

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2021 - Thèse n° 030

**Infection vaginale à mycoplasmes chez la
chienne : étude de l'intérêt d'un traitement
antibiotique pendant la gestation**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 8 Septembre 2021
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Par

KONTER Guillaume

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2021 - Thèse n° 030

**Infection vaginale à mycoplasmes chez la
chienne : étude de l'intérêt d'un traitement
antibiotique pendant la gestation**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 8 Septembre 2021
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Par

KONTER Guillaume

Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (01-04-2021)

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 émérite
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
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
DJELLOUADJI	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
GILLOT-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
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
KODJO	Angell	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	Dorothee	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
MOSCA	Marion	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
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
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGEANT ET	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur

Remerciements aux membres du jury

A Madame la Professeure Desestret

*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 avoir accepté de m'encadrer et de corriger au cours de ce travail,
Tout mes remerciements.*

A Monsieur le Docteur Bonte

*Du CESECAH,
Pour avoir réalisé le plan d'expériences et collecté les données nécessaires à la réalisation de ce
travail,
Sincères remerciements.*

Table des matières

TABLE DES MATIERES	6
TABLE DES TABLEAUX	8
TABLE DES FIGURES	9
INTRODUCTION	10
PREMIERE PARTIE : ETUDE DU MICROBIOTE VAGINAL DE LA CHIENNE ET PLACE DES MYCOPLASMES	12
1 LE MICROBIOTE GENITAL	14
1.1 DEFINITION ET CARACTERISATION DU MICROBIOTE	14
1.1.1 <i>Le concept de Microbiote</i>	14
1.1.2 <i>Les méthodes de caractérisation du microbiote génital</i>	15
1.2 LE MICROBIOTE VAGINAL	20
1.2.1 <i>Données chez la femme et les autres espèces</i>	20
1.2.2 <i>Les espèces du microbiote vaginal de la chienne</i>	22
1.2.3 <i>Les mollicutes</i>	33
1.2.4 <i>Variations physiologiques du Microbiote</i>	36
1.3 LE MICROBIOME DU TRACTUS GENITAL SUPERIEUR	40
1.3.1 <i>Composition</i>	40
1.3.2 <i>Origine</i>	41
1.3.3 <i>Facteurs de variations</i>	42
2 DESEQUILIBRES DU MICROBIOTE ET INFERTILITE	44
2.1 DIAGNOSTIC.....	44
2.1.1 <i>Diagnostic différentiel de l'infertilité</i>	44
2.2 RUPTURE D'EQUILIBRE.....	47
2.2.1 <i>Chez la femme : changement du type de communauté bactérienne</i>	47
2.2.2 <i>Chez la chienne</i>	48
3 MYCOPLASMES ET INFERTILITES	51
3.1 GENERALITES SUR LES MYCOPLASMES	51
3.1.1 <i>Taxonomie et phylogénie</i>	51
3.1.2 <i>Génome, biologie et aspect en culture</i>	53
3.1.3 <i>Pouvoir pathogène</i>	56
3.2 INFECTIONS EXPERIMENTALES	61
3.3 DONNEES CHEZ LES AUTRES ESPECES	61
3.4 DONNEES CHEZ LA CHIENNE.....	62
3.4.1 <i>Aspects cliniques</i>	62
3.4.2 <i>Affections inapparentes</i>	63
3.5 FAUT-IL TRAITER ?.....	64
3.5.1 <i>Interprétation des cultures</i>	64

3.5.2	<i>Pratique actuelle</i>	65
3.6	ARSENAL THERAPEUTIQUE.....	66
3.6.1	<i>Choix de l'antibiotique</i>	66
3.6.2	<i>Mycoplasmes et antibiorésistance</i>	67
CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE		71
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE DES EFFETS DES MYCOPLASMES VAGINAUX SUR LA PROLIFICITE ET LA CROISSANCE DES CHIOTS DANS UNE POPULATION DE CHIENNES REPRODUCTRICES		72
1	MATERIELS ET METHODE	73
1.1	ANIMAUX ET PRELEVEMENTS	73
1.2	ANALYSES DES PRELEVEMENTS	74
1.2.1	<i>Isolement et dénombrement des mycoplasmes</i>	74
1.2.2	<i>Bactériologie classique</i>	74
1.3	TRAITEMENT	75
1.4	GROUPES, OBJECTIF ET ANALYSE STATISTIQUE.....	75
2	RESULTATS	77
2.1	MYCOPLASMES ET BACTERIOLOGIE	77
2.2	FERTILITE.....	78
2.3	PROLIFICITE.....	78
2.3.1	<i>Etude statistique simple</i>	78
2.3.2	<i>Réalisation d'un modèle statistique pour l'étude des interactions entre variables</i>	80
2.4	POIDS DES CHIOTS	88
2.4.1	<i>Etude statistique simple</i>	88
2.4.2	<i>Réalisation d'un modèle statistique pour l'étude des interactions entre variables</i>	90
2.5	MORTINATALITE	96
3	DISCUSSION.....	96
3.1	PROTOCOLE UTILISE	96
3.2	ANALYSES DES RESULTATS	97
3.2.1	<i>Cultures</i>	97
3.2.2	<i>Fertilité</i>	98
3.2.3	<i>Proliféricité</i>	98
3.2.4	<i>Poids des chiots</i>	100
CONCLUSION.....		102
BIBLIOGRAPHIE		105

Table des tableaux

<i>Tableau 1 Codes et références bibliographiques des études portant sur le microbiote vaginal de la chienne utilisées dans le tableau 2</i>	23
<i>Tableau 2 Résultats des différentes études portant sur le microbiote vaginal de de chiennes ne présentant pas de troubles de la reproduction (les résultats sont exprimés en pourcentages des prélèvements réalisés, les références des études sont indiquées dans le tableau 1</i>	26
<i>Tableau 3 Taux de prévalence d'isolement des différentes espèces de mycoplasmes chez des chiennes ne présentant pas de trouble de la reproduction (résultats en pourcentage des prélèvements réalisés dans chaque étude)</i>	34
<i>Tableau 4 Propriétés biochimiques des mycoplasmes isolés au niveau du tractus génital de la chienne</i>	55
<i>Tableau 5 Numéro attribué à chaque sous-groupe de la population d'étude en fonction des résultats des cultures et de la mise en place d'un traitement</i>	76
<i>Tableau 6 Effectifs des sous-groupes résumés en tableau 5</i>	78
<i>Tableau 7 Moyenne des chiots par chienne (le détail des groupes est donné dans le tableau 5)</i>	80
<i>Tableau 8 Résumé des coefficients de la régression de Poisson sans termes d'interaction, réalisé à partir des données de prolificité</i>	81
<i>Tableau 9 Moyennes et médianes du poids des chiots (kg) à la naissance et à une semaine. Le gain de poids est indiqué en pourcentage</i>	88
<i>Tableau 10 Résumé des coefficients de la régression linéaire sans terme d'interaction réalisée sur le gain de poids relatif des chiots à une semaine</i>	91

Table des figures

<i>Figure 1</i> Ecouvillonnage vaginal (photo Camille Savatier (13)).....	16
<i>Figure 2</i> Similarité entre les ARNr 16S de différentes bactéries. Sous le graphique sont indiqués les différents couples d'amorces utilisables en fonction de la région séquencée (Source Sacha Schutz (17))	18
<i>Figure 3</i> Les différentes méthodes d'études du microbiote (schéma d'après Pham et Lawley (18))	19
<i>Figure 4</i> Attribution des UTOs séquencés à partir d'écouvillons vaginaux dans l'étude de Lyman et al. (55) à différents genres taxonomiques, seuls les 25 genres les plus abondants sont représentés (Source : Lyman et al.) 32	32
<i>Figure 5</i> Attribution des UTOs séquencés au niveau de l'endomètre dans l'étude de Lyman et al. (55) à leur genre taxonomique, seuls les 25 genres les plus abondants sont représentés (Source : Lyman et al.).....	41
<i>Figure 6</i> Attributions des UTOs séquencées aux genres bactériens chez le groupe atteint de pyomètre et le groupe contrôle (source Young et al. 2017 (59))	50
<i>Figure 7</i> Arbre phylogénique établi à partir des séquences des ARNr 16S, les mycoplasmes isolés dans l'espèce canines sont notés en gras et les numéros d'accès aux séquences dans Genbank notés entre parenthèses (Source Chalker et Brown 2004 (104))	53
<i>Figure 8</i> Mycoplasma pneumoniae vu au microscope électronique à balayage, les flèches noires indiquent l'extrémité effilée responsable de l'adhésion cellulaire (Source Atkinson et al. 2008)	56
<i>Figure 9</i> Mycoplasma canis vu au microscope électronique à balayage, la surface est marquée d'élévation circulaire de 20nm sur l'ensemble de la cellule (Source : Michaels et al. 2016).....	57
<i>Figure 10</i> Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (source Khalil (2017) (150))	68
<i>Figure 11</i> Histogramme de la répartition des dernières dilutions présentant une turbidité. Le nombre x en abscisse correspond à la dilution à 10^{-x} , le seuil de positivité d'un échantillon est fixé à la dilution 10^{-4}	77
<i>Figure 12</i> Distribution des chiots nés par chienne et diagramme en boîte correspondant (De gauche à droite sont représentés les groupes négatives, positives non traitées et positives traitées).....	79
<i>Figure 13</i> Représentation graphique de l'effet des prédicteurs simples dans la régression de Poisson réalisée sur la prolificité.....	81
<i>Figure 14</i> Représentation graphique de l'interaction entre le résultat de la bactériologie et la mise en place d'un traitement dans une régression de Poisson.....	83
<i>Figure 15</i> Représentation graphique de l'interaction entre le résultat de la bactériologie et la valeur de la dilution dans une régression de Poisson	85
<i>Figure 16</i> Représentation graphique de l'interaction entre le résultat de la bactériologie et la recherche de mycoplasmes dans une régression de Poisson	85
<i>Figure 17</i> Représentation graphique de l'interaction entre la dilution et la mise en place d'un traitement dans une régression de Poisson.....	86
<i>Figure 18</i> Représentation graphique des poids à la naissance et à une semaine des chiots (à gauche les groupes selon le résultat mycoplasmes et le traitement, à droite les sous-groupes prenant en compte le résultat de la bactériologie).....	89
<i>Figure 19</i> Représentation graphique de l'effet des prédicteurs simple dans la régression linéaire réalisée sur le gain de poids relatif des chiots	91
<i>Figure 20</i> Représentation graphique de l'interaction en la bactériologie et la mise en place d'un traitement dans la régression linéaire réalisée sur le gain de poids relatif des chiots	93
<i>Figure 21</i> Représentation graphique de l'interaction en la bactériologie et la dilution dans la régression linéaire réalisée sur le gain de poids relatif des chiots	94
<i>Figure 22</i> Représentation graphique de l'interaction en la bactériologie et le résultat mycoplasme dans la régression linéaire réalisée sur le gain de poids relatif des chiots	94
<i>Figure 23</i> Représentation graphique de l'interaction en la dilution et la mise en place d'un traitement dans la régression linéaire réalisée sur le gain de poids relatif des chiots	95
<i>Figure 24</i> Nuage de point des prolificité et droites de régression utilisant les fonction lm (rouge) et lowess (bleu)	100

Introduction

L'infertilité canine est une problématique majeure en élevage canin. L'infertilité se définit comme l'incapacité à concevoir des chiots viables. De manière plus large les problématiques d'infertilité regroupent les baisses de fécondité, c'est-à-dire du nombre de chiots par portée, mais également la mortinatalité et les retards de croissances chez les nouveaux nés.

