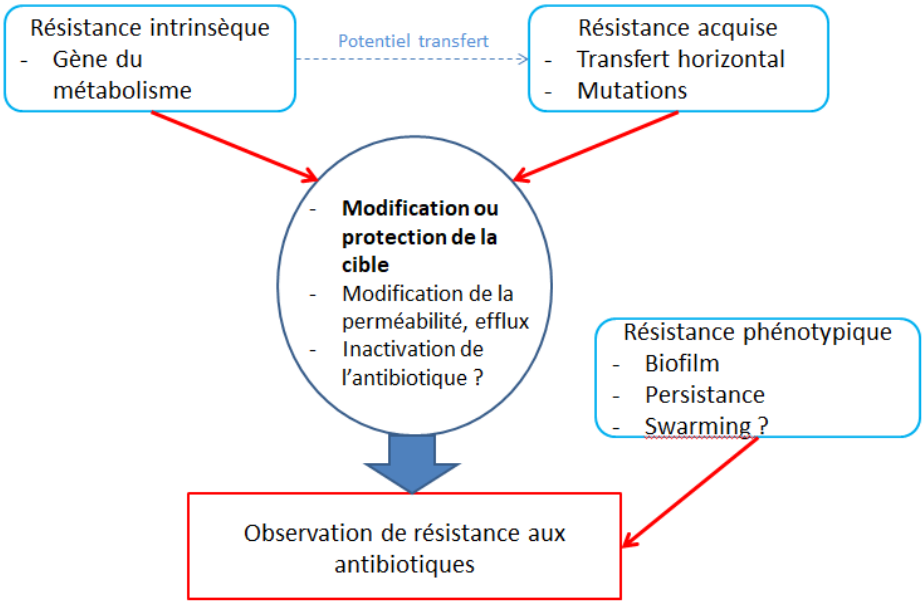


Figure 7 : Résistance génotypique, intrinsèque et acquise, et résistance phénotypique à l'origine de l'observation de résistance aux antibiotiques (Schéma Savatier Camille, d'après Khalil (2017))

4.4.2.1 Résistance des mycoplasmes aux tétracyclines

La résistance acquise de mycoplasmes aux tétracyclines est observée depuis les années 1970 (87) et entrainent progressivement une réduction de l'arsenal thérapeutique. Les taux de résistance observés varient selon l'espèce de mycoplasmes et le pays concerné, probablement en raison de pratiques d'antibiothérapie différentes. Cependant celles-ci sont clairement en augmentation.

Les deux mécanismes moléculaires majeurs expliquant le phénomène de résistance aux tétracyclines sont la modification de l'ARNr 16S, cible de l'action des tétracyclines, et la protection du ribosome par la protéine Tet (M) codée par un transposon d'origine streptococcique (donc un élément génétique mobile !) de la famille Tn916 (36,81). Ces deux types de mutations peuvent être retrouvés dans la même espèce, comme c'est le cas pour *M. hominis* (81).

4.4.2.2 Résistance des mycoplasmes aux macrolides et apparentés

Bien que la plupart des mycoplasmes soient sensibles aux macrolides et apparentés, les résistances à cette famille antibiotique ont augmenté aux cours des dernières décennies (92).

Les mécanismes à l'origine de résistances aux macrolides et apparentés sont la modification de l'ARN 23S (domaines II et V) avec lequel interagissent ces molécules et la modification des gènes codant pour les protéines ribosomiques L4 et L22 (79,81,96,97). Un mécanisme d'efflux de macrolide est aujourd'hui fortement suspecté d'être aussi à l'origine de résistance chez les mycoplasmes, notamment *Mycoplasma pneumoniae* et les uréaplasmes (86,97,98).

La position de la mutation de l'ARN 23S conditionne les molécules antibiotiques auxquelles le mycoplasme sera résistant (79). Par exemple une mutation observée en position 2057 sera à l'origine de résistance aux macrolides à cycles de 14 ou 15 carbones comme l'érythromycine, tandis qu'une mutation en position 2059 entraînera une résistance aux macrolides à cycle de 16 carbones et aux lincosamides (79,99,100).

Rappelons que *M. canis* présente une résistance intrinsèque à l'érythromycine.

4.4.2.3 Résistance des mycoplasmes aux quinolones

La résistance aux fluoroquinolones est un phénomène plus récent et les fluoroquinolones demeurent efficaces sur la plupart des souches résistantes à d'autres antibiotiques comme les macrolides (88). Dans certaines régions du monde, les mycoplasmes humains sont de plus en plus résistants aux fluoroquinolones et ce phénomène a tendance à s'accélèrer notamment au Japon et en Chine (93,101). Une étude récente sur *M. bovis* a permis d'observer *in vitro* une augmentation modérée en 30 ans des CMI50 qui suggèreraient la présence d'une résistance de faible seuil aujourd'hui (97,102).

Les mécanismes moléculaires principalement retrouvés à l'origine de résistance aux fluoroquinolones sont une mutation des séquences ADN des gènes *gyrA* et *gyrB*, *parC* et *parE* codant pour l'ADN-gyrase et la topoisomérase IV (83). Ces mutations semblent plus fréquemment retrouvées chez les uréaplasmes (103,104). L'accumulation de ses mutations et leur position confèreraient une augmentation du niveau de résistance aux fluoroquinolones d'après des études sur les mycoplasmes humains et *M. bovis in vitro* (83,103,105).

Là aussi un mécanisme d'efflux a été observé chez *M. hominis* et suspecté chez les mycoplasmes animaux comme *M. bovis*. Cela expliquerait l'apparition de résistance à faible seuil (81,97).

Toutefois, chez certains mycoplasmes résistants les mécanismes détaillés dans le tableau III ci-après n'ont pas été retrouvés. Cela laisse à penser que tous les mécanismes de résistance ne sont pas encore connus ou du moins qu'ils sont bien plus complexes que ce qui a été découvert jusqu'à aujourd'hui.

La connaissance du support génétique et des mécanismes moléculaires à l'origine d'une perte de sensibilité aux antibiotiques offre un moyen de détection moléculaire des résistances différent de l'antibiogramme difficilement réalisable et interprétable chez les mycoplasmes. Cela pourra de plus permettre à l'avenir de rechercher des mécanismes de résistances similaires chez *Mycoplasma canis*.

Tableau III : Résistances aux fluoroquinolones, tétracyclines et macrolides en lien avec une mutation des gènes cibles (source : Chernova et coll (2016))

Mycoplasma	Antibiotic class	Resistance		Mutations – positions	MIC range in resistant isolates, µg/ml
		in vitro	*in vivo*		
M. pneumoniae	MLSK[a]	+	+	23S rRNA – 2611, 2058, 2059, 2062[b]	64 -> 256 (erythromycin)
	Tetracyclines	+	-	16S rRNA – 968, 1193 (only *in vitro*)	2 (tetracycline)
	Fluoroquinolones	+	-	QRDR[c] *gyr*A – 83[d]; *gyr*B – 426, 447, 466; *par*C – 78, 80, 84; *par*E – 439	2–16 (levofloxacin), 8–128 (ciprofloxacin)
M. hominis	MLSK	+	+	23S rRNA – 2610, 2611, 2057, 2059, 2062	16–64 (clindamycin)
	Tetracyclines	+	+	tet(M)-mediated protection of ribosome; 16S rRNA – 346, 965, 966, 967, 1054 (only *in vitro*)	8 -> 64 (tetracycline), 2–8 (tetracycline)
	Fluoroquinolones	+	+	QRDR *gyr*A – 82, 83, 87, 93; *gyr*B – 450, 453; *par*C – 73, 80; *par*E – 420, 441, 460; Drug efflux (only *in vitro*, enchances MIC of ciprofloxacin and norfloxacin)	2–32 (levofloxacin), 4–8 (ciprofloxacin)
M. genitalium	MLSK	-	+	23S rRNA – 2058, 2059; ribosomal protein L4	16 -> 64 (erythromycin)
	Tetracyclines	-	-	Resistance genes are not determined	ND[f]
	Fluoroquinolones	-	+	QRDR *gyr*A – 83, 87, 96; *gyr*B – 447, 466, *par*C – 78, 79, 80, 84, 94, 100; *par*E – 419, 461	ND
Ureaplasma spp.	MLSK	+	+	Ribosomal protein L4; 23S rRNA – 2056, 2057, 2058. Methylation of rRNA by ermB[e]. Drug efflux mediated by *msr*A, *msr*B, or *msr*D products	64- > 128 (erythromycin)
	Tetracyclines	+	+	tet(M) mediated protection of ribosomes	2 -> 32
	Fluoroquinolones	+	+	QRDR *gyr*A – 83, 95; *gyr*B – 119; *par*C – 80, 84, 123, 134; *par*E – 151, 249, 274	4–32 (levofloxacin)
M. hyorhinis	MLSK	+	+	23S rRNA – 2059 (*in vivo*); 23S rRNA – 2059 (*in vitro*); 23S rRNA – 2597, 2611; 23S rRNA – 2597, 2611	10–100 (tylosin), 25- >100 (lincomycin) > 100 (tylosin) 50 (lincomycin) 100 (tylosn), 50 (lincomycin)
	Tetracyclines	-	+	ND	12.5 (chlortetracycline)
	Fluoroquinolones	-	+	ND	1–4 (enrofloxacin)
M. hyopneumoniae	MLSK	-	+	23S rRNA – 2058	> 64 (lincomycin)
	Tetracyclines	+	+	ND	12.5-≥100 (chlortetracycline)
	Fluoroquinolones	+	+	QRDR *gyr*A – 83; *par*C (*in vivo*) – 80, 84, 116	0.25- >1 (enrofloxacin)
M. bovis	MLSK	+	+	23S rRNA – 748, 2058 (*in vitro*) 23S rRNA – 748, 752, 2058, 2059 (*in vivo*); Ribosomal proteins L4 and L22	>1024 (tylosin), >256 (tilmicosin) 8–1024 (tylosin), 32 – >256 (tilmicosin)
	Tetracyclines	+	+	ND	>32 (oxytetracycline)
	Fluoroquinolones	+	+	QRDR *gyr*A – 81, 83; *par*C – 78, 80, 81, 84	2.5–32 (enrofloxacin)
M. gallisepticum	MLSK	+	+	23S rRNA – 2058, 2059 (*in vivo*); 23S rRNA – 2058, 2503 (*in vitro*)	0.63–5 (tylosin), 1.25-> 10 (tilmicosin) 256–512 (tilmicosin), 256->512 (erythromycin)
	Tetracyclines	+	+	ND	5 ->16 (oxytetracycline)
	Fluoroquinolones	+	+	QRDR *gyr*A – 81, 83, 84, 87; *gyr*B – 426, 464, 465; *par*C – 64, 80, 81, 84; *par*E (*in vitro*) – 420, 463, 467	1–32 (enrofloxacin) 1–10 (enrofloxacin)

[a]MLSK: macrolides, lincosamides, streptogramines, and ketolides.
[b]E. coli numbering system (nucleotide sequence).
[c]QRDR: quinolone resistance determining region
[d]E. coli numbering system (amino acid sequence).
[e]*erm* and efflux macrolide genes were found only in one study [29] and were not detected in the others.