Une origine bactérienne à ces troubles de la reproduction est souvent envisagée, cependant cette hypothèse doit s'inscrire dans une démarche diagnostique globale. Différentes questions se posent alors au praticien : à quel moment suspecter une origine bactérienne dans un contexte d'infertilité ? Quel prélèvement réaliser ? Comment interpréter une culture bactérienne ? Faut-il toujours rechercher une cause sous-jacente à une infection génitale ? Quel peut être de l'apport de la génétique moléculaire dans le diagnostic de l'infertilité ? Il est nécessaire, pour répondre à ces questions d'établir un portrait du microbiote vaginal de la chienne, de ses variations physiologiques, pathologiques ainsi que des facteurs à l'origine de ces variations.

Au sein des bactéries présentes au niveau de la flore génitale, les mycoplasmes occupent une place particulière. Ces bactéries de petites tailles, dépourvues de paroi et munies d'un génome réduit à l'extrême sont considérées comme des pathogènes potentiels dans certaines affections génitales. Ce rôle pathogène, opportuniste ou non, est bien connu et documenté chez la femme et la vache mais les données manquent chez la chienne.

Cependant malgré le manque de preuves formelles, les mycoplasmoses vaginales chez la chienne sont considérées comme une situation pathologique à l'origine d'infertilité. Des études ont permis de définir un seuil à partir duquel la quantité de mycoplasmes serait pathologique. Pourtant les mycoplasmes sont souvent recherchés mais rarement quantifiés. La simple détection des mycoplasmes est alors à l'origine d'une antibiothérapie longue chez les chiennes reproductrices.

Dans un contexte où la résistance aux antibiotiques devient une problématique de santé publique à l'échelle mondiale, les vétérinaires ne peuvent se permettre d'utiliser les antibiotiques, dont l'arsenal n'évolue pas aussi vite que les résistances rencontrées, sans être assurés du rôle pathogène des bactéries ciblées.

Les vétérinaires ont un rôle essentiel auprès des éleveurs pour diagnostiquer l'infertilité dans leurs élevages. De nouvelles données sont donc nécessaires pour évaluer l'implication des mycoplasmes dans l'infertilité canine mais également pour confirmer ou

remettre en cause l'intérêt des traitements antibiotiques actuellement mis en place lorsque des mycoplasmes génitaux sont isolés chez la chienne.

Ces questions présentant un réel apport pour le praticien confronté à de l'infertilité d'origine bactérienne, j'ai décidé de travailler sur ces sujets. En première partie, une synthèse bibliographique portera sur le microbiote vaginal de la chienne, sa composition et ses variations ainsi que la place qu'occupent les mycoplasmes dans cet écosystème complexe. Dans une deuxième partie l'étude portant sur l'impact de la charge en mycoplasmes et le traitement de ces mycoplasmes sur la fertilité de chiennes suivie par le C.E.S.E.C.A.H (Centre d'étude, de sélection et d'élevage de chiens guides d'aveugles et autres handicapés) sera exposée.

*Première partie : étude du microbiote vaginal de la chienne
et place des mycoplasmes*

La présence d'une population bactérienne commensale vivant sur et dans les organismes des mammifères peut représenter une difficulté dans l'approche de certaines affections. Ces bactéries, pouvant être à la fois bénéfiques et délétères pour leurs hôtes, rendent l'interprétation d'examen bactériologiques difficile. Pour interpréter correctement les résultats d'examen bactériologiques, le praticien doit posséder une vision claire de la flore bactériologique « normale » et relier ces résultats aux signes cliniques observés. Les cultures bactériennes ont longtemps constitué la seule méthode de détection et d'identification des micro-organismes. Aujourd'hui la génétique moléculaire permet une approche différente de l'exploration des populations bactériennes.

Le tractus génital de la chienne possède sa propre flore. Le microbiote vaginal de la chienne a été peu exploré et est mal connu par le praticien. Dans le diagnostic de l'infertilité, une origine infectieuse est souvent suspectée et des examens bactériologiques sont souvent réalisés à partir d'écouvillons vaginaux. Trop souvent, un traitement antibiotique est mis en place sans pour autant qu'une infection génitale ait été mise en évidence.

Les mycoplasmes sont régulièrement suspectés dans les problèmes d'infertilité canine. Il y a peu d'informations disponibles sur la prévalence de ces bactéries au niveau de la muqueuse génitale. Leur rôle pathogène n'a pas été clairement établi.

Dans un premier temps, nous définirons le microbiote génital de la chienne à partir des données disponibles dans la littérature. Dans un second temps nous aborderons les variations physiologiques et pathologiques de ce microbiote lors d'infertilité. Enfin, nous nous intéresserons aux mycoplasmes, leur place dans le microbiote génital de la chienne ainsi que leur rôle dans l'infertilité canine.

1 Le microbiote génital

1.1 Définition et caractérisation du microbiote

1.1.1 Le concept de Microbiote

Le microbiote des mammifères désigne la communauté microbienne qui vit sur et à l'intérieur de ces mammifères. La présence de bactéries sur différents sites du corps des mammifères est connue depuis longtemps et étudiée depuis le XIX^{ème} siècle et les débuts de la microbiologie (1).

Ces micro-organismes n'ont pourtant suscité que peu d'intérêt en dehors des situations pathologiques pour lesquelles l'identification d'un germe marque une infection. Ces communautés microbiennes étaient alors considérées en temps normal comme commensales, c'est-à-dire tirant leurs ressources de leur hôte mais sans lui apporter aucun avantage ou désavantage (2). Le problème de cette définition du commensalisme, empruntée à des disciplines comme la zoologie, est qu'elle implique une neutralité de ces bactéries vis-à-vis de leurs hôtes. Or lors de situation pathologique il y a une perte de cette neutralité et la relation devient alors du parasitisme.

Depuis les années 1970, de nombreuses recherches sont menées pour caractériser et quantifier cette flore « commensale ». Les dernières études estiment que le nombre de bactéries qu'abrite le corps humain serait à minima de l'ordre de 3 milliards, soit du même ordre de grandeur que le nombre de cellules humaines (3). De telles études n'ont pas été menées chez les espèces d'intérêt vétérinaire comme le chien, mais il paraît vraisemblable que le microbiote de ces espèces soit du même ordre de grandeur.

De plus, l'exploration croissante de ce microbiote dans divers sites a permis d'identifier son rôle auprès de son organisme hôte et de remettre ainsi en question le caractère commensal de leur association. Le microbiote joue ainsi un rôle fondamental dans l'immunité de l'hôte. Les bactéries du microbiote, en occupant une niche écologique, apportent une résistance à la colonisation par d'autres organismes pathogènes. Le microbiote stimule également directement le système immunitaire de l'hôte (4-6). En fonction du site d'étude, le microbiote semble apporter divers avantages à son hôte. Cette relation se rapprocherait plus du mutualisme avec des bénéfices réciproques pour le microbiote et son hôte. Certains auteurs vont plus loin et émettent l'hypothèse que microbiote et hôte auraient subi une co-évolution et que leurs interactions seraient de l'ordre de la symbiose, désignant ces bactéries résidentes par le terme de symbiotes (7,8).

Le développement de la biologie moléculaire et le séquençage à haut débit ont rendu accessible l'étude de ces microbiotes dans leur globalité alors qu'elle était limitée à des évaluations ponctuelles reposant sur des méthodes de culture ne permettant pas d'apprécier la diversité et la complexité de ces écosystèmes. Ces nouvelles technologies permettent d'accéder au microbiome qui est l'ensemble du matériel génétique du microbiote et peut être perçu plus largement comme une « communauté écologique des microorganismes commensaux, symbiotes et pathogènes qui partagent notre corps humain » d'après J. Lederberg (9).

L'intérêt grandissant pour l'évaluation du microbiome a été largement soutenu et encouragé par le « Human Microbiome Project » (HMP) une initiative du NIH (National Institute of Health, institution américaine de recherche médicale) depuis 2009 et qui regroupe l'ensemble des données issues du séquençage des ARNr 16S chez l'homme. Ces informations sont disponibles sur le portail internet du HMP qui permet la coordination et le partage des données obtenues par les différentes équipes de recherche travaillant dans ce domaine (10).

Alors que le tractus génital femelle des mammifères a longtemps été considéré comme stérile, des cultures bactériennes étaient utilisées pour détecter la présence de bactéries lors de situations pathologiques. Cependant ces méthodes ont des limites et le séquençage moléculaire, soutenu par l'initiative du HMP a permis d'étudier le microbiote d'individus sains et de découvrir que certains sites que l'on pensait stérile comme l'utérus sont en réalité habités par une flore microbienne qui leur est propre (11).

1.1.2 Les méthodes de caractérisation du microbiote génital

1.1.2.1 Prélèvements et cultures

L'écouvillonnage vaginal est la technique la plus utilisée ; elle peu invasive et ne présente pas de risque particulier. La principale difficulté de l'écouvillonnage vaginal est de limiter les contaminations par le vestibule, les lèvres et le manipulateur. La vulve est nettoyée à l'aide d'un désinfectant doux. Un écouvillon d'une longueur suffisante (des écouvillons adaptés pour les chiens sont disponible dans le commerce ou bien des écouvillons pour chevaux sont également utilisables) est introduit dans le vagin au travers un speculum à lame ou alors au travers de la gaine de protection de l'écouvillon dont l'extrémité aura été préalablement coupée (utilisée alors comme un spéculum dit « de Hanovre ») (12).

L'écouvillon est frotté contre la paroi vaginale distale en appliquant des mouvements rotatoire et ensuite retiré au travers du speculum. Le prélèvement est ensuite placé dans un milieu de culture adapté ou conditionné selon les indications du laboratoire réalisant les cultures

bactériologiques. Il faut réaliser autant de prélèvements que de types de cultures souhaités. Les différentes étapes de l'écouvillonnage vaginal sont représentées dans la figure 1.



Figure 1 Ecouvillonnage vaginal (photo Camille Savatier (13))

Les prélèvements cervicaux sont réalisés selon les mêmes modalités que lors d'un écouvillonnage vaginal. Les prélèvements utérins (biopsie et/ou écouvillonnage) sont le plus souvent réalisés par laparotomie ou lors d'ovario-hystérectomie (12). Les complications sont celles inhérente à ce type d'intervention chirurgicale. Il est également possible de réaliser des prélèvements par vaginoscopie et cathétérissassions transcervicale.

La mise en culture des prélèvements doit être réalisée que cela soit lors d'une situation pathologique ou bien dans le but d'évaluer la flore normale de la chienne. Des cultures pour la recherche de germes aérobies et anaérobies ainsi que pour la recherche de *Mycoplasma* et *Ureaplasma* sont nécessaires (14–16).

Des milieux non sélectifs de type gélose enrichi avec du sang sont utilisés en conditions aérobies ou anaérobies. Il existe une grande variété de milieux, sélectifs ou non, qui peuvent être utilisés. Le temps de culture est relativement long et l'identification est réalisée après un minimum 24 à 72 heures.

Les mises en cultures présentent une faible sensibilité. En effet seulement 20% des germes associés au microbiote humains seraient cultivables avec les méthodes classiques (17). Les méthodes par culture sous-estiment donc grandement la diversité du microbiote. De plus, l'évaluation quantitative présente également un biais important car la quantité après culture dépend en grande partie des capacités de croissance des germes étudiés et elle n'est souvent évaluée que de manière semi-quantitative (ex. croissance nulle, faible, modérée ou importante).

Une solution pour évaluer au mieux la diversité du microbiote avec des méthodes de culture serait de multiplier les milieux, offrant ainsi la possibilité à chaque germe de se développer. Le plus grand nombre de germe possible pourrait être ainsi identifié sans pour autant avoir de certitudes sur la représentativité globale du microbiote obtenu. Bien entendu, pour des raisons pratiques et économiques, et compte tenu des temps de cultures pouvant être long, il semble difficilement envisageable de réaliser une telle étude à grande échelle.

1.1.2.2 RT-PCR et métagénomique

La rétrotranscription et réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR) utilise une région hypervariable du gène de l'ARNr 16S, gène qui lui est très bien conservé chez l'ensemble du vivant. L'avantage de cette technique est sa très grande spécificité. Le biais de cette technique est que l'identification repose sur des amorces spécifiques et des séquences préalablement connues chez chacune des espèces (11). Cette approche est aujourd'hui la plus utilisée pour la recherche d'agents particuliers bien qu'elle ne permette pas l'étude des génomes du microbiote dans son ensemble.

La métagénomique au sens propre n'est que très peu utilisée en médecine vétérinaire car elle est très coûteuse. Elle permet, à l'aide d'un séquenceur haut débit, de séquencer tous les ADN présents dans un échantillon et de reconstituer des génomes bactériens entiers. La technique la plus utilisée actuellement pour étudier les microbiotes est la métagénomique ciblée, elle est plus apparentée à la métagénétique (identification à l'aide la génétique des taxons présent dans un échantillon de milieu) qu'à la métagénomique au sens propre (l'étude de l'ensemble des gènes présents dans un échantillon de milieu). Le principe consiste à séquencer un seul gène commun à plusieurs espèces mais présentant suffisamment de variations interspécifiques pour distinguer les différentes espèces. En bactériologie le gène ciblé est celui de l'ARNr 16S. Les deux stratégies présentent chacune des avantages. La

métagénomique globale est plus précise et permet l'étude du microbiote dans son ensemble en séquençant l'ensemble des gènes présents (y compris les virus et champignons) pouvant donner accès à une analyse fonctionnelle du microbiome. La métagénomique ciblée est plus sélective et nécessite des moyens de traitements de données bien moindres que pour reconstituer des génomes entiers.

En bactériologie **la métagénomique ciblée** repose sur le séquençage du ARNr 16S, un gène partagé par toutes les bactéries et qui comporte des régions constantes et des régions hypervariables. Ces régions constantes vont permettre de construire des amorces pour amplifier tous les ARNr 16S tandis que les régions hypervariables, qui n'ont pas de rôle fonctionnel, permettront d'assigner chaque séquence amplifiée à un taxon connu ou non. La figure 2 représente le pourcentage de similarités entre les différentes régions du gène de l'ARNr 16S. Les régions constantes présentant une forte similarité sont représentées en oranges tandis que les régions hypervariables sont nommées et représentées en gris (de V1 à V9).



Figure 2 Similarité entre les ARNr 16S de différentes bactéries. Sous le graphique sont indiqués les différents couples d'amorces utilisables en fonction de la région séquencée (Source Sacha Schutz (17))

Ces séquences sont ensuite comparées à des bases de données existantes ou regroupée par similarité. La notion d'espèces étant difficile à définir chez les bactéries, les séquences présentant plus de 97% d'homologies sont regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (UTOs). Ce seuil peut varier selon les auteurs.

L'ensemble des séquences obtenues permet d'accéder à la diversité des bactéries présentes mais également à leurs abondances respectives via la quantité d'UTOs appartenant à une même espèce (18).

Il existe différentes méthodes pour étudier le microbiote vaginal, représentées dans la figure 3. Les méthodes reposant sur la mise en culture utilisées traditionnellement, montrent aujourd'hui leurs limites. Elles restent aujourd'hui les plus utilisées car elles sont simples à réaliser et économiques. La génétique moléculaire et les progrès techniques des dernières années ouvrent de nouvelles perspectives dans l'étude des microbiotes. Le séquençage haut débit, encore peu utilisé aujourd'hui permettra de dresser un panorama complet du microbiote. D'autres approches existent comme l'analyse de l'ensemble des ARN et protéines présents dans un milieu, respectivement le transcriptome et le protéome, qui permettent une approche fonctionnelle.

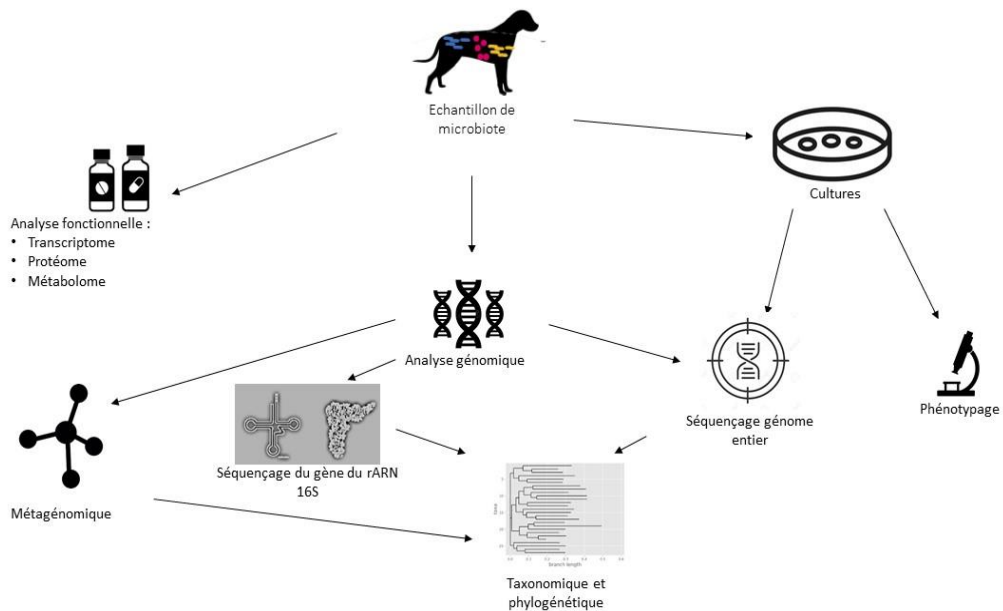


Figure 3 Les différentes méthodes d'études du microbiote (schéma d'après Pham et Lawley (18))

1.2 Le microbiote vaginal

1.2.1 Données chez la femme et les autres espèces

1.2.1.1 Microbiote de la femme

La flore vaginale est étudiée depuis la fin du XIX^{ème} siècle et la découverte de *Lactobacillus acidophilus* par le professeur Döderlein (19). Les différentes études sur la flore vaginale ont permis de dresser un panorama détaillé de la flore vaginale humaine qui diffère grandement des autres mammifères.

Une flore « normale » est dominée par des *Lactobacillus* produisant de l'acide lactique d'où un pH compris entre 3.5 et 4.5 et plus particulièrement certaines espèces produisant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ces deux éléments sont essentiels dans la résistance à la colonisation par d'autres bactéries et au maintien d'un équilibre. *L.crispatus*, *L.gasseri*, *L.jensenii*, *L.vaginalis* et *L.ines* (peu productrice d'H₂O₂) sont les cinq espèces prédominantes de la flore vaginale chez la femme. La flore « type » est cependant différente en fonction de l'origine géographique considérée. Il existe également des variations quantitatives au cours du cycle œstral au cours duquel la quantité de *Lactobacillus* atteint un minimum au moment des règles et un maximum lors de la phase lutéale. A l'inverse, les autres bactéries présentes semblent être plus nombreuses lors des règles comme *Gardnerella vaginalis* (20,21).

Il existe une grande variabilité individuelle ainsi que des flores « saines » non dominées par des espèces de *Lactobacillus*. Ce constat amène certains auteurs à avoir une approche différente et à définir une flore normale comme saine en l'absence de signes de vaginite (odeur, inconfort...) ou de problème de reproduction (17,20,21).

Il n'est pas encore établi si l'acidité (due à l'acide lactique) et la production de peroxyde d'hydrogène sont directement responsables d'effets protecteurs contre les infections et les problèmes de reproductions ou seulement des marqueurs de certaines espèces bactériennes (*Lactobacillus* ou non) ayant ce rôle protecteur (20,21).

Cette prédominance de *Lactobacillus* est spécifique à l'espèce humaine et n'a pas encore été retrouvé chez d'autres primates (22). L'origine de ce microbiote particulier n'a pas encore été clairement élucidée. Certains auteurs avancent l'hypothèse qu'un régime alimentaire riche en amidon serait à l'origine d'une forte concentration en glycogène au niveau de la muqueuse vaginale (100 fois plus importante que chez certaines espèces de primates) (23) consommé par les *Lactobacillus* pour former de l'acide lactique (20,21,24).

Les mycoplasmes sont retrouvés dans des proportions variables sans incidence sur la fertilité. La prévalence d'uréaplasmes varie entre 40 et 80%, celle de *M.hominis* jusqu'à 50% et celle de *M.genitalium* jusqu'à 5% (25–27). Bien que longtemps considérés comme

pathogènes et traités même en l'absence de signes cliniques, cette conception est remise en cause (28). Il existe entre 15 et 20 mycoplasmes présents au niveau de la muqueuse génitale de la femme.