4.4.3 Potentiel de transfert de gène de résistance et santé publique

D'une part, *Mycoplasma canis* est soumis à une pression antibiotique importante au sein de la flore génitale de la chienne et donc des souches résistantes peuvent s'y développer avec des mécanismes de résistance semblables à ceux vu ci-dessus. Ces bactéries pourraient potentiellement être transmises à l'homme, en particulier aux personnes immunodéprimées (à la suite d'une chimiothérapie, d'une greffe, du SIDA) (106).

D'autre part, la présence de gène de résistance au sein des mycoplasmes animaux est susceptible d'entraîner directement une résistance des mycoplasmes humains aux antibiotiques.

Jusqu'à il y a peu de temps, seules deux études datant des années 1980 rapportaient un transfert génétique chez les Mollicutes. Barroso et Labarère ont d'abord mis en évidence *in vitro* en 1988 l'existence d'un transfert génétique de résistance par contact chez un mollicutes pathogène du citronnier, *Spiroplasma citri* (107). Ces mollicutes sont certes différents des mycoplasmes animaux étudiés mais ces derniers présentent les mêmes capacités de fusion membranaire que les spiroplasmes qui semblent être un élément essentiel au transfert génétique. Roberts and Kenny (108) ont montré le transfert *in vitro* du transposon Tn916 porteur du gène TetM de résistance à la tétracycline depuis *Enterococcus faecalis* vers *Mycoplasma hominis*. Ils mettent ainsi en évidence la possibilité de conjugaison des mycoplasmes avec des bactéries gram positive.

En 2014, une étude de Dordet Frisoni et al (109) montre la possibilité d'un transfert génétique horizontal entre mycoplasmes ruminants de souches différentes chez *M. agalactiae*, puis d'espèces différentes proches et partageant la même niche (*M. agalactiae* et *M. bovis*). Cette même étude a montré que la totalité du génome de *M. agalactiae* pouvait être mobile.

Enfin en 2019, l'étude de Faucher et al.(110) a montré la transmission horizontale de gènes de résistances à l'enrofloxacine chez *Mycoplasma agalactiae*. Cela explique en partie la rapidité du développement de résistances par les mycoplasmes.

L'étude de ce transfert génétique entre des mycoplasmes d'espèces plus éloignées et de niches supposées différentes pourrait être utile. Si cela s'avérait possible, alors la proximité des mycoplasmes animaux résistants aux antibiotiques et des mycoplasmes humains faciliterait le transfert de résistances aux antibiotiques vers les mycoplasmes humains.

C'est pour ces raisons qu'il est essentiel d'avancer dans nos connaissances sur les mycoplasmes canins dont *Mycoplasma canis*, afin de mieux (ou moins ?) traiter et de limiter l'apparition de résistance qui représente un danger direct pour notre santé.

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

Les mycoplasmes, appartenant à la classe des Mollicutes, sont des bactéries dénuées de paroi, de petite taille et possédant un génome réduit. Ils sont considérés comme la plus petite unité autoréplicante. Leur besoin nutritif important en raison d'une faible capacité de synthèse, leur relative fragilité et un mode de multiplication plus lent que les autres bactéries rendent leur culture plus exigeante avec notamment l'utilisation de milieux spéciaux.

Les mycoplasmes génitaux présentent différentes propriétés qui constituent leur pouvoir pathogène. En effet ils sont capables d'adhérer aux cellules hôtes, de les envahir voir de fusionner avec pour certains. Leur capacité à moduler la réponse immunitaire et l'importante variabilité antigénique qu'ils présentent expliquent que la réponse immunitaire de l'organisme hôte soit souvent inadaptée.

Bien que de nombreux arguments soient en faveur, le rôle pathogène des mycoplasmes canins urogénitaux dans l'infertilité n'a pas été démontré. Celui-ci étant fortement suspecté, il est toutefois pris en compte dans la démarche diagnostique de l'infertilité canine. Le diagnostic des mycoplasmoses vaginales de la chienne passe aujourd'hui par des écouvillonnages vaginaux afin de réaliser des cultures de mycoplasmes. Le diagnostic est alors rarement quantitatif, ce qui pose problème puisque les mycoplasmes étudiés sont commensaux de la flore vaginale de la chienne. Le traitement actuel des mycoplasmoses consiste en un traitement antibiotique (tétracyclines, macrolides ou fluoroquinolones) sur au minimum deux semaines. L'apparition de résistances aux antibiotiques a été constatée en médecine humaine et bovine. Malheureusement, il n'existe pas encore de diagnostic de routine pour détecter de potentielles résistances aux antibiotiques en raison des conditions particulières de culture des mycoplasmes.

Il devient donc urgent de limiter l'apparition de ces résistances. Pour cela, nos connaissances des mycoplasmes canins et de leur pathogénicité doivent être approfondies. En effet les données disponibles à ce sujet sont rares. Or elles sont indispensables pour mieux, voire moins, traiter les mycoplasmoses vaginales chez la chienne et ainsi limiter les antibiorésistances. L'amélioration des moyens diagnostiques constitue une première étape dans cette quête de la connaissance.

DEUXIEME PARTIE : MISE EN PLACE ET EVALUATION D'UNE PCR QUANTITATIVE MYCOPLASMA CANIS

Les mycoplasmes canins et leur impact sur la fertilité sont des sujets encore peu étudiés. Leur rôle pathogène est peu connu et pourtant ils sont à l'origine de traitements antibiotiques. Ces traitements, faute de données scientifiques, font l'objet de quelques consensus qui sont aujourd'hui discutés. C'est pourquoi il semble essentiel d'obtenir plus de données sur ces mycoplasmes canins, dont *Mycoplasma canis*, afin de mieux les appréhender et de mieux les traiter tout en considérant les problématiques de santé publique soulevées par l'apparition de résistances aux antibiotiques.

Le travail exposé dans cette partie a été essentiellement réalisé sur le campus de VetAgro Sup au sein du CERREC, du LVD 69 et de l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants, avec l'aide de l'ANSES.

1 Diagnostic et traitement actuels des mycoplasmoses génitales de la chienne

Les prélèvements sont effectués au sein du CERREC lors du suivi de chaleurs (1er ou 3ème jour) chez une chienne présentant des antécédents d'infertilité, d'avortement ou de mort-natalité. Deux écouvillons sont réalisés, un pour la réalisation d'une bactériologie et un autre pour la réalisation d'une culture de mycoplasmes. Le milieu de transport des mycoplasmes est identique au milieu de culture. Le matériel de prélèvement utilisé au CERREC est illustré ci-dessous (fig. 8).

A : Ecouvillons pour bactériologie classique
B : Ecouvillon simple pour culture de mycoplasmes et
C : Milieu de culture pour mycoplasmes fourni par Indicia Biotechnologies

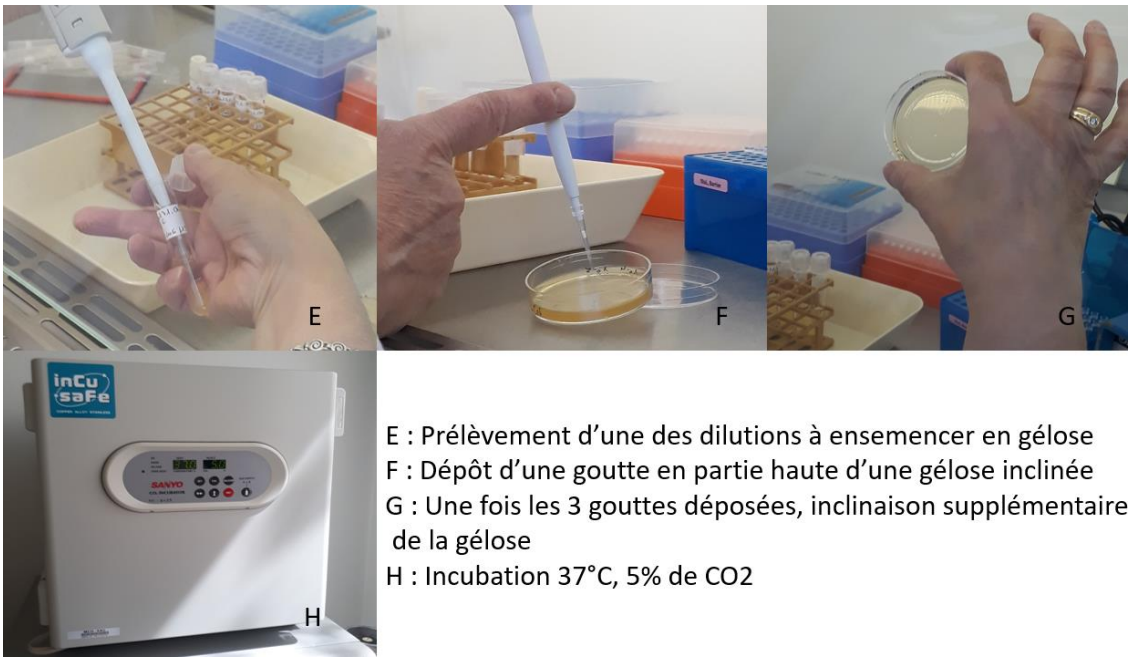
Figure 8 : Matériel d'écouvillonnage vaginal (photos Savatier Camille)

Après écouvillonnage vaginal, le diagnostic est actuellement réalisé par cultures de mycoplasmes auprès de l'UMR Mycoplasmose des Ruminants sur le campus de VetAgro Sup. La proximité du CERREC et de l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants permet une mise en culture dans les plus brefs délais.