1.2.1.2 La flore bactérienne de la chatte

La chatte semble l'animal domestique dont le mode de vie est le plus proche du chien. La flore vaginale de la chatte a pourtant été moins étudiée que celle de la chienne.

Dans la littérature, les mêmes bactéries sont isolées par les différents auteurs. Les plus fréquemment retrouvées sont des *E.coli*, des streptocoques (principalement du Groupe G de Lancefield) ainsi que des staphylocoques à coagulase négative. D'autres genres bactériens ont pu être isolés dans de faibles proportions : *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Klebsiella* et *Lactobacillus*. (29,30).

Les mycoplasmes génitaux ont été peu étudiés chez la chatte. A notre connaissance, une seule étude est disponible sur le sujet (31). Les écouvillons urogénitaux de 175 chats cliniquement sains ont permis d'isoler des mycoplasmes dans 21% des prélèvements. Les deux espèces principalement identifiées étaient *Acheloplasma laidlawii* et *Mycoplasma felis*, cependant, il n'est pas précisé la proportion de femelles dans la population étudiée.

1.2.1.3 Jument

La taille et l'anatomie de la jument rendent la flore vaginale et utérine facilement accessible. Les bactéries les plus fréquemment retrouvées sont *E.coli*, des streptocoques β -hémolytiques, des staphylocoques à coagulase négative, *Corynebacterium spp.* ainsi que d'autres coliformes. La flore vaginale est de moins en moins importante à l'approche du col utérin. Il est admis que l'utérus de la jument n'a pas de flore résidente permanente et qu'il peut être considéré stérile. La flore vaginale peut coloniser l'utérus lors de certaines situations physiologiques (coït, poulinage) ou lors de procédures médicales (écouvillonnage, transfert embryonnaire...). Cette colonisation n'est pas durable et l'utérus retrouve un état stérile rapidement (32).

Les mycoplasmes ne sont pas une problématique majeure en reproduction équine. Il existe peu d'études sur le sujet. L'espèce la plus fréquemment retrouvée est *Mycoplasma equigenitalium* (33,34). Le rôle pathogène des mycoplasmes en reproduction équine reste discuté et les affections sont peu traitées.

1.2.1.4 Vache

Comme celui de la jument, l'appareil génital de la vache est facilement accessible. Il n'existe pas de données globales sur la flore vaginale « normale de la vache ». En effet, la diversité des modes d'élevage, des races et des types de production rend impossible de caractériser une flore normale. On considère ainsi qu'une flore « normale se définit par l'absence de symptômes et de sécrétions anormales au niveau de l'appareil reproducteur.

1.2.2 Les espèces du microbiote vaginal de la chienne

Le tableau 1 regroupe les publications dont les données ont été regroupées dans le tableau 2. Dans ce paragraphe, ces études seront citées par la lettre présente dans le tableau 1 pour retrouver plus rapidement la référence étant donné le grand nombre de données présentes dans cette partie.

Code	Référence bibliographique	Année de publication	Auteurs	Titre
A	(35)	1977	Hirsh DC, Wiger N	The bacterial flora of the normal canine vagina compared with that of vaginal exudates
B	(36)	1978	Ling GV, Ruby AL	Aerobic bacterial flora of the prepuce, urethra, and vagina of normal adult dogs
C	(16)	1978	Olson PN, Mather EC	Canine vaginal and uterine bacterial flora
D	(37)	1982	Allen WE, Dagnal GJR	Some observations on the aerobic bacterial flora of the genital tract of the dog and bitch
E	(38)	1983	Baba E, Hata H, Fukata T, Arakawa A	Vaginal and uterine microflora of adult dogs
F	(39)	1983	Blunden AS	Isolation of clostridium perfringens form the canine genital tract
G	(40)	1992	Bjurström L, Linde-Forsberg C	Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches
H	(41)	1996	Watts JR, Wright PJ, Whithear KC	Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle
I	(42)	2001	Msheila GD, Amin JD, Chaudhary SUR	Bacterial flora of Nigeria local bitches during different stages of the reproductive cycle
J	(43)	2003	Findik M	The relationship between the stages of the sexual cycle, the pregnancy and postpartum periods and vaginal flora in Kangal breed bitches
K	(44)	2003	Noguchi K, Tsukumi K, Urano T	Qualitative and Quantitative Differences in Normal Vaginal Flora of Conventionally Reared Mice, Rats, Hamsters, Rabbits, and Dogs
L	(45)	2004	Günay Ü, Günay A, Ülgen M, Özel AE	Investigation of the Vaginal Bacterial Flora at Different Stage of Sexual Cycle in the Bitch
M	(46)	2012	Maksimović A, Filipović S, Rifatbegović M, Maksimović Z, Beširović H	Vaginal and uterine bacteria of healthy bitches during different stages of their reproductive cycle
N	(47)	2014	Hutchins RG, Vaden SL, Jacob ME, Harris TL, Bowles KD, Wood MW	Vaginal Microbiota of Spayed Dogs with or without Recurrent Urinary Tract Infections
O	(48)	2012	Groppetti D, Pecile A, Barbero C, Martino PA	Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility

Tableau 1 Codes et références bibliographiques des études portant sur le microbiote vaginal de la chienne utilisées dans le tableau 2

1.2.2.1 La microflore isolée par culture

Les premières données sur la présence d'une flore vaginale commensale chez la chienne remontent aux années 1930, la présence de streptocoques bêta-hémolytiques est confirmée chez des chiennes en bonne santé (D). Il existe peu d'études disponibles sur l'exploration de la microflore normale chez la chienne et aucune étude à grande échelle ou méta-analyse.

- Cultures négatives :

La proportion de prélèvements négatifs peut s'élever jusqu'à 39% (C, H). Cependant il est peu probable que la muqueuse vaginale soit complètement stérile étant donnée la proximité avec l'anus et la continuité entre la muqueuse vaginale et la peau.

D'après Bjurström (40), cette proportion élevée de cultures négatives peut s'expliquer par différents facteurs comme la technique de prélèvement ou la multiplicité des milieux de cultures. En effet l'utilisation d'un écouvillon non humidifié mais également les produits désinfectants appliqués avant le prélèvement peuvent limiter le transfert de bactéries sur le matériel de prélèvement, d'autant plus si le prélèvement est réalisé en région vaginale postérieure (36). Au cours de certaines études, seuls les germes aérobies sont recherchés (16,36,37,40) ce qui pourrait expliquer un certain nombre de cultures négatives. De plus nous remarquons dans la littérature que de forts taux de cultures négatives se retrouvent plus fréquemment lorsque peu de milieux de cultures différents sont utilisés. Dans l'étude de Watts et al. (41), les auteurs n'utilisent qu'un seul milieu de culture (ainsi qu'un milieu spécifique pour la culture des mycoplasmes) et obtiennent la plus grande proportion de cultures négatives, tandis que d'autres études utilisant un grand nombre de milieux présentent des taux de cultures négatives très inférieurs.

D'autres facteurs comme des traitements antibiotiques inconnus des auteurs au moment du prélèvement peuvent expliquer ces cultures négatives, nous aborderons ces variations plus loin dans notre étude. Ces proportions variables de cultures négatives soulignent l'intérêt d'utiliser des méthodes de détections plus sensibles que les simples cultures.

- Nombre d'espèce isolés par prélèvement :

Peu d'études rapportent le nombre d'isolats par prélèvement (35,36,40,42,47,48) mais celui-ci n'excède jamais 5 espèces bactériennes avec une moyenne toujours inférieure à 2.3 isolats par chienne. Ces études ne recherchent pas les bactéries anaérobies et n'utilisent qu'un nombre limité de milieux de culture. Les autres études rapportent souvent que la plupart des cultures sont pures, ou avec deux isolats sans plus de détails. Or il est admis que la flore

vaginale est composée d'un grand nombre d'espèces bactériennes. Les bactériologies vaginales réalisées lors d'une situation pathologique sont considérées positives lorsque moins de trois germes sont cultivés, on admet alors qu'un ou deux germes ont pris le pas sur le reste de la flore bactérienne. L'isolement en culture pure (ou double) de bactéries potentiellement pathogènes (*E.coli*, *P.multocida*, *Streptococcus spp....*) chez des chiennes saines et apparemment fertiles souligne donc le caractère pathogène opportuniste de ces bactéries mais également les limites des méthodes de cultures qui ne permettent pas de représenter la richesse de la flore vaginale.

- Espèces identifiées :

Les espèces les plus souvent identifiées par culture chez des chiennes *a priori* saines sont *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Corynebacterium spp.* et *Proteus mirabilis* (16,35–37,41–43,45,46). Moins fréquemment on peut retrouver d'autres espèces comme *Citrobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Neisseria spp.* *Pseudomonas aeruginosa*, *Hemophilus spp.* (42,45,46). Les mycoplasmes sont également fréquemment isolés mais ne sont pas systématiquement recherchés, nous aborderons ce sujet ultérieurement.

Références	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Micro-organisme															
Aérobies et anaérobies facultatifs									7						
Streptocoques											46				
Str. β-hémolytiques			15,2	23			47,5			6,8			20	26	23
<i>S. agalactiae</i>					26							3,5			
<i>S. anginosus</i>					18										
<i>S. canis</i>	19	35						8,3							
<i>S. equi zooepidermicus</i>	4														
Str. Ou entérocoques α-hémolytiques/non hémolytiques			13,9				14,9			29,1			27,5		
Streptococcus "viridans"	29	20													
<i>S. bovis</i>				1	4										
<i>E. faecalis</i>	8	5		15	5									17	35
<i>E. faecium</i>					1			5,6							
Autres	5			23	8									21	4,7
Staphylocoques											33				
Staph. Coagulase positif			6,3		4		4,1	2,7							
<i>S. aureus</i>	27	70		19						18,4		5,3	2,5		
<i>S. pseudintermedius</i>							4,1	2,7				5,3	5	26	
Staph. Coagulase négatif			6,3		20		2,1		43					32,5	
<i>S. epidermidis</i>	13	5		1						27,2					
Non identifié												3,5			
<i>E. coli</i>	45	25	19	47			31,8	33,3		72,8		16	25	13	11,6
Proteus															
<i>Proteus mirabilis</i>	13	5					4,8	8,3						4	2,3
<i>Proteus spp.</i>			5,1	20	9				15	3,9			15		
Pasteurella															
<i>Pasteurella spp.</i>	2	5	10,1		34		7,2	5,6		1			7,5	4	
<i>Pasteurella multocida</i>	4			26			59,6								9,3
Pseudomonas							0,7	2,7							
<i>P. aeruginosa</i>		5													9
<i>P. fluorescens</i>	2														
<i>Pseudomonas spp.</i>	2														
Hemophilus sp.			1,3		7			30,6							
Moraxella sp.	2	10	1,3												
Actinobacter sp.					1					4,9					
Neisseria sp.			2,5							1,9			2,5		
Corynebacterium sp.	11	35	2,5		6		3	5,6	32	1	24		10	4	
Citrobacter sp.					1					6,8		23,1			
Enterobacter sp.	2	5	1,3		1					3,9	21	3,5		9	
Flavobacterium sp.	4	5	1,3							1,9					
Bacilles gram + non identifiés					13										
Bacilles gram - non identifiés	4				30						29				
Coques gram + non identifiés					4										
Klebsiella															
<i>K. pneumoniae</i>		5										7,1			2,3
<i>Klebsiella spp.</i>									10	1		14,2			
Micrococcus sp.			1,3		7			5,6							
Bacillus sp.	2		3,8		2						1	5,3		9	
Diphthéroïdes				12											
Anaérobies															
Peptocoques					27										
Bacteroidaceae					55						22				
Bifidobacterium					1										
Bacilles gram - non identifiés					1										
Bacilles gram + non identifiés					6						8				
Coques gram + non identifiés											9				
Clostridium					1	20					7				
Lactobacillus					6						34				
Mycoplasmes		30			43		8,8								
Cultures négatives	4	0	37	14	4		5,2	38,9			0				20,9

Tableau 2 Résultats des différentes études portant sur le microbiote vaginal de de chiennes ne présentant pas de troubles de la reproduction (les résultats sont exprimés en pourcentages des prélèvements réalisés, les références des études sont indiquées dans le tableau 1

1.2.2.1.1 Bactéries aérobies et anaérobies facultatifs

On retrouve une grande variété de bactéries aérobies car elles sont systématiquement recherchées (16,35–45,47,48). Nous allons détailler les genres les plus fréquemment isolés. Les données citées dans cette partie sont résumées dans le tableau 2.

- Streptocoques et entérocoques :

Ces bactéries sont des cocci à Gram positif anaérobies facultatifs, que l'on retrouve sur la peau et les muqueuses de la plupart des mammifères. Ces organismes sont des pathogènes opportunistes et provoquent des infections pyogènes. Ils sont classés selon leurs antigènes de surface (classification de Lancefield) mais sont plus couramment distingués par leurs actions sur les globules rouges : streptocoques β -hémolytiques et les streptocoques et entérocoques α - et γ - (ou non) hémolytiques (49).

Les streptocoques font partie des bactéries isolées le plus fréquemment chez les chiennes sans trouble de l'appareil reproducteur : elles sont retrouvées chez 30 à 60% des chiennes selon les études (16,35–38,41–47). D'après Björstom et al. (40), qui réalisent des prélèvements réguliers sur une période de 18 mois chez 59 chiennes, les streptocoques sont isolés au moins une fois chez presque toute les chiennes de l'étude (Streptocoques β -hémolytiques chez 90% des chiennes, 47.5% des prélèvements totaux).

Les streptocoques β -hémolytiques sont les plus fréquemment isolés sur la muqueuse vaginale de la chienne. Ils peuvent être retrouvés dans jusqu'à 47.5% de prélèvements (chez 90% des chiennes) d'après Björstom et al. (40). D'autres auteurs les isolent dans des proportions moindres, entre 6 et 38% des prélèvements réalisés mais ils sont systématiquement retrouvés (A, B, C, D, E, H, I, J, K, L, M, N,52). Les espèces les plus souvent retrouvées sont *S. canis* (groupe G de la classification de Lancefield), *S. agalactiae* (groupe B), *S. equi subs. zooepidermicus* (groupe C) et *S. anginosus* (pouvant appartenir à plusieurs groupes de la classification). Les streptocoques du groupe G sont les plus fréquemment isolés sur la peau et les muqueuses des chiens, ils sont considérés comme commensaux et pathogènes opportunistes et sont régulièrement isolés lors de pyomètre (49). *S. agalactiae* et *S. equi subs. zooepidermicus* ont été initialement isolés respectivement chez les bovins et chez les chevaux. Ils sont responsables chez ces espèces de mammites et d'infections du tractus respiratoire supérieur. Ils sont fréquemment isolés chez le chien dans de nombreuses infections (49).

Les streptocoques et les entérocoques α - et γ - hémolytiques sont moins fréquemment isolés sur la muqueuse vaginale ; ils sont isolés dans moins de 30% des prélèvements dans chaque étude (16,35,40,43,46) et seulement 8.7% des chiennes d'après Björstom et al.(40).

Les espèces les plus fréquemment retrouvées appartiennent au genre *Enterococcus* (35–38,41) et sont considérées comme des germes commensaux du tractus digestif chez le chien et que l'on peut isoler lors d'infection du tractus urinaire (49).

- **Staphylocoques :**

Les staphylocoques sont des cocci non sporulés anaérobies facultatifs à Gram positif faisant partie de la flore commensale de la peau et des muqueuses d'un très grand nombre d'espèces de mammifère. Ils sont pathogènes opportunistes notamment en cas d'immunodépression. De nombreuses espèces sont également présentes dans l'environnement où elles peuvent survivre plusieurs mois (51). Les staphylocoques sont repartis en deux catégories selon la production ou non de l'enzyme Coagulase (Coag + / Coag -) jouant un rôle important dans la pathogénie de ces bactéries.

Les staphylocoques Coag + sont plus fréquemment isolés. On les retrouve dans des proportions variables mais ils sont isolés par tous les auteurs. Leur fréquence varie de 2.5% des prélèvements jusqu'à 70% chez Ling et Ruby (36). Néanmoins chez Björstom et al (40), même si ils ne sont isolés dans seulement 4.1% des prélèvements au cours de l'étude, ils sont retrouvés chez 33.9% des chiennes au cours de cette étude longitudinale. On rencontre deux espèces à coagulase positive que sont *S.aureus* et *S.pseudintermedius*. *S.aureus* est la plus fréquemment isolée dans respectivement 18% (43) , 19% (37), 27% (35) des prélèvements et jusqu'à 70% que l'on retrouve chez Ling et Ruby (36). *S.pseudintermedius* est isolée dans 4 à 26% des études (40,41,45–47). *S.aureus* est régulièrement isolée sur d'autres localisations anatomiques chez l'homme et assez peu chez le chien contrairement à *S.pseudintermedius* qui est très fréquemment isolée sur différents site chez le chien (51). Les staphylocoques Coag+ sont responsables d'infections pyogènes, notamment au niveau du tractus uro-génital (51).

Les staphylocoques Coag – sont isolés moins fréquemment sauf par Baba et al. (38), Msheila et al.(42) et Maksimovic et al.(46) qui les isolent dans respectivement 20%, 43% et 32.5% des prélèvements. La seule espèce identifiée est *S.epidermidis*.

- ***Corynebacterium***

Le genre *corynebacterium* regroupe des bacilles à Gram positifs responsables d'infections suppuratives ainsi que d'infections urinaires chez le chien (52). Il est isolé dans la plupart des études dans une faible proportion des prélèvements, néanmoins Ling et Ruby (36) ainsi que Msheila et al.(42) l'isolent dans plus de 30% des prélèvements.

- ***Escherichia coli***

E. coli est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des Entérobactériaceae, commensale du tractus digestif de tous les mammifères. Elle est la cause la plus fréquente d'infection du tractus urinaire chez la chienne et peut être responsable de pyomètre ou septicémie néonatale ainsi qu'un grand nombre d'infections de différents organes (53).

E. coli est une des espèces bactériennes les plus fréquemment isolées dans les différentes études. Elle figure toujours parmi les 3 espèces les plus fréquemment isolées chez les chiennes sans trouble de la reproduction. Sa fréquence d'isolement varie de 13 à 73% des prélèvements selon les études (16,35–37,40,41,43–47). Dans l'étude de Björstom et al. (40), les *E.coli* sont isolées chez 85% des chiennes. La diversité des différents isolats d'*E.coli* est également étudiée : 11 phénotypes sont identifiés (77% des souches appartiennent au même phénotype). Elle tient un rôle important dans la microflore vaginale de la chienne.

- Autres Entérobactériaceae :

Les genres *Proteus* et *Klebsiella* font également partie des Entérobactériaceae et appartiennent à la flore digestive des mammifère (53).

Proteus mirabilis est la seule espèce du genre identifiée. Elle est isolée chez la plupart des auteurs entre 4 et 20% des prélèvements. Les *Proteus* sont des pathogènes opportunistes. Ils sont fréquemment isolés lors d'infection du tractus urinaire (53).

Les *Klebsiella* ne sont retrouvées que chez quelques auteurs (36,42,43,45). Elles sont isolées dans une faible proportion des prélèvements (jusqu'à 14.2%). L'espèce la plus fréquemment isolée est *Klebsiella pneumoniae* qui est un pathogène opportuniste fréquemment isolé lors d'infection du tractus urinaire. Sa capsule inhibant la phagocytose est un facteur de virulence majeur (53).

- Pasteurelles :

Le genre *Pasteurella* appartient à la famille de Pasteurellaceae. Ces bacilles ou cocci non motiles appartiennent à la flore commensale de la cavité orale et de l'appareil respiratoire supérieur du chien et du chat (53). La seule espèce identifiée sur la muqueuse vaginale est *Pasteurella multocida* qui est également la plus commune lors d'infection chez le chat et le chien. On la retrouve dans de nombreuses études dans des proportions variables : moins de 10% des prélèvements par différents auteurs (16,35,36,41,43,46,47), 26% (37) et 34% (38). Dans l'étude longitudinale de Björstom et al.(40), *Pasteurella multocida* est présente dans 59.6% des prélèvements et 98.3% des chiennes. Bien qu'isolée dans de nombreuses affections (pyothorax, atteintes respiratoires haute, infections du tractus urinaire, pyomètre, abcès

cutanée, bactériémie, infection néonatale, avortement) (53), *Pasteurella multocida* semble avoir une part importante dans la flore vaginale de la chienne.

1.2.2.1.2 Bactéries anaérobies strictes

Peu d'études réalisent des cultures dans des conditions anaérobies strictes, bien qu'elles semblent jouer un rôle important sur les muqueuses des mammifères et dans de nombreuses infections de l'appareil génital (54). Seule trois études recherchent les germes anaérobies stricts, l'une de ces études est une recherche spécifique de *Clostridium* (38,39,44).

Baba et al.(38) et Noguchi et al.(44) isolent des germes similaires.

Les Bacteroidacés font partie des germes les plus souvent isolés respectivement dans 55% et 22% des prélèvements et font parties des bactéries le plus souvent isolées dans ces deux études.

Les *Clostridium*s sont également isolés. Ceux-ci représentent respectivement 1 et 7% des prélèvements alors que Blunden al.(39) qui les recherchent spécifiquement les retrouvent dans 20% des prélèvements. Ce dernier résultat peut être surestimé par le caractère très spécifique des cultures réalisées alors que la présence de ces bactéries peut être sous-estimée les autres auteurs.