Le milieu de culture utilisé est un bouillon spécifique à la culture de mycoplasmes contenant des facteurs de croissance nécessaires ainsi que des agents inhibiteurs bactériens et fongiques. Il est fabriqué par Indicia Biotechnologies. Six dilutions sont réalisées (10^{-1} à 10^{-6}) à partir de l'échantillon puis sont mises à incuber dans une étuve à 37°C avec une atmosphère de 5% de CO_2. L'apparition d'une turbidité est observée en moyenne au bout de 3 à 4 jours. L'avant dernière dilution turbide, la dernière dilution turbide et la suivante servent ensuite à ensemencer en goutte roulante des milieux gélosés spécifiques produits par Indicia Biotechnologies. Les géloses sont mises à incuber dans les mêmes conditions. Les colonies poussent ensuite en quelques jours (2 à 3 jours en moyenne) et leur observation en forme d'œuf au plat permet de valider la présence de mycoplasmes à la dilution correspondante. Cette technique permet une appréciation semi-quantitative du titre en mycoplasmes. Les différentes étapes sont illustrées par les figures 9 et 10 ci-après.

A : Réalisation de six dilutions au dixième (10^-1 à 10^-6)
B et C : Incubation à 37°C avec atmosphère 5% de CO_2
D : Turbidité jusqu'à la dilution 10^-4

Figure 9 : Réalisation de dilution en bouillon et mise en culture à l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants (photos Savatier Camille)



E : Prélèvement d'une des dilutions à ensemencer en gélose
F : Dépôt d'une goutte en partie haute d'une gélose inclinée
G : Une fois les 3 gouttes déposées, inclinaison supplémentaire de la gélose
H : Incubation 37°C, 5% de CO2

Figure 10 : Ensemencement en milieu gélosé selon la technique de la goutte roulante (photos Savatier Camille)

Le diagnostic est obtenu en 7 à 10 jours environ. L'écouvillonnage étant réalisé en pro-oestrus ou début d'oestrus, le diagnostic, s'il est en faveur d'une mycoplasmose, est obtenu suffisamment tôt pour mettre en place un traitement autour de l'insémination ou de la saillie.

L'identification de l'espèce de mycoplasmes n'est pas réalisée à l'UMR dans le cadre du diagnostic.

Depuis le travail d'O. Martin en 2001 en partenariat avec le CERREC et l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants (16), un résultat supérieur à 10^4 UFC / échantillon est à l'origine d'un traitement antibiotique à l'aide de josamycine 25 mg/kg PO BID sur 3 semaines.

Cependant depuis 2001, les attentes sociétales, la réglementation de l'utilisation des antibiotiques et les enjeux de santé publique ont changé. En effet, la josamycine ne présente pas d'AMM vétérinaire. La lyncomycine présentant une indication de traitement des mycoplasmoses chez le chien, le principe de cascade imposerait donc l'utilisation de la lyncomycine plutôt que celle de la josamycine. Cependant les données d'embryotoxicité n'étant pas fournie pour la lyncomycine, il est difficile de l'utiliser en reproduction. Ces questionnements découlent du manque de données concernant les mycoplasmoses canines et leur traitement.

2 Pourquoi mettre en place une PCR quantitative *Mycoplasma canis* au sein du campus Vetagro Sup

2.1 Pourquoi une PCR ?

La technique de PCR permet un diagnostic rapide et de moins en moins coûteux. Dans le cas des mycoplasmoses, la PCR représente une alternative très intéressante à la culture qui nécessite parfois plusieurs semaines et des milieux spéciaux.

L'obtention d'un résultat en quelques jours plutôt qu'en quelques semaines permet une prise en charge optimale de la mycoplasmose. En effet, dans l'attente des résultats d'examens complémentaires, un premier traitement antibiotique probabiliste est souvent mis en place dès la première consultation face à l'insistance des propriétaires. Ce traitement n'est pas toujours adapté à la lutte contre les mycoplasmoses, voire les favorise. L'utilisation de la PCR et donc l'obtention d'un résultat rapide pourraient ainsi permettre d'attendre un diagnostic avant la mise en place de l'antibiothérapie qui serait alors mieux adaptée.

La facilité de diagnostic permise par la PCR favoriserait la recherche plus fréquente de mycoplasmose lors d'infertilité, diminuant ainsi les traitements à l'aveugle, souvent réalisés par l'éleveur lui-même. Et de fil en aiguille, une meilleure pratique de l'antibiothérapie et une réduction des résistances aux antibiotiques pourrait ainsi être obtenues.

2.2 Pourquoi une PCR quantitative ?

Comme dit plus tôt, *Mycoplasma canis* fait partie de la flore commensale vaginale et de nombreuses chiennes fertiles en sont donc porteuses. Une simple PCR reviendrait très fréquemment positive pour *Mycoplasma canis* sans pour autant impliquer une infertilité. Aujourd'hui, certains vétérinaires s'appuient sur une PCR point final pour la justification d'un traitement antibiotique des mycoplasmoses. Malheureusement, à travers l'effet anti-inflammatoire de certains antibiotiques comme les macrolides (82), des résultats cliniques sont obtenus et encouragent ces pratiques.

Or la notion de charge est très importante. Comme étudié par O. Martin et P. Mimouni, il existerait un seuil de pathogénicité défini pour les cultures de mycoplasmes. La simple détection de mycoplasmes ne justifie alors plus l'antibiothérapie. C'est ce qui motive la mise en place d'une PCR quantitative. On obtiendrait ainsi facilité et rapidité de diagnostic tout en conservant la notion de seuil de pathogénicité.

La redéfinition d'un seuil de pathogénicité est nécessaire dans un premier temps pour pouvoir, par la suite, diagnostiquer par PCR des mycoplasmoses vaginales à l'origine d'infertilité. Ce nouveau moyen diagnostic permettrait de faire face à l'utilisation inadaptée de l'antibiothérapie.

2.3 Pourquoi une PCR quantitative spécifique de Mycoplasma canis ?

D'après P. Mimouni, les mycoplasmoses ont un rôle dans l'infertilité. Or *Mycoplasma canis* est la principale espèce de mycoplasmes de la flore vaginale. Elle représente 63% des isolements, d'après Maksimovic et coll. (33). Les travaux menés par O. Martin se concentrent principalement sur cette espèce qui a été retrouvée en quantité importante chez des chiennes infertiles. Souhaitant réaliser une thèse dans la continuité du travail d'O. Martin en 2001, il m'est apparu essentiel de m'intéresser à *Mycoplasma canis* plus particulièrement.

3 Mise en place de la PCR quantitative *Mycoplasma canis*

3.1 Mise en relation et rôle des principaux acteurs

Mettre en place une PCR quantitative nécessite des compétences variées et des financements. Chaque acteur impliqué a apporté une expertise et des moyens nécessaires à la réalisation du projet de PCR quantitative *Mycoplasma canis*.

Le CERREC a été la première entité impliquée dans ce projet. Leur expertise en matière d'infertilité est indispensable au questionnement autour de cette thèse, pour une meilleure exploitation des résultats et pour la future conduite d'études qui pourrait être permises par la PCR quantitative *Mycoplasma canis*. Le CERREC est aussi une source de matériel biologique avec la réalisation d'écouvillons vaginaux de chiennes fertiles et infertiles.

L'UMR Mycoplasmose des Ruminants, partenaire depuis longtemps du CERREC, permet jusqu'à aujourd'hui de diagnostiquer les mycoplasmoses par mise en culture et semi-quantification. En 2000, O. Martin avait travaillé en étroite collaboration avec l'UMR Mycoplasmose des Ruminants dans la détermination d'un seuil de pathogénicité de *Mycoplasma canis*. Il est donc apparu naturel de poursuivre cette collaboration et de profiter de leur expertise en matière de mycoplasmes.

L'ANSES a montré un intérêt pour ce projet avec le souhait de le développer et d'éventuellement étudier par la suite des profils d'antibiorésistance. La production de données plus récentes sur les mycoplasmoses chez les carnivores domestiques représente un enjeu commun.

Le LVD 69 a apporté l'expertise technique pour la mise en place de la PCR quantitative *Mycoplasma canis*. Ce sont eux qui aujourd'hui hébergent la PCR.

Ce projet de thèse a donc été l'occasion de prises de contact avec différents acteurs. L'organisation de réunions et la mise en relation des différents organismes ont été très enrichissantes sur le plan professionnel. Le caractère chronophage de cette étape a entrainé une modification du projet initial de thèse qui comportait une étude clinique sur des chiennes fertiles et infertiles consultant au CERREC.

3.2 Recherche d'un kit commercial

Après de nombreuses recherches sur les séquences utilisées par les PCR spécifiques de mycoplasmes, un kit commercial a été repéré. Il s'agit de l'AmpliTest *Mycoplasma canis.* Plusieurs problèmes se sont alors posés. Le premier est la provenance polonaise du kit qui

entraîne une marge de manœuvre réduite si le kit s'avère ne pas être fonctionnel au sein du campus VetAgro Sup. Le deuxième est la nécessité d'un matériel compatible au sein du campus. Le troisième est le manque d'expertise avec ce kit et qui implique un délai supplémentaire dans la recherche du fonctionnement optimal. En l'absence d'alternative, ce kit a été commandé. La notice du kit AmpliTest Mycoplasma canis est consultable en annexe 1.

3.3 Validation de la PCR quantitative à Mycoplasma canis

3.3.1 Matériel et méthodes

Les échantillons d'ADN utilisés pour tester le kit PCR AmpliTest *Mycoplasma canis* sont d'origines différentes (cf Tab IV, V et VI ci-après). Certains ADN ont été fournis par l'ANSES après purification et quantification. D'autres échantillons ADN ont été extraits d'échantillons prélevés directement par écouvillonnage vaginal ou oropharyngé sur des chiennes et des chattes, puis identifiés par PCR point final *Mycoplasma spp* et séquençage. D'autres enfin sont issus de cultures pure fournies par l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants. Les extractions ADN ont été réalisées à l'aide du kit d'extraction manuelle NucleoSpin® RNA Virus de chez Macherez Nagel.

Les différentes espèces testées sont *M. canis, M. spumans, M. edwardii, M. arginini, M. gateae, M. felis, M. feliminutum, M. opalescens, M. bovirhinis, Acheloplasma laidlawii, M. arthritis, M. pulmonis, M. edwardii, M. bovis, M. molare* et *M. bovigenitalium*

Ces 16 espèces de mollicutes ont été utilisées pour tester la spécificité du kit PCR AmpliTest.

L'échantillon ADN de *Mycoplasma canis* fourni par l'ANSES a été dosé à 38ng/µL pour 10 µL. La réalisation d'une gamme de dilution au dixième était prévue pour étalonner et déterminer la limite de détection de la PCR AmpliTest *Mycoplasma canis*. Les autres ADN fournis par l'ANSES ont été dosés entre 1 et 7 ng/µL pour 10µL.