On retrouve également des *Lactobacillus*. Ils ne sont présents que dans 6% des prélèvements dans l'étude de Baba et al. (E) mais 34% dans l'étude de Noguchi et al. (K). Ce dernier résultat est à mettre en perspective avec l'analyse quantitative réalisée dans cette étude : bien que présents à une fréquence élevée dans les prélèvements, ils ne sont présents qu'à une concentration de $10^{2.5}$ CFU/vagin alors que les autres bactéries fréquemment isolées dans l'étude (*Bacteroides*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*) le sont à une concentration supérieure à 10^5 CFU/vagin. C'est une différence majeure avec la flore vaginale de la femme qui est dominée par les *Lactobacillus*. Cette différence expliquerait la différence de pH qui est bien plus bas chez la femme que chez la chienne (4-5 chez la femme contre 6-9 chez la chienne).

Baba et al. (E) isolent également *Bifidobacterium* (1%) et des peptocoques (27%).

Les bactéries anaérobies sont connues pour jouer un rôle important sur les muqueuses des mammifères. Elles participent à la régulation des espèces aérobies (obligatoires et facultatives) ainsi qu'à la bonne fonction barrière normale de la muqueuse. Cependant ces germes sont également des pathogènes opportunistes, les peptocoques ainsi que les bactéroïdacés sont fréquemment responsables de pyomètres et on les retrouve souvent lors d'infections mixtes avec d'autres espèces anaérobies ou aérobies.

1.2.2.1.3 Les mycoplasmes

Les mycoplasmes sont commensaux de la muqueuse vaginale de la chienne. On les retrouve dans trois études qui ne les recherchent pas spécifiquement dans 8.8 à 43% des études(36,38,40). Nous étudierons le sujet de la place qu'occupent les mycoplasmes dans la flore vaginale normale de la chienne dans un paragraphe dédié.

1.2.2.2 Le microbiote vaginal identifié par les techniques de génétique moléculaire

Les méthodes de culture échouent à isoler plus de 90% des espèces du microbiote et sous-estiment la diversité tout en favorisant les espèces « cultivables » (55,56). Il apparaît alors nécessaire d'utiliser les techniques de génétique moléculaire de nouvelles générations, plus sensibles que les cultures pour évaluer la flore commensale. A ce jour aucune étude métagénomique (au sens strict) n'est disponible chez le chien. Cependant deux études récentes explorent le microbiote du tractus génital de la chienne en utilisant la métagénétique.

Lyman C. et al (57) ont étudié le microbiote vaginal et utérin en séquençant la région V4 de l'ARNr 16S chez 25 chiennes *a priori* en bonne santé et n'ayant reçu aucun traitements antibiotiques. Dans cette étude l'identification est réalisée jusqu'au genre et non pas jusqu'à l'espèce. Au total 254 genres (les séquences sont regroupés en UTOs de genre pour 97% d'homologie) ont été identifiés au niveau de la muqueuses vaginale révélant une diversité (nombre d'espèce) bien plus importante que les études basées sur des cultures le laissent supposer. Dans cette étude trois genres représentent 59% des organismes identifiés sur la muqueuse vaginale : *Hydrothela* (25%), *Ralstonia* (20.8%) et *Mycoplasma* (13.2%). Ces trois genres étant présents dans 100% des prélèvements.

Hydrothela est un bacille aérobie à Gram négatif du phylum des Bactéroïdètes isolé chez des espèces aquatiques (58).

Ralstonia appartient à la famille des *Burkholderiaceae*. Certaines des espèces de ce genre ont longtemps été classifiées comme des *Pseudomonas*. Ces bactéries ne sont pas connues pour être pathogènes et sont souvent isolées sur des plantes.

Les genres isolés lors des études basées sur des cultures sont également retrouvés dans cette étude mais dans de faibles proportions :

- Le genre *Streptococcus* ne représente que 4.4% de la population bactérienne totale ;
- *Staphylococcus* compte pour 1.5% de la population ;
- *Enterococcus* pour 0.006% ;

- de nombreux genres parmi les plus fréquemment isolés (*Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*...) représentent chacun moins de 1% de la population ;
- étonnamment ni *Proteus* ni *Escherichia* n'ont été retrouvés dans les prélèvements vaginaux.

La figure 4 représente la répartition d'attributions des UTOs séquencés à des genres bactériens.

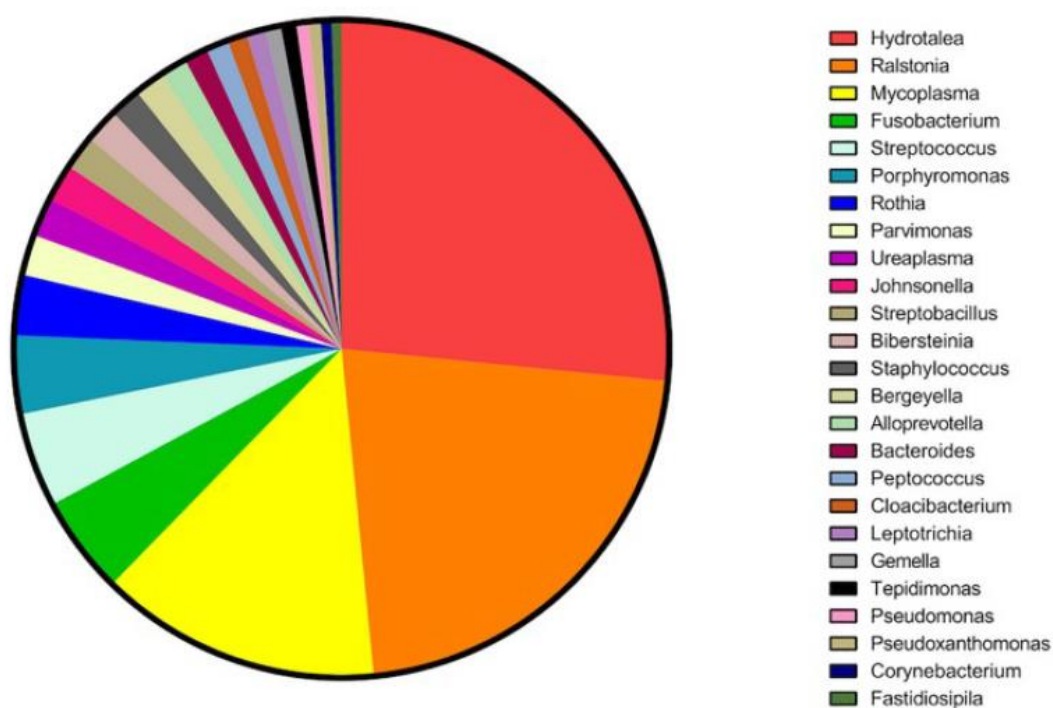


Figure 4 Attribution des UTOs séquencés à partir d'écouvillons vaginaux dans l'étude de Lyman et al. (55) à différents genres taxonomiques, seuls les 25 genres les plus abondants sont représentés (Source : Lyman et al.)

La deuxième étude utilisant cette technique de séquençage compare le microbiote vaginal et utérin de 5 chiennes saines et de 5 chiennes présentant un pyomètre (59). Dans cette étude la séquence ciblée est plus grande (région V1-V4) mais appartient toujours à l'ARNr 16S. L'étude présente la population bactérienne à différents niveaux de classification (selon l'homologie des UTOs, respectivement 75, 80, 85, 90, 94 et 97% pour les phylum, classes, ordres, familles, genres et espèces). L'identification semble donc *a priori* moins précise que dans l'étude de Lyman et al.(57) (UTOs pour un genre : 97% d'homologies). Les résultats en

fonction des genres sont très différents : 77.3% des séquences identifiées appartiennent au genre *Enterobacter*, moins de 1% aux genres *Mycoplasma* et *Klebsiella*, le reste des séquences ne pouvant être attribué à un genre.

Ces deux études remettent en cause la composition de la flore vaginale établie par les méthodes basées sur les cultures. Ces résultats sont récents et s'appuient sur un faible nombre d'individus (moins de 25). Il est important de souligner l'importante variabilité individuelle présente dans ces deux études qui est un frein à l'établissement d'un microbiote « type ». La comparaison avec les études précédentes est difficile car les cultures ne favorisent que certaines bactéries. Ces deux études ne nous présentent pas certains résultats comme le nombre d'UTOs identifiés en moyenne par individus, rendant difficile l'analyse des données. Nous n'avons pas de détails sur la méthode utilisés pour comparer les séquences obtenues aux bases de données et ainsi attribuer un genre aux séquences.

La variabilité de résultats entre chaque étude nous amène à formuler le constat qu'un microbiote normal ne peut être clairement défini. A l'inverse un microbiote sain c'est-à-dire tout microbiote garantissant à son hôte l'absence de signe clinique et des fonctions reproductives normales semble plus pertinent à définir.

1.2.3 Les mollicutes

Dans ce paragraphe nous aborderons la part que peuvent prendre les mollicutes dans la flore vaginale normale de la chienne. Les mollicutes, présents chez les mammifères, appartiennent à la famille des *Mycoplasmataceae* qui regroupe les genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. La distinction entre ces deux genres n'est pas toujours faite dans les études et nous désignerons par le terme mycoplasme, les bactéries isolées appartenant à la famille des *Mycoplasmataceae* sans autres précisions.

Les mycoplasmes ont été isolés au niveau du tractus génital de la chienne dès 1951 (60). Il n'y a que peu d'études sur la présence de mycoplasmes chez le chien et seulement une petite partie s'intéressent au tractus génital.

Plusieurs études ne parviennent pas à isoler des mycoplasmes malgré l'utilisation de milieux spécifiques (41,45,48). Cette absence peut s'expliquer par différents facteurs comme les conditions de prélèvements, le site de prélèvement (vagin antérieur ou vestibule) et les milieux de cultures qui varient d'une étude à l'autre.

La prévalence de mycoplasmes au niveau de la muqueuse vaginale varie selon les études de 9 à 100%. Cette grande variabilité s'explique par les méthodes d'échantillonnage ainsi que les techniques utilisées pour rechercher ces mycoplasmes.

Les mycoplasmes lorsqu'ils sont recherchés font partie des organismes les plus fréquemment isolés par culture (38,41). L'identification n'est cependant pas réalisée jusqu'au niveau de l'espèce. L'étude de Lyman et al.(57) qui se base sur la métagénomique en utilisant le séquençage haut débit retrouve des séquences appartenant au genre *Mycoplasma* chez toute les chiennes prélevées.

Certaines études portent uniquement sur la recherche des mycoplasmes et identifient les espèces (critères biochimiques pour les études utilisant des cultures, amorces spécifiques pour les études se basant sur la PCR). Ces études ont permis d'isoler plusieurs espèces qui sont résumées dans le tableau 3.

	Etudes portant sur les mycoplasmes					Etudes sur la microflore vaginale globale				
	(61)	(62)	(63)	(64)	(65)	(36)	(38)	(40)	(59)	(57)
Méthode d'isolement	Culture	Culture	Culture	PCR spécifique <i>M. canis</i>	PCR spécifique <i>M. canis</i> , <i>M. cynos</i> , <i>M. edwardii</i> <i>M. maculosum</i> <i>M. spumans</i>	Culture	Culture	Culture	Pyroséquencage	Séquencage haut débit
<i>M. canis</i>	31	34	62	42	21					
<i>M. cynos</i>		10	8							
<i>M. maculosum</i>	19		15							
<i>M. spumans</i>	6		15		4					
<i>M. edwardii</i>			19		2					
<i>M. molare</i>			4							
<i>M. bovis genitalium</i> (et affiliés)		7								
mycoplasmes non identifiés		12	19		10	20	43	9	20	100
<i>Ureaplasma</i>			42							

Tableau 3 Taux de prévalence d'isolement des différentes espèces de mycoplasmes chez des chiennes ne présentant pas de trouble de la reproduction (résultats en pourcentage des prélèvements réalisés dans chaque étude)

M.canis est ainsi l'espèce la plus fréquemment retrouvée au niveau de la muqueuse vaginale des chiennes saines avec un taux de prévalence variant de 21 à 62% chez les chiennes testées (62–66).

Les autres espèces principalement retrouvées sont *M.cynos*, *M.maculosum*, *M.spumans* et *M.edwardii* pour un taux de prévalence variant entre 2 et 20% chez les chiennes testées. La pathogénicité de *M.cynos* est prouvée lors d'infection respiratoire, les autres espèces sont régulièrement isolées lors de telles infections sans que leur rôle pathogène soit prouvé (67).

D'autres espèces ont pu être isolées moins fréquemment au niveau du tractus génital de la chienne : *Acheloplasma laidlawi*, *M.felimutum*, *M.gatae* (68).

Le genre *Ureaplasma*, capable de métaboliser l'urée, est isolé dans quelques études chez la chienne (63,69,70) dans 15 à 43% des prélèvements. Il n'y a pas d'information disponible sur les espèces présentes chez le chien. C'est un pathogène du tractus urogénital reconnu chez la femme mais il existe peu d'information sur des infections à *Ureaplasma* chez le chien.

Les études de Doig et al. (63) et Rosendal et al. (61) indiquent également que la moitié des chiennes testées présentent une flore mixte avec au moins deux espèces de mycoplasmes cultivées. Les *Ureaplasma* sont toujours cultivés en présence d'une autre espèce de mycoplasme.

Malgré le peu d'étude et la difficulté à les comparer étant données les différentes techniques utilisées, il semble que les mycoplasmes occupent une place importante dans la microflore vaginale de la chienne en bonne santé. Néanmoins les connaissances sur les mycoplasmes présents chez la chienne restent limitées ; peu d'études vont identifier les espèces et souches présentes. Or, comme nous le verrons par la suite les mycoplasmes sont régulièrement isolés lors de situations pathologiques ou lors d'infertilité, et ce manque de connaissance peut amener à des erreurs de diagnostic ainsi que la mise en place de traitements antibiotiques délétères pour la flore vaginale normale. Des investigations sont encore nécessaires pour connaître plus finement le rôle des mycoplasmes dans la flore vaginale.

1.2.4 Variations physiologiques du Microbiote

1.2.4.1 Age et activité sexuelle

- Chez les chiennes prépubères

Olson et Mather (16) comparent les chiennes prépubères (2 groupes âgés respectivement de 1 à 12 semaines et de 12 semaines à 6 mois) et pubères. Les espèces isolées et le nombre d'isolats par chienne sont similaires. Il y a une prévalence significativement beaucoup plus forte des staphylocoques à coagulase positive chez les chiennes prépubères. Les auteurs observent une absence de pasteurelles chez les jeunes alors qu'elles sont isolées chez 32% des adultes. Ces auteurs n'indiquent pas d'autres différences remarquables. Cependant chez les jeunes on ne s'intéresse qu'au vagin postérieur donc la flore est probablement une sorte de « transition » entre la flore cutanée et vaginale « vraie ».

Une étude très récente suggère que le microbiote des nouveau nés serait lié au microbiote vaginal de la mère. Le premier serait influencé par les modalités de naissance (voie basse ou intervention césarienne). La mise en place de la flore vaginale chez le juvénile se ferait lors de la gestation à partir de la flore vaginale de la mère (71).

- Activité sexuelle

Une seule étude permet s'intéresse aux effets que peuvent avoir les rapports sexuels sur la flore de chienne. Allen et Dagnall (37) ont ainsi observé chez deux chiennes que la flore vaginale est modifiée après les rapports en faveur d'espèces que l'on isole sur le prépuce des étalons utilisés pour les saillies. En revanche ces modifications sont transitoires.

- Effet de la stérilisation :

Il n'y a pas de différences d'après Ling et Ruby (36). Maksimovic et al. (65) observent des prévalences similaires chez les chiennes stérilisées et entières.

1.2.4.2 Cycle hormonal

Olson et Mather (16) ne trouvent pas de différences significatives qualitatives ni de variations des prévalences lors du cycle hormonal. Maksimovic et al. (46) n'observent également pas de différences qualitatives dans la flore vaginale en fonction du cycle. Ces mêmes auteurs dans une autre étude, relèvent une prévalence des mycoplasmes constantes au cours du cycle hormonal (65). Ces observations ne sont pas confirmées par les autres travaux sur la flore vaginale de la chienne. Ce manque de variations peut s'expliquer par des

méthodes de culture peu spécifiques et par des observations partielles (pas d'évaluation quantitative des différentes bactéries isolées).

Baba et al. (38) notent une différence quantitative dans les bactéries isolées. La période regroupant le proestrus et l'œstrus est marquée par une plus grande quantité de bactéries que les autres phases (différences significatives exceptée la différence avec le métoestrus) et l'anoestrus par la plus basse (différences significatives avec la gestation et le post partum).

L'étude réalisée par Björstrom et al. (40) est l'une des plus poussées. La même population est suivie sur 18 mois. Les auteurs ne notent pas de différences dans le nombre d'espèces isolées par chienne ni dans la composition des cultures mixtes. En revanche *P.multocida* est isolée plus fréquemment pendant les périodes de proestrus, oestrus, metoestrus et lors de gestation que pendant l'anœstrus et le post-partum ($P < 0.001$), ce qui est expliqué, d'après l'auteur, par la présence de sérum qui favorise sa croissance. Les streptocoques β -hémolytiques sont retrouvés plus souvent pendant le proestrus que pendant l'œstrus, la gestation et le post-partum, probablement en raison de la présence de sang. Les entérocoques sont isolés plus fréquemment lors du post-partum que lors des autres phases, à l'exception de l'anœstrus. Les staphylocoques ne sont isolés que lors du post-partum. Leur croissance est probablement favorisée par des dérèglements génitaux, comme un écoulement utérin, des lésions vaginales et une plus grande communication avec la peau pendant la mise-bas. Les staphylocoques sont également plus souvent retrouvés chez les chiots que chez les chiennes adultes (16). *E.coli* est isolé à la même fréquence dans les différentes phases.

Selon Watts et al.(41) les cultures sont plus souvent positives en proestrus et oestrus que pendant le reste du cycle. Cette différence est significative.

Noguchi et al.(44) observent que la charge bactérienne de la muqueuse vaginale est plus importante pendant l'œstrus que pendant les autres phases, et ce de façon significative ($P < 0.0001$) avec une différence allant jusqu'à un facteur 10^4 . Le ratio des bactéries anaérobies et aérobie reste stable au cours du cycle. Cette augmentation de la charge bactérienne pendant l'œstrus est causée par une plus grande prévalence et une plus grande quantité des bactéries prédominantes (Entérobactéries, Streptocoques, *Bacteroides*...). La flore vaginale serait ainsi plus riche (plus d'espèces) lors du dioestrus et lors de l'anoestrus : *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Clostridium* ainsi que des bacilles à Gram négative anaérobies ne sont isolés que lors de ces phases. Le microbiote semble également plus diversifié lors du dioestrus et lors de l'anœstrus que pendant l'œstrus. En effet la représentation de chaque espèce bactérienne présente étant plus régulière que lors de l'œstrus au cours duquel le microbiote est dominé par un petit nombre d'espèces.

Lyman et al. (57) étudient de façon précise la richesse et la diversité de la flore vaginale au cours du cycle. Deux indicateurs sont utilisés pour évaluer la diversité et les variations de la flore vaginale. La méthode ACE permet d'estimer la richesse spécifique, c'est à dire le nombre d'espèces présentes dans une population à partir des données d'un échantillon (72). L'indice de Shannon est un indicateur de la diversité biologique d'un milieu. Cet indice prend en compte la richesse spécifique ainsi que l'équitabilité spécifique (abondance des individus au sein de chaque espèce), il permet ainsi de mesurer l'entropie d'un milieu, plus cet indice est élevé, plus le milieu est hétérogène (73). C'est bien pendant l'oestrus et le dioestrus que ces deux indices sont les plus élevés. En revanche ces différences ne sont significatives qu'entre l'oestrus et la période prépubère.

Il semblerait donc que la flore vaginale évolue au cours du cycle œstral de la chienne. La plupart des études vont dans le sens d'une flore plus riche et diversifiée lors de l'oestrus, la prévalence de prélèvements négatifs étant plus basse et la charge bactérienne plus importante notamment pour les espèces les plus fréquemment retrouvées. Ce phénomène peut s'expliquer par les changements au niveau de la muqueuse vaginale au cours du cycle. La présence de sang et de sérum, ainsi que l'augmentation des sécrétions de mucus au cours du proestrus et de l'oestrus peuvent agir comme des milieux de cultures enrichis et favoriser une croissance bactérienne plus importante. De plus la baisse d'immunité (observable au frottis par la disparition des leucocytes) sous l'effet de la progestérone modifierait l'équilibre entre la flore vaginale et l'immunité de l'hôte en faveur de la population bactérienne. D'autres facteurs physico-chimique (modifications du pH, ouverture du col utérin etc..) peuvent également influencer les variations de la flore vaginale au cours du cycle œstral.

En revanche les études se basant sur des cultures mettent en évidence un nombre d'espèces moins important lors de l'oestrus tandis que les auteurs utilisant des techniques de métagénomiques avancent le contraire (57). Cette perte de diversité peut s'expliquer par une des limites des méthodes de culture ; les organismes présents en grande quantité et facilement cultivables sont favorisés, rendant difficile l'isolement de germes présents en plus faible quantité ou plus difficilement cultivables. Ces données auraient besoin d'être confirmées par d'autres études sur des effectifs plus importants.