Le mix réactionnel a été dilué avec l'eau fournie comme recommandé par le fournisseur Amplicon. Le ROX pour la normalisation de la fluorescence n'ayant pas été fourni avec le kit AmpliTest *Mycoplasma canis*, celui utilisé par le LVD 69 a été dilué au 1/500ème et ajouté au mix réactionnel à hauteur de 1/50ème du volume de mix réactionnel dilué nécessaire à l'analyse PCR. Dans chaque capillaire de réaction, 15 µL de mix réactionnel et 5 µL d'ADN à tester ou de contrôle positif ou négatif ont été déposés.

Les tests PCR ont été réalisés à l'aide d'un cycleur Stratagene Mx3005P au sein du LVD 69. La dénaturation initiale se fait à 95°C pendant 5 minutes. Puis 45 cycles d'amplification ont

été réalisés (10 secondes à 95°C et 25 secondes à 58°C) avec lecture de la fluorescence à chaque fin de cycle. Enfin, les mix ont été refroidis entre 30 et 40°C pendant 30 secondes.

Trois sessions de manipulations ont été réalisées. La première a été réalisée pour obtenir un premier aperçu de la PCR, la deuxième pour tester les échantillons d'ADN fournis par l'ANSES, et la troisième pour élargir la gamme d'espèces de mycoplasmes testées et varier les origines des ADN testés, plus proches de l'utilisation faite en diagnostic de routine.

3.3.2 Résultats

Les courbes obtenues à l'issue des trois séries de manipulations (cf figures 11 à 13) montrent une fluorescence pour le contrôle positif et une absence de fluorescence pour le contrôle négatif. Les manipulations sont donc validées. Un résultat positif est obtenu pour l'ADN de *Mycoplasma canis* qui est donc bien amplifié par le kit PCR AmpliTest Mycoplasma canis. Cependant, des résultats positifs ont aussi été obtenus pour *M. arthritidis, M. edwardii, M. spumans, M. felis, M. molare* et *M. arginini.*

Les courbes obtenues pour *M. canis, M. felis et M. spumans* (manipulation n°1) sont caractéristiques. En revanche les courbes obtenues pour *M. edwardii, M. molare et M. spumans* (manipulation n°2) sont plus « plates » et résulteraient plutôt d'une hybridation aspécifique des amorces. Enfin les courbes obtenues pour *M. athritidis, M. edwardii* (manipulation n°3) et *M. arginini* sont très faiblement positives et le niveau de fluorescence à peine supérieur au seuil de bruit de fond.

Les tableaux IV à VI récapitulent pour chaque échantillon son origine, la méthode d'identification utilisée, le résultat obtenu lors de la qPCR et le commentaire de la courbe.

La gamme de dilution d'ADN de *Mycoplasma canis* n'a pas été réalisée en raison des résultats précédents. En effet la faible spécificité de la qPCR à première vue a entraîné l'arrêt des manipulations. La limite de détection n'a donc pas été déterminée.

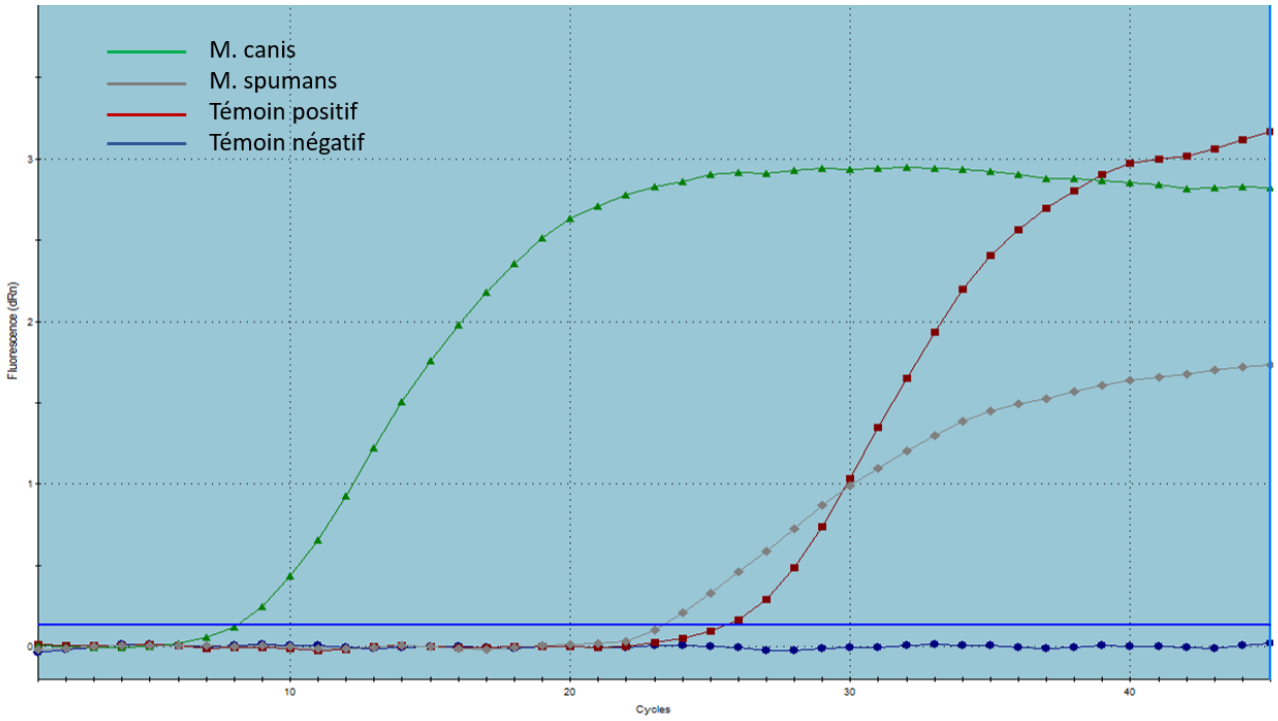


Figure 11 : Courbes obtenues à l'issue de la manipulation n°1 (graphique, source : LVD 69)

Tableau IV : Résumé des résultats obtenus lors de la manipulation n°1

ADN testé	**M. canis**	**M. spumans**
Prélèvement d'origine	colonie	Ecouvillon vaginal
Méthode d'identification	PCR Mycoplasma spp. et séquençage ARN 16S	PCR Mycoplasma spp. et séquençage ARN 16S
Résultat qPCR M. canis	POS	POS
Commentaire	Courbe caractéristique	Courbe caractéristique

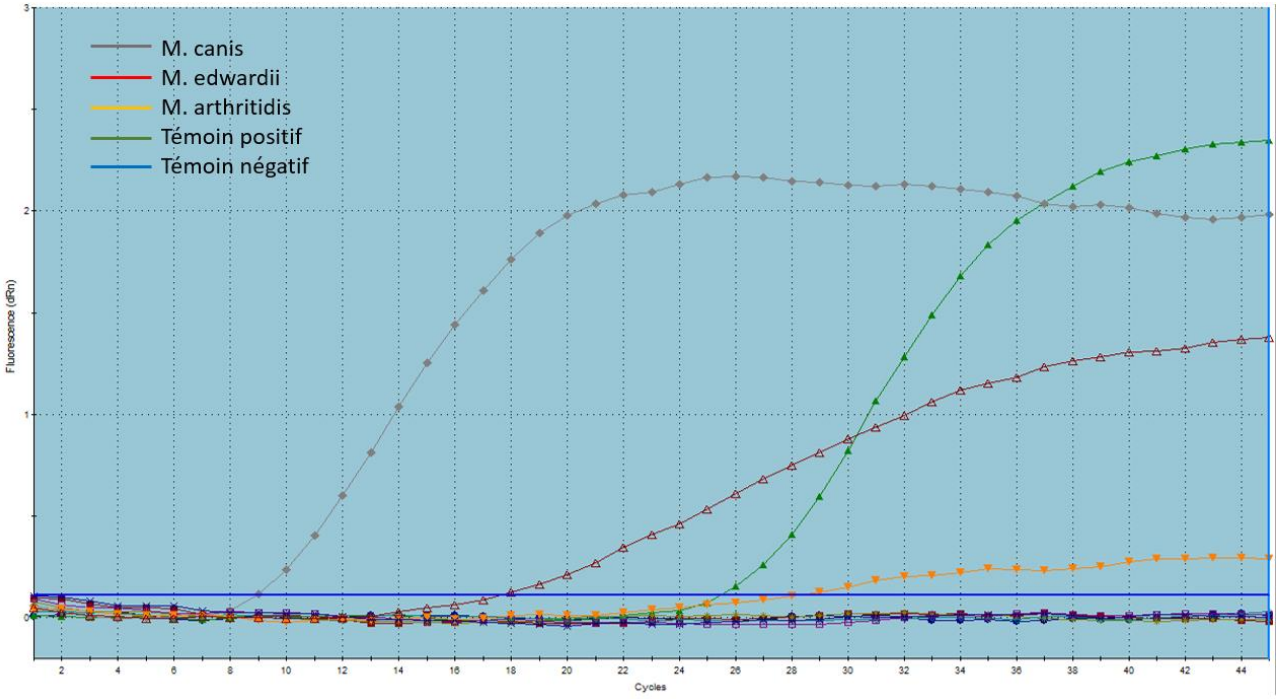


Figure 12 : Courbes obtenues à l'issue de la manipulation n°2 (graphique, source LVD 69)

Tableau V : Résumé des résultats obtenus lors de la manipulation n°2

ADN testé	**M. bovirhinis**	**A. laidlawii**	**M. feliminutum**	**M. arthritidis**
Prélèvement d'origine	Culture pure	Culture pure	A partir d'un lyophilisat	Culture pure
Méthode d'identification	Séquençage de l'ARN 16S	Séquençage de l'ARN 16S	Séquençage de l'ARN 16S	Séquençage de l'ARN 16S
Résultat qPCR M. canis	NEG	NEG	NEG	POS
Commentaire		Peut être considérée négative si on remonte le seuil de bruit de fond		
ADN testé	**M. pulmonis**	**M. edwardii**	**M.bovis**	**M. canis**
Prélèvement d'origine	A partir d'un lyophilisat	Préculture d'un échantillon clinique	Culture pure	Culture pure
Méthode d'identification	Séquençage de l'ARN 16S	Séquençage de l'ARN 16S	Séquençage de l'ARN 16S	Séquençage de l'ARN 16S
Résultat qPCR M. canis	NEG	POS	NEG	POS
Commentaire		Courbe plate probablement due à une accroche aspécifique des amorces		Courbe caractéristique Echantillon destiné à la réalisation de dilution

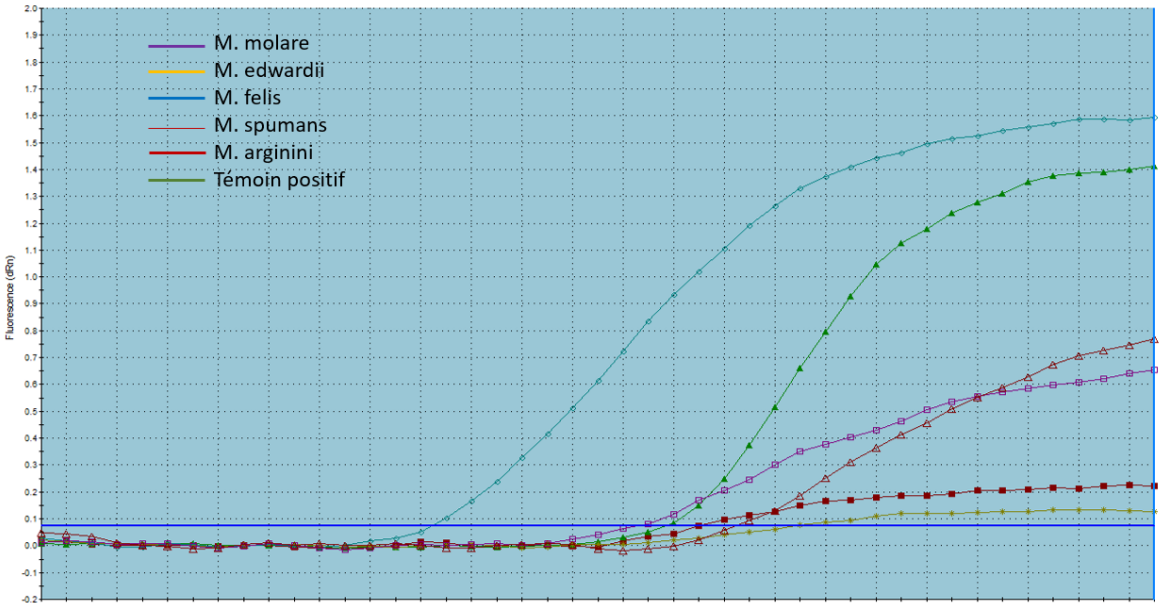


Figure 13 : Courbes obtenues à l'issue de la manipulation n°3 (graphique, source LVD 69)

Tableau VI : Résumé des résultats obtenus lors de la manipulation n°3

ADN testé	**M. edwardi**	**A. felis**	**M. molare**	**M. opalescens**
Prélèvement d'origine	Ecouvillon oropharyngé	Culture souche de référence	Culture souche de référence	Culture souche de référence
Méthode d'identification	PCR Mycoplasma spp. et séquençage de l'ARN 16S	Non réalisée	Non réalisée	Non réalisée
Résultat qPCR M. canis	POS	POS	POS	NEG
Commentaire	Peut être considérée négative si on remonte le seuil de bruit de fond	Courbe caractéristique	Courbe plate probablement due à une accroche aspécifique des amorces	
ADN testé	**M. bovigenitalium**	**M. spumans**	**M. arginini**	**M. gateae**
Prélèvement d'origine	Culture souche de référence	Culture souche de référence	Ecouvillon oropharyngé	Ecouvillon oropharyngé
Méthode d'identification	Non réalisée	Non réalisée	PCR Mycoplasma spp. et séquençage de l'ARN 16S	PCR Mycoplasma spp. et séquençage de l'ARN 16S
Résultat qPCR M. canis	NEG	POS	POS	NEG
Commentaire		Courbe plate probablement due à une accroche aspécifique des amorces	Peut être considérée négative si on remonte le seuil de bruit de fond	

3.3.3 Discussion

La séquence ciblée par le kit de qPCR AmpliTest *Mycoplasma canis* est inconnue. Certaines espèces de mycoplasmes à l'origine d'un résultat positif sont proches phylogénétiquement de *Mycoplasma canis* (*M. edwardii, M. felis*) (cf figure 1). On peut donc penser que la séquence ciblée est une séquence conservée et partagée par ces espèces proches. Pour approfondir cette idée, il aurait pu être intéressant de tester *M. cynos* qui est proche phylogénétiquement et présent dans la flore génitale de la chienne. Mais d'autres espèces de mycoplasmes (*M. spumans, M. arginini, M. gateae, M. molare*), plus éloignées dans l'arbre phylogénétique de *M. canis* mais proches entre elles, sont aussi à l'origine de résultats positifs. Ce résultat remet en cause l'hypothèse précédente.

Le manque de spécificité apparent à la suite de cette étude pourrait s'expliquer par :

- de potentielles contaminations au cours des manipulations. Cette hypothèse semble peu probable aux vues du nombre important de contaminations qu'il faudrait, de la qualification du personnel réalisant les manipulations et des précautions prises contre ces contaminations (cônes de pipette filtrés, séparation géographique des différentes manipulations, ouverture et fermeture de chaque tube individuellement) ;

- des échantillons d'ADN non purs en particulier pour le matériel issu d'écouvillonnage. L'identification réalisée ne permet pas de garantir la pureté de l'échantillon ;

- une hybridation aspécifique des amorces.

Il paraît donc plus probable que le kit PCR AmpliTest *Mycoplasma canis* est peu spécifique de *Mycoplasma canis*. Or ce kit est vendu comme tel et est peut-être actuellement utilisé par certains laboratoires tel quel avec de nombreux faux positifs.

Les nombreux faux positifs obtenus lors des 3 sessions de manipulations n'ont pas permis à ce jour de valider la PCR quantitative spécifique à *Mycoplasma canis*.

4 Perspectives

Des modifications pourraient être apportées à la PCR comme la redéfinition du seuil de bruit de fond. Toutefois, ces modifications ne permettraient pas d'obtenir une PCR suffisamment spécifique et robuste. La recherche d'amorces plus spécifiques en partenariat avec Amplicon, d'un autre kit commercialisé ou sa création *ex-nihilo* doit être envisagée. Si la spécificité et la robustesse de la PCR alors obtenue sont satisfaisantes, l'établissement d'un seuil de pathogénicité par l'étude de la charge en *Mycoplasma canis* chez les chiennes fertiles et infertiles représente l'étape suivante. Cette étude a déjà été prédessinée mais n'a malheureusement pas encore pu voir le jour.

L'étude des souches de *M. canis* présentes au sein de la flore vaginale de chiennes fertiles et infertiles peut constituer un angle d'approche différent de celui du seuil de pathogénicité. En effet d'après les travaux de Michaels et al. publiés en 2016 (2), les différentes souches de *M. canis* ne présentent pas les mêmes facteurs de virulence, ni le même tropisme. Cela pourrait notamment expliquer qu'avec une même charge en mycoplasmes, certaines chiennes soient infertiles alors que d'autres ne le sont pas.

Pour les mêmes raisons, l'étude d'autres espèces de mycoplasmes canins fréquemment retrouvés, comme *Mycoplasma cynos* dont la pathogénicité pour le tractus respiratoire est reconnue ou *Mycoplasma spumans* qui est fréquemment isolé par le LVD 69, permettrait une approche plus complète des mycoplasmes en médecine vétérinaire.

Si la PCR quantitative spécifique de *M. canis* venait à être mise en place, la recherche d'autres sondes spécifiques de mycoplasmes canins différents pourrait aboutir sur une variété de PCR quantitatives de mycoplasmes, voire même la mise en place d'une PCR quantitative multiplex. Cela permettrait d'étudier différentes espèces de mycoplasmes au sein d'un même échantillon et pourrait constituer une nouvelle piste de recherches.

Un autre indicateur éventuellement plus précis pour refléter la charge de parasitisme par les mycoplasmes serait l'étude du ratio mycoplasmes / cellules vaginales comme cela a été fait pour *Mycoplasma genitalium* chez des femmes (111). Ce ratio a notamment été étudié grâce à l'élaboration d'une PCR multiplex permettant de quantifier les mycoplasmes et les cellules vaginales.

Par l'établisssement de la PCR quantitative et l'étude de *Mycoplasma canis* dans des populations fertiles et infertiles, une récolte de matériel biologique est facilitée. Ce matériel biologique pourrait être utile pour la production de données sur *Mycoplasma canis* et l'étude des profils d'antibiorésistance retrouvés au sein des mycoplasmes canins. Ces nouvelles données pourraient être prises en compte par les réseaux de surveillance ResaPath ou Vigimyc.

Dans la continuité de l'étude des résistances aux antibiotiques, il peut être intéressant d'évaluer l'utilisation des E-test chez les mycoplasmes canins. Si ceux-ci se révèlent pertinents, leur utilisation en routine pourrait permettre de palier à l'absence actuelle d'antibiogrammes pour les mycoplasmes.

Enfin ces données et ces moyens d'étude pourraient permettre l'évaluation de traitements des mycoplasmoses et ainsi de proposer des recommandations thérapeutiques chez le chien. L'antibiothérapie serait alors mieux adaptée et l'apparition de résistance limitée.

CONCLUSION

Les mycoplasmes canins commensaux de la flore génitale de la chienne sont encore peu étudiés. Ceux-ci sont capables de coloniser et d'envahir les cellules hôtes, de moduler la réponse immunitaire et créer un environnement inflammatoire ainsi que de présenter une grande variabilité antigénique. La réponse immunitaire de l'hôte à leur encontre est alors souvent inefficace et explique le caractère chronique des infections mycoplasmiques. Leur rôle pathogène dans l'infertilité de la chienne, bien que fortement suspecté, est encore méconnu et non démontré.

Les mycoplasmoses vaginales sont prises en compte dans le diagnostic différentiel de l'infertilité canine ; leur diagnostic est réalisé par culture avec éventuellement une numération semi-quantitative. L'obtention d'une charge importante en mycoplasmes motive souvent une antibiothérapie d'au moins deux semaines chez les chiennes reproductrices. Les principales familles antibiotiques alors utilisées sont les tétracyclines, les macrolides et les fluoroquinolones. Face à l'émergence de résistances aux antibiotiques objectivées en médecine humaine et bovine, il nous a semblé primordial d'approfondir nos connaissances sur ces bactéries en médecine des carnivores, d'une part pour mieux comprendre leur implication dans l'infertilité, et d'autre part pour améliorer la prise en charge thérapeutique et limiter ainsi l'apparition de résistances aux antibiotiques.

Nous avons choisi de contribuer à l'amélioration des méthodes diagnostiques disponibles et leur précision. C'est ce qui a motivé l'utilisation d'une PCR quantitative spécifique de *Mycoplasma canis*, principale espèce de mycoplasmes retrouvée dans la flore vaginale des chiennes. La mise en relation de plusieurs acteurs (ANSES, LVD 69, CERREC et UMR Mycoplasmose des Ruminants) nous a permis d'évaluer les performances et la spécificité d'un kit commercial (*AmpliTest Mycoplasma canis*) au sein du LVD 69. Malheureusement le manque de spécificité de ce kit ne nous a pas permis de poursuivre les études envisagées. Malgré ces résultats non concluants, la recherche sur les mycoplasmes génitaux canins doit être poursuivie car elle représente aujourd'hui un enjeu de santé publique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Baseman JB, Tully JG. Mycoplasmas : sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. Emerg Infect Dis. 1997;3(1):21-32.

2. Michaels DL, Leibowitz JA, Azaiza MT, Shil PK, Shama SM, Kutish GF, et al. Cellular Microbiology of Mycoplasma canis. Infect Immun. 2016;84(6):1785-95.

3. Cordova CMM, Hoeltgebaum DL, Machado LDPN, Santos LD. Molecular biology of mycoplasmas : from the minimum cell concept to the artificial cell. An Acad Bras Ciênc. 2016;88(suppl 1):599-607.

4. Razin S, Herrmann R. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Springer Science & Business Media; 2007. 574 p.

5. Freundt EA. Principles of Mycoplasma classification and taxonomy. In: Methods in Mycoplasmology V1 : Mycoplasma Characterization. Academic Press. Razin S., Tully J. G.; 1983. p. 9-13.

6. Chalker VJ. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54(2):537-42.

7. Chalker VJ. Canine mycoplasmas. Res Vet Sci. 2005;79(1):1-8.

8. Rosenbusch RF. Biology and Taxonomy of the Mycoplasmas. In: Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis. Iowa Stata University Press; 1994.

9. Brown DR, May M, Michaels DL, Barbet AF. Genome Annotation of Five Mycoplasma canis Strains. J Bacteriol. 2012;194(15):4138-9.

10. Del Missier M. Influence, diagnostic et traitement des infections par les mycoplasmes en reproduction canine : comparaison avec les données acquises dans les espèces humaine et bovine [Internet] [Thèse]. 2008. Disponible sur: http://alex.vetagro-sup.fr/Record.htm?idlist=5&record=19388085124911062679

11. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(4):1094-156.

12. Tarshis M, Salman M, Rottem S. Cholesterol is required for the fusion of single unilamellar vesicles with Mycoplasma capricolum. Biophys J. 1993;64(3):709-15.

13. Razin S. The mycoplasmas. Microbiol Rev. 1978;42(2):414-70.

14. Miyata M, Ogaki H. Cytoskeleton of Mollicutes. J Mol Microbiol Biotechnol. 2006;11(3-5):256-64.

15. Trachtenberg S. Mollicutes. Curr Biol. 2005;15(13):483, 484.

16. Martin O. La microflore vaginale de la chienne : synthèse bibliographique et étude spéciale de l'infection à Mycoplasma canis [Internet] [Thèse]. 2001. Disponible sur: http://alex.vetagro-sup.fr/Record.htm?idlist=1&record=19137621124919558039

17. McAuliffe L. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. Microbiology. 2006;152(4):913-22.

18. Whitford HW, Rosenbush RF. Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis. 5ème. Ames: Iowa State University Press; 1994.

19. Rottem S. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells. Physiol Rev. 2003;83(2):417-32.

20. Rottem S, Naot Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. Trends Microbiol. 1998;6(11):436-40.

21. Tsai S, Wear DJ, Shih JW, Lo SC. Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. Proc Natl Acad Sci. 1995;92(22):10197-201.

22. Zhang B, Shih JW, Wear DJ, Tsai S, Lo SC. High-level expression of H-ras and c-myc oncogenes in mycoplasma-mediated malignant cell transformation. Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N. 1997;214(4):359-66.

23. Feng S-H, Tsai S, Rodriguez J, Lo S-C. Mycoplasmal Infections Prevent Apoptosis and Induce Malignant Transformation of Interleukin-3-Dependent 32D Hematopoietic Cells. Mol Cell Biol. 1999;19(12):7995-8002.

24. Debeyt M, Ross R. Ciliostasis and Loss of Cilia Induced by Mycoplasma hyopneumoniae in Porcine Tracheal Organ Cultures. 1994;62:7.

25. Izutsu KT, Fatherazi S, Belton CM, Oda P, Cartwright FD, Kenny AE. Mycoplasma orale infection affects K and Cl currents in the HSG salivary gland cell line. In Vitro Cell Dev Biol - Animal. 1996;(32):361-5.

26. Simecka JW, Ross SE, Cassell GH, Davis JK. Interactions of Mycoplasmas with B Cells: Antibody Production and Nonspecific Effects. Clin Infect Dis. 1993;17:S176-82.

27. Nicolson GL, Nasralla MY, Nicolson NL. The pathogenesis and treatment of mycoplasmal infections. Antimicrob Infect Dis Newsl. 1998;17(11):81-7.

28. Chambaud I, Wróblewski H, Blanchard A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. Trends Microbiol. 1999;7(12):493-9.

29. Root-Bernstein R, Hobbs S. Homologies between mycoplasma adhesion peptide, CD4 and class II MHC proteins: a possible mechanism for HIV-mycoplasma synergism in AIDS. Res Immunol. 1991;142:519-23.

30. Taylor-Robinson D. Mollicutes in vaginal microbiology : Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum and Mycoplasma genitalium. Res Microbiol. 2017;168(9-10):875-81.

31. Doig PA, Ruhnke HL, Bosu WT. The genital Mycoplasma and Ureaplasma flora of healthy and diseased dogs. Can J Comp Med. 1981;45(3):233.

32. Janowski T, Zdunczyk S, Jurczak A, Socha P. Incidence of Mycoplasma canis in the vagina in three groups of bitches. Bull Vet Inst Pulawy. 2008;52:533-5.

33. Maksimović Z, Maksimović A, Halilbašić A, Rifatbegović M. Genital mycoplasmas of healthy bitches. J Vet Diagn Invest. 1 juill 2018;30(4):651-3.

34. Taylor-Robinson D, Jensen JS. Mycoplasma genitalium: from Chrysalis to Multicolored Butterfly. Clin Microbiol Rev. 2011;24(3):498-514.

35. Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. Mycoplasma genitalium Infection and Female Reproductive Tract Disease: A Meta-analysis. Clin Infect Dis. 2015;61(3):418-26.

36. Ljubin-Sternak S, Meštrović T. Chlamydia trachomatis and Genital Mycoplasmas: Pathogens with an Impact on Human Reproductive Health. J Pathog. 2014;2014:15 p.

37. Mårdh PA, Weström L. Tubal and cervical cultures in acute salpingitis with special reference to Mycoplasma hominis and T-strain mycoplasmas. Br J Vener Dis. 1970;46(3):179-86.

38. Haggerty CL. Evidence for a role of Mycoplasma genitalium in pelvic inflammatory disease. Curr Opin Inf Dis. 2008;21(1):65-9.

39. Taylor-Robinson D, Furr PM, Tully JG, Barile MF, Møller BR. Animal models of Mycoplasma genitalium urogenital infection. Isr J Med Sci. 1987;23(6):561-4.

40. Ruhnke HL, Doig PA, MacKay AL, Gagnon A, Kierstead M. Isolation of Ureaplasma from bovine granular vulvitis. Can J Comp Med. 1978;42(2):151-5.

41. Doig PA, Ruhnke HL, Mackay AL, Palmer NC. Bovine granular vulvitis associated with Ureaplasma Infection. Can Vet J. 1979;20(4):89-94.

42. Stalheim HV, Proctor SJ, Gallagher JE. Growth and effects of Ureaplasmas (T Mycoplasmas) in bovine oviductal organ cultures. Infect Immun. 1976;13:11.

43. Moorthy AR, Spradbrow PB, Eisler ME. Isolation of mycoplasmas from the genital tract of horses. Aust Vet J. 1977;53(4):167-9.

44. Nehra K, Rana R, Viswas KN, Arun TR, Singh VP, Singh AP, et al. Isolation and molecular identification of Mycoplasma equigenitalium from equine genital tracts in northern India. Iran J Vet Res. 2015;16(2):176-81.

45. Tully J. The Mycoplasmas V2: Human and Animal Mycoplasmas. Elsevier; 2012. 524 p.

46. Wallach EE, Styler M, Shapiro SS. Mollicutes (mycoplasma) in infertility. Fertil Steril. 1985;44(1):1-12.

47. Lingwood CA, Quinn PA, Wilansky S, Nutikka A, Ruhnke HL, Miller RB. Common sulfoglycolipid receptor for Mycoplasmas involved in animal and human infertility. Biol Rep. 1990;43:694-7.

48. Bjurström L, Linde-Forsberg C. Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches. Am J Vet Res. 1992;53(5):665-9.

49. Baba E, Hata H, Fukata T, Arakawa A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. Am J Vet Res. 1983;44(4):606-9.

50. Maksimović A, Filipović S, Rifatbegović M, Maksimović Z, Beširović H. Vaginal and uterine bacteria of healthy bitches during different stages of their reproductive cycle. Vet Rec. 2012;171(15):2 p.

51. Kida K, Baba E, Torii R, Kawate N, Hatoya S, Wijewardana V, et al. Lactoferrin expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra. Theriogenology. 2006;66(5):1325-33.

52. Ling GV, Ruby AL. Aerobic bacterial flora of the prepuce, urethra, and vagina of normal adult dogs. Am J Vet Res. 1978;39(4):695-8.

53. Bruchim A, Lutsky I, Rosendal S. Isolation of mycoplasmas from the canine genital tract: a survey of 108 healthy dogs. Res Vet Sci. 1978;25(2):243-5.

54. Mimouni P. Mycoplasmes et pathologie de la reproduction chez le chien. Point Vét. 1996;28(180):41-4.

55. Holzmann A, Laber G, Walzl H. Experimentally induced mycoplasmal infection in the genital tract of the female dog. Theriogenology. 1979;12(6):355-70.

56. Laber G, Holzmann A. Experimentally induced mycoplasmal infection in the genital tract of the male dog: II. Andrological and microbiological investigations after exposure to mycoplasms. Theriogenology. 1977;7(4):177-88.

57. L'Abee-Lund TM, Heiene R, Friis NF, Ahrens P, Sørum H. Mycoplasma canis and urogenital disease in dogs in Norway. Vet Rec. août 2003;153(8):231-5.

58. Olson PN, Mather EC. Canine vaginal and uterine bacterial flora. J Am Vet Med Assoc. 1978;172(6):708-11.

59. Johnson CA. Diagnosis and treatment of chronic vaginitis in the bitch. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1991;21(3):523-31.

60. Johnston S, Root Kustritz M, Olson P. Disorders of the canine uterus and uterine tubes (oviducts). In: Canine and Feline Therionology. Ray K, Denise L; 2001. p. 206-25.

61. Jang SS, Ling GV, Yamamoto R, Wolf AM. Mycoplasma as a cause of canine urinary tract infection. J Am Vet Med Assoc. 1984;185(1):45-7.

62. Ülgen M, Çetin C, Şentürk S, Öel AE, Özdemir Ü. Urinary Tract Infections due to Mycoplasma canis in Dogs. J Vet Med Ser A. 2006;53(7):379-82.

63. Dumon C, Mimouni P. Mortinatalité en élevage canin liée à des maladies infectieuses : brucelloses, herpès virose, mycoplasmoses. EMC - Vét. 2005;2(1):54-62.

64. Whitford HW, Lingsweiler SW, Lauerman LH. Canine, feline and equine mycoplasmas. In: Whitford H W, Rosenbush R F : Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis. 5ème. Iowa State University Press; 1994. p. 134-41.

65. Linde-Forsberg C, Bölske G. Canine genital mycoplasmas and ureaplasmas. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XII, Small Animal Practice. Philadelphia: W. B. Saunders; 1995. p. 1090-4.

66. Graham EM, Taylor DJ. Bacterial reproductive pathogens of cats and dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2012;42(3):561-82.

67. Zubair M. Causes of infertility in bitch. Adv Anim Vet Sci. 2014;2(10):565-73.

68. Wilborn RR, Maxwell HS. Clinical approaches to infertility in the bitch. Vet Clin Small Anim Pract. 2012;42(3):457-68.

69. Favier F. Avortements et mortalité néonatale en élevage canin : Approche pratique du vétérinaire [Internet]. 2001. Disponible sur: http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=275

70. Johnson CA. Thyroid issues in reproduction. Clin Tech Small Anim Pract. 2002;17(3):129-32.

71. Johnston S, Root Kustritz M, Olson P. Clinical approach of infertility in bitch. In: Canine and Feline Theriogenology. W. B. Saunders; 2001. p. 257-73.

72. Johnston S, Olson P, Root Kustritz M. Canine parturition- eutocia and dystocia. In: Canine and Feline Theriogenology. W. B. Saunders; 2001.

73. Woltz HH, Thompson FN, Kemppainen RJ, Munnell JF, Lorenz MD. Effect of prednisone on thyroid gland morphology and plasma thyroxine and triiodothyronine concentrations in the dog. Am J Vet Res. 1983;44(11):2000-3.

74. Whitford HW. Isolation of Mycoplasmas from Clinical Specimens. In: Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis. Iowa Stata University Press; 1994.

75. Goll Jr. F. Identification of Mycoplasmas Isolated from Domestic Animals. In: Mycoplasmosis in Animals : Laboratory Diagnosis. Iowa Stata University Press; 1994.

76. Ström B, Linde-Forsberg C. Effects of ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole on the vaginal bacterial flora of bitches. Am J Vet Res. 1993;54(6):891-6.

77. Guide de bonnes pratiques - Fiches de recommandations pour un bon usage des antibiotiques - Filière animaux de compagnie. AFVAC Editions; 2016.

78. Chernov VM, Chernova OA, Mouzykantov AA, Medvedeva ES, Baranova NB, Malygina TY, et al. Antimicrobial resistance in mollicutes: known and newly emerging mechanisms. FEMS Microbiol Lett. 2018;365(18).

79. Waites K, Lysnyansky I, Bébéar C. Emerging antimicrobial resistance in Mycoplasmas of humans and animals. In: Mollicutes : Molecular Biology and Pathogenesis. Horizon Scientific Press; 2013. p. 289-322.

80. Kato H, Murakami T, Takase S, Ono K. Sensitivities in vitro to antibiotics of Mycoplasma isolated from canine sources. Nihon Juigaku Zasshi Jpn J Vet Sci. 1972;34(4):197-206.

81. Khalil D. Résistance aux antibiotiques chez Mycoplasma bovis: mécanismes moléculaires et évolution en France. Microbiologie et Parasitologie, Université de Lyon; 2016.

82. Langelot M, Cellerin L, Germaud P. Effets anti-inflammatoires des macrolides: Applications en Pneumologie. Rev Pneumol Clin. 2006;62(4):215-22.

83. Hooper DC. Bacterial Topoisomerases, Anti-Topoisomerases, and Anti-Topoisomerase Resistance. Clin Infect Dis. 1998;27(s1):54-63.

84. Judlin P. Mycoplasmes génitaux. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2003;31(11):954-9.

85. Guay DRP. Drug forecast – the peptide deformylase inhibitors as antibacterial agents. Ther Clin Risk Manag. 2007;3(4):513-25.

86. Chernova OA, Medvedeva ES, Mouzykantov AA, Baranova NB, Chernov VM. Mycoplasmas and Their Antibiotic Resistance: The Problems and Prospects in Controlling Infections. Acta Naturae. 2016;8(2):24-34.

87. Rodriguez P, de Barbeyrac B, Renaudin H, Bebear C. Antibiogramme des Chlamydia et des mycoplasmes. Rev Fr Lab. 1995;1995(277):75-80.

88. Francoz D, Fortin M, Fecteau G, Messier S. Determination of Mycoplasma bovis susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. Vet Microbiol. 2005;105(1):57-64.

89. Dósa E, Nagy E, Falk W, Szöke I, Ballies U. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum. J Antimicrob Chemother. 1999;43(4):575-8.

90. Groppetti D, Pecile A, Barbero C, Martino PA. Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: role on fertility. Theriogenology. 2012;77(8):1549-56.

91. Nicholas R, Ayling R, McAuliffe L. Mycoplasma Diseases of Ruminants. CABI; 2008. 255 p.

92. Cai HY, McDowall R, Parker L, Kaufman EI, Caswell JL. Changes in antimicrobial susceptibility profiles of Mycoplasma bovis over time. Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire. 2019;83(1):34-41.

93. Takashi D, Shin I, Mitsuru Y, Yuko S, Chiaki U, Masayuki S, et al. Surveillance of the prevalence of macrolide and/or fluoroquinolone resistance-associated mutations in Mycoplasma genitalium in Japan. J Infect Chemother. 2018;24(11):861-7.

94. Anderson T, Coughlan E, Werno A. Mycoplasma genitalium macrolide and fluoroquinolone resistance detection and clinical implications in a selected cohort in New Zealand. J Clin Microbiol. 2017;55(11):3242-8.

95. Valentine-King MA, Brown MB. Antibacterial resistance in Ureaplasma species and Mycoplasma hominis isolates from urine cultures in college-aged Ffemales. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(10):e01104-17.

96. Taylor-Robinson D. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. J Antimicrob Chemother. 1997;40(5):622-30.

97. Gautier-Bouchardon AV. Antimicrobial Resistance in Mycoplasma spp. Microbiol Spectr. 2018;6(4).

98. Li SL, Sun HM, Zhu BL, Liu F, Zhao HQ. Whole genome analysis reveals new insights into macrolide resistance in Mycoplasma pneumoniae. Biomed Environ Sci BES. 2017;30(5):343-50.

99. Pereyre S, Gonzalez P, de Barbeyrac B, Darnige A, Renaudin H, Charron A, et al. Mutations in 23S rRNA cccount for intrinsic resistance to macrolides in Mycoplasma hominis and Mycoplasma fermentans and for acquired resistance to macrolides in M. hominis. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(10):3142-50.

100. Prats-van der Ham M, Tatay-Dualde J, de la Fe C, Paterna A, Sánchez A, Corrales JC, et al. Molecular resistance mechanisms of Mycoplasma agalactiae to macrolides and lincomycin. Vet Microbiol. 2017;211:135-40.

101. Zhang H, Zheng L, Zhao J, Ding S, Xia Y. Investigation of fluoroquinolone resistance mechanism in Mycoplasma hominis isolated from urogenital samples in a Chinese hospital. J Med Microbiol. 2019;68(2):206-10.

102. Gautier-Bouchardon AV, Ferré S, Le Grand D, Paoli A, Gay E, Poumarat F. Overall decrease in the susceptibility of Mycoplasma bovis to antimicrobials over the past 30 Years in France. PLoS ONE. 2014;9(2).

103. Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Gruson D, Lefrancois M, Bebear C. In vitro activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against Mycoplasmas including Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum fluoroquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(9):2557-60.

104. Duffy L, Glass J, Hall G, Avery R, Rackley R, Peterson S, et al. Fluoroquinolone resistance in Ureaplasma parvum in the United States. J Clin Microbiol. 2006;44(4):1590-1.

105. Khalil D, Becker CAM, Tardy F. Alterations in the Quinolone Resistance-Determining Regions and Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates and Laboratory-Derived Mutants of Mycoplasma bovis: Not All Genotypes May Be Equal. Appl Environ Microbiol. 2016;82(4):1060-8.

106. Armstrong D, Yu BH, Yagoda A, Kagnoff MF. Colonization of humans by Mycoplasma canis. J Infect Dis. 1971;124(6):607-9.

107. Barroso G, Labarère J. Chromosomal gene transfer in Spiroplasma citri. Science. 1988;241(4868):959-61.

108. Roberts MC, Kenny GE. Conjugal transfer of transposon Tn916 from Streptococcus faecalis to Mycoplasma hominis. J Bacteriol. août 1987;169(8):3836-9.

109. Dordet-Frisoni E, Sagné E, Baranowski E, Breton M, Nouvel LX, Blanchard A, et al. Chromosomal transfers in mycoplasmas: when minimal genomes go mobile. mBio. 2014;5(6):e01958.

110. Faucher M, Nouvel L-X, Dordet-Frisoni E, Sagné E, Baranowski E, Hygonenq M-C, et al. Mycoplasmas under experimental antimicrobial selection: The unpredicted contribution of horizontal chromosomal transfer. PLoS Genet. 2019;15(1):e1007910.

111. Blaylock MW, Musatovova O, Baseman JG, Baseman JB. Determination of infectious load of Mycoplasma genitalium in clinical samples of human vaginal cells. J Clin Microbiol. 2004;42(2):746-52.

ANNEXES

Annexe 1 : Notice d'utilisation de l'AmpliTest Mycoplasma canis (PCR temps réel)

AmpliTest *Mycoplasma canis*
(Real Time PCR)
Kit for detection of DNA sequences
specific to the ***Mycoplasma canis***
by the **Real Time PCR** technique

Single reaction volume: **20 µL**
The kit is produced in two variants: for 50 and 100 reactions.
Read carefully the instruction before the first use of the kit.

INTENDED USE

The **AmpliTest *Mycoplasma canis* (Real Time PCR)** kit is a Real Time PCR-based test for the detection of DNA sequences specific to *Mycoplasma canis* in DNA samples. To avoid problems with the efficiency of the Real Time PCR reaction, prepare DNA samples applying methods which allow you to obtain the high-quality DNA uncontaminated with the inhibitors of the PCR reaction. We recommend using DNA extraction kits based on silica resins (known as spin column-based kits).

APPLICATION FIELD

- R&D
- *In vitro* veterinary diagnostics

COMPONENTS OF THE KIT

Name	***Description***	***Quantity (50 rxns)***	***Quantity (100 rxns)***	***Tip color***
RM	Reaction mixture	2 × 300 µL	4 × 300 µL	Green
PC	Positive control	2 × 50 µL	4 × 50 µL	Red
NC	Negative control	2 × 50 µL	4 × 50 µL	Blue
Water	Water	2 × 500 µL	4 × 500 µL	White

TRANSPORT AND STORAGE

- The test kit is delivered on dry ice. After delivery, unpack the kit immediately.
- The kit components should be stored at **-20°C**.
- **AVOID THE EXPOSURE OF THE RM COMPONENT TO THE LIGHT.**
- Avoid multiple freezing/thawing cycles of the test components, in particular the **RM** component. Three freezing/thawing cycles of the **RM** component do not affect the kit performance. TIP: There are additional fields on the **RM** label to mark the number of the freezing/thawing cycles.
- Do not use the kit components after the shelf life.

TEST PRINCIPLE

The **AmpliTest *Mycoplasma canis* (Real Time PCR)** kit contains primers amplifying the DNA fragment located in the bacterial genomes of the *Mycoplasma canis*. The presence of the bacterial DNA is confirmed by the specific TaqMan® probe which is hydrolyzed after it attached to the synthesized amplicon (the amplified fragment of the bacterial DNA). The probe hydrolysis results in the release of the FAM fluorescent dye which is in turn detected by

the optical system of the Real Time PCR apparatus. Carefully designed, the primers and probes ensure high specificity of the reaction.
In order to increase the credibility of the results, the **RM** component of the **AmpliTest *Mycoplasma canis* (Real Time PCR) kit** contains an internal control (an exogenous DNA fragment) and an additional set of primers and probe for its amplification. The internal control is detected after the release of the HEX fluorescent dye. The presence of the internal control allows for monitoring the correctness of the Real Time PCR reaction. The efficiency of the detection of the *Mycoplasma canis*-specific sequence is not affected by the amplification of the internal control. The successful amplification of the internal control indicates that the Real Time PCR reaction proceeded correctly.

EQUIPMENT AND ADDITIONAL MATERIALS

- One of the Real Time PCR apparatuses:

LightCycler 480 (Roche)
LightCycler 96 (Roche)
LightCycler 2.0 (Roche)
RotorGene 3000/6000 (Qiagen)
or any other apparatus capable of the detection of FAM and HEX fluorescent dyes.
The **AmpliTest *Mycoplasma canis* (Real Time PCR)** *kit does not contain the ROX normalization dye. If apparatuses need such normalization, the appropriate amount of the ROX dye should be added to the reaction mixture. The ROX dye is not provided with the kit.*

- Reaction vessels (PCR tubes, PCR plates or capillaries depending on the Real Time PCR apparatus)
- Centrifuge for reaction vessels
- Microcentrifuge
- Automatic pipettes in the range of 1-1000 µL
- Sterile tips with filters for automatic pipettes
- DNA extraction kit
- *Depending on the DNA extraction kit used, additional equipment or material may be needed*.

DNA EXTRACTION

Collect appropriate samples and extract DNA. The amount of starting material depends on the DNA extraction method. DNA extraction kits based on silica resins (known as spin columns) are recommended as these kits allow you to obtain high quality DNA samples deprived of PCR reaction inhibitors. In other extraction methods, the DNA sample may contain compounds significantly reducing the efficiency of the PCR reaction. This in turn may lead to the decrease in the test sensitivity or even complete inhibition of DNA amplification. The DNA samples should be stored at +4°C (short time storage) or at -20°C (long time storage).

REAL TIME PCR PROTOCOL

1. Determine the number of the DNA samples to be analyzed (***n***).
2. Thaw kit components. Then, mix them gently and spin shortly. **After thawing, the kit components should be stored +4°C or on ice. AVOID EXPOSURE OF THE RM COMPONENT TO THE LIGHT.**
3. Determine the quantity of the DNA sample to be added to the reaction (***x*** µL).
The optimum DNA quantity in the single reaction is 100-200 ng. The DNA quantity added to the reaction should not exceed 500 ng. The large quantities of DNA in the PCR reaction inhibit the activity of DNA polymerase and affect the test sensitivity. Typically, 100-200 ng of DNA is contained in 1-5 µL of the DNA sample obtained using the silica-based DNA extraction kit.
4. Mix thoroughly (***n*** + 3) × 12 µL of **RM** component and (***n*** + 3) × (8 - ***x***) µL of water.
5. Pipet (20 – ***x***) µL of the reaction mixture prepared in step 4 into ***n*** + 2 reaction vessels (PCR tubes, capillaries, cells in the PCR plate, etc.).
6. Pipet ***x*** µL of the DNA samples into ***n*** reaction vessels with the reaction mixture. Next, pipet ***x*** µL of the negative control (**NC)** into one of the remaining reaction vessels and ***x*** µL of the positive control (**PC**) into the last remaining reaction vessel. *CAUTION: Positive control should be added as the last one.*
7. Close the reaction vessels and spin them shortly.
8. Place the reaction vessels in the Real Time PCR apparatus and run the reaction according to the following protocol:

Initial denaturation	95°C 5 min
Amplification (45 cycles)	95°C 10 s 58°C 25 s*
Cooling	30-40°C 30s (depending on the apparatus type)

RESULT INTERPRETATION

No.	***Sample type***	***FAM***	***HEX***	***Result***
1	Positive control	+	+	Correct
2	Negative control	-	+	Correct
3	Determination 1	+	+	Positive
4	Determination 2	-	+	Negative

The lack of amplification in the HEX* channel indicates the incorrect result of the Real Time PCR reaction. The **simultaneous lack** of the positive reading for fluorescence in the HEX channel for positive control and negative control indicates the **poor quality** of the **AmpliTest *Mycoplasma canis* (Real Time PCR)** kit (improper storage, transport, handling, expiry of the shelf life, etc.). The **positive** reading of the fluorescence in the HEX channel in positive and negative controls and **lack of the positive** reading for the DNA samples indicates the poor quality of the DNA samples (the presence of PCR reaction inhibitors) or too much DNA added to the reaction mixture. In this case, the reaction should be repeated with a smaller quantity of the DNA sample, adding such a volume of water to have the final reaction volume of 20 µL.

* Very high titer of the bacteria may result in the lack of the fluorescence reading in the HEX channel with the simultaneous positive reading in the FAM channel. We recommend the repetition of the reaction with a smaller amount (10-100-fold) of the DNA sample.

ADDITIONAL REMARKS

- TaqMan® probes applied in the assay are labelled with dark quenchers which do not generate additional fluorescence signals. If the apparatus requires it (e.g. RotorGene 6000), choose the "**none**" option.
- Do not reduce the reaction volume less than 20 µL. **The reaction volume reduction results in the significant decrease of the test sensitivity.**
- Special care should be taken during DNA extraction, and the biological material obtained from sick individuals should be regarded as potentially infected.
- The DNA extraction and detection of *Mycoplasma canis* should be conducted by appropriately qualified staff in a laboratory that meets special requirements and is approved to handle infected biological material. Special care should be taken not to cross-contaminate the simultaneously purified DNA samples during DNA extraction.
- In order to eliminate false results as much as possible, the following rules should be followed:
    - If possible, arrange separate areas for DNA extraction, Real Time PCR reaction preparation and Real Time PCR reaction performance (analysis).
    - We recommend using protective clothing and changing disposable gloves between the steps of DNA extraction and preparation of the Real Time PCR reaction.
    - Wipe the surface of the bench areas designed for DNA extraction and preparation of the Real Time PCR reaction with DNA removing/degrading agents.
    - Use only sterile tips with filters for the automatic pipettes.
    - During preparation of the Real Time PCR reaction, the positive control **PC** should be added as the last ingredient. Before its addition, if possible, close test tubes with the DNA samples and the negative control **NC**.

SAVATIER Camille

TITRE

MYCOPLASMOSE VAGINALE ET INFERTILITE CHEZ LA CHIENNE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ET MISE EN PLACE D'UNE PCR QUANTITATIVE MYCOPLASMA CANIS

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon*, 11 octobre 2019*

RESUME : Les mycoplasmes sont suspectés avoir un rôle pathogène dans l'infertilité humaine, des animaux de rente et domestiques. Chez la chienne, Mycoplasma canis est l'espèce principalement isolée dans la flore vaginale. Son rôle pathogène n'a jamais été prouvé mais il est considéré dans le cadre d'une infertilité et motive des traitements antibiotiques. De nombreuses résistances aux antibiotiques émergeant au sein des mycoplasmes animaux et humains, la prise en charge des mycoplasmoses vaginales représente un enjeu de santé publique. Afin d'améliorer le diagnostic, une PCR quantitative Mycoplasma canis a été mise en place au sein du campus vétérinaire de Lyon. Malheureusement, cette PCR ne s'est pas révélée être suffisamment spécifique pour la valider.

MOTS CLES :

- Stérilité
- Chien
- PCR quantitative
- Mycoplasma

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur JANIER
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur BUFF
2ème Assesseur :	Madame la Professeure LE GRAND
Membre invité :	Madame la Docteure ROSSET

DATE DE SOUTENANCE : 11 octobre 2019