Une étude menée sur une population de chien au Nigeria donne des résultats contraires (42). Le nombre d'isolats par chienne est plus important pendant le dioestrus et minimal pendant l'oestrus et le proestrus. Cependant aucune analyse statistique ne vient confirmer ces affirmations, de plus la charge bactérienne n'est pas étudiée et seulement le nombre d'espèces par prélèvement est pris en compte. On peut également reprocher à ces auteurs une détermination peu précise des stades du cycle, basée uniquement sur des critères

morphologiques et comportementaux, alors que dans les études précédemment citées dans cette partie sont réalisés des frottis vaginaux en association ou non avec des dosages de progestérone.

Il n'existe malheureusement que peu de données sur l'évolution de la présence de mycoplasmes au cours du cycle. On peut supposer que ces organismes suivent une évolution similaire à celle du reste de la flore vaginale mais ils ne sont pas suffisamment recherchés pour tenir de telles conclusions. Des travaux intégrant une analyse qualitative et quantitative des mycoplasmes vaginaux sont nécessaires.

1.2.4.3 Autres facteurs de variations (populations, race, variations entre vagin antérieur et vestibule...)

Il semblerait que la flore vaginale ne soit pas homogène et varie entre différents sites du vagin. Bien que les espèces bactériennes diffèrent peu, le vestibule vaginal semble porter une charge bactérienne plus importante (16,37). Néanmoins aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence. Il se pourrait que la flore vaginale du vestibule soit proche de la flore cutanée ou de celle du colon dont la flore vaginale dériverait initialement (74).

Seule l'étude de Björstrom et al.(40) relève une différence de compositions chez différentes races. Ces différences portent sur la fréquence d'isolement des principales bactéries constitutives de leurs flores. Ces différences sont observées bien que plusieurs de ces groupes soient élevés ensemble. Ces différences pourraient être expliquées par la configuration anatomique ainsi que certains paramètres à déterminisme génétique (40) comme le pH, les débris cellulaires ou la quantité de sécrétion qui diffèrent d'une race à l'autre. Ces observations n'ont pu être validées statistiquement.

Chez l'homme on sait que la flore vaginale varie chez différentes populations géographiquement éloignées et qu'il existe plusieurs flore « type » (17). On pourrait supposer l'existence de telles variations entre différentes races ou populations de chienne éloignées physiquement (chenils, pays...). Néanmoins il n'existe pas encore d'étude permettant de comparer significativement des populations éloignées. Les méthodes de prélèvements et de culture n'étant pas randomisées la comparaison n'est pas possible. Certaines espèces les plus fréquemment isolées le sont systématiquement chez des populations géographiquement éloignées.

1.3 Le microbiome du tractus génital supérieur

Longtemps considéré comme un environnement stérile, il a été montré chez différentes espèces de mammifères que l'utérus possédait sa propre flore (22,75).

La flore vaginale est souvent considérée comme équivalente à la flore utérine. Ainsi cette dernière est assez peu étudiée lors de situation pathologique et seuls des prélèvements vaginaux sont réalisés. Peu d'études sont disponibles chez le chien.

1.3.1 Composition

Les bactéries isolées au niveau de l'utérus sont également retrouvées au niveau de la muqueuse vaginale (16,38,41,46,50,57) : on retrouve principalement des Streptocoques α - et β -hémolytiques, *E.coli*, des Staphylocoques (*S.intermedius* et *S.pseudintermedius* principalement) ainsi que les genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus* et *Corynebacterium*. Les mycoplasmes sont également isolés dans deux études (38,57) mais dans de faibles proportions (inférieures à 10% des prélèvements). *C.perfringens* est isolé dans une seule étude (50).

Les prélèvements utérins sont le plus souvent réalisés lors d'ovariohystérectomie post- ou ante-mortem permettant de s'affranchir des contaminations par la flore vaginale lorsque les prélèvements sont réalisés par voie transcervicale. Les mêmes espèces sont isolées avec ces deux méthodes (41). Même s'il le taux de cultures positives varie grandement (de 1 à 62.5%), il apparait évident que la muqueuse utérine possède sa propre flore et que les prélèvements négatifs sont dus à des milieux de cultures non adaptés aux souches présentes. Ainsi Maksimovic et al. (46) n'obtiennent que 2.5% de prélèvements positifs en utilisant des milieux de culture solides (géloses au sang, Mac Conkey et Bromocresol) tandis que 62.5% de ces mêmes prélèvements donnent des cultures positives en bouillons Tryptone soja. Lyman et al. (57) qui utilisent des techniques de génétique moléculaire n'ont aucun prélèvement négatif.

Peu d'informations sont disponibles sur la quantité de bactéries présentes. Il semblerait que la flore utérine soit moins importante que la flore vaginale avec une différence d'un facteur 10^2 (38). L'étude de Lyman et al. (57) décrit une flore plus diversifiée (indice de Shannon plus élevé) mais significativement moins riche (moins d'espèces différentes) qu'au niveau du vagin : aucun genre ne représente plus de 10% des organismes identifiés dans l'utérus alors que 60% des organismes appartenaient à trois genres différents au niveau du

vagin. La figure 5 représente la répartition d'attribution des UTOs séquencés dans l'étude de Lyman et al. La comparaison avec la figure 4 montre une répartition bien plus régulière.

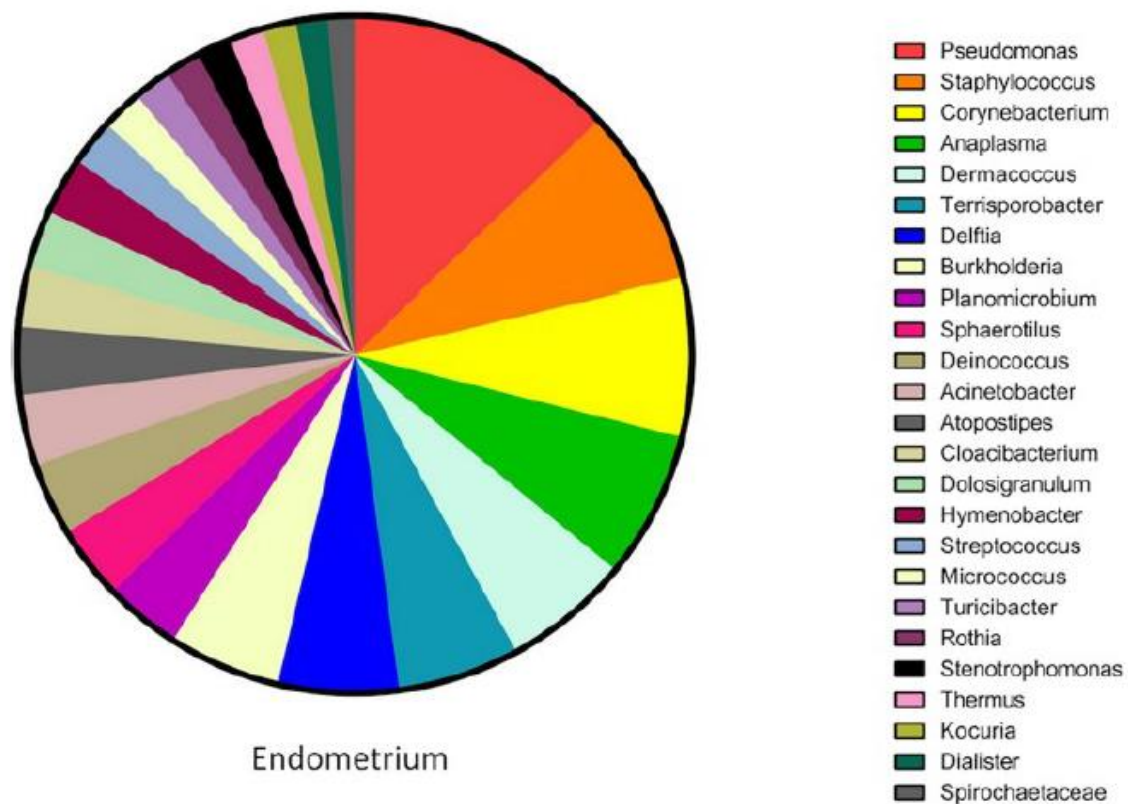


Figure 5 Attribution des UTOs séquencés au niveau de l'endomètre dans l'étude de Lyman et al. (55) à leur genre taxonomique, seuls les 25 genres les plus abondants sont représentés (Source : Lyman et al.)

1.3.2 Origine

La flore du tractus génital supérieur est considérée par beaucoup d'auteurs comme dérivant de la flore vaginale par colonisation via le col de l'utérus. Bien que fermé, le col n'est pas imperméable et certaines phases du cycle de la chienne sont propices à des échanges entre ces deux populations lorsque le col est ouvert. En effet les espèces identifiées dans les différentes études sont très similaires au niveau du vagin et de l'utérus (32). Dans l'étude de Watts et al. (41), chez un même individu, les prélèvements réalisés au niveau du vagin et de l'utérus permettent d'isoler à chaque fois les mêmes bactéries.

Cependant d'autres informations sont actuellement disponibles et remettent en cause l'origine vaginale par colonisation de la flore utérine. Lyman et al. (57) ont montré chez 5 chiennes en œstrus (le col étant ouvert, les échanges entre les deux flores peuvent être à leur maximum) que les deux flores ne sont pas corrélées. Une autre étude suggère une origine mixte (71): le microbiote présent dans le méconium de chiots nés par césariennes (pas de

contamination par la flore vaginale lors de la naissance) et prélevé directement montre une flore similaire à la flore vaginale mais également à la flore buccale de la mère. Dans la même étude, des résultats similaires sont observés à partir de prélèvements réalisés sur le placenta. Ainsi le placenta et le fœtus ne seraient pas un environnement stérile mais posséderaient leurs propres flores qui proviendraient de la colonisation par voie transplacentaire de la flore utérine. Cette dernière pourrait donc avoir une origine mixte entre la flore vaginale et la flore d'autres sites.

La flore utérine semble donc dériver partiellement de la flore vaginale. Certains auteurs remettent en cause cette origine (46).

1.3.3 Facteurs de variations

L'origine vaginale de la flore utérine et l'ouverture du col au cours de certaines phases du cycle permettent d'émettre l'hypothèse que ces variations sont similaires à celles observées au niveau de la flore vaginale. Nous avons vu précédemment que la flore vaginale était plus importante mais souvent moins diversifiée lors de l'œstrus et le post-partum.

Certains auteurs observent des variations cohérentes avec cette hypothèse. Dans l'étude de Watts et al. (41), un seul prélèvement en dehors des périodes d'œstrus et de pro-œstrus est positif, tandis que dans l'étude de Baba et al. (38) la prévalence de culture positive est supérieure lors de la gestation et du post-partum (100% contre 48% en anœstrus). Aucune variation qualitative n'est observée par ces auteurs. Différents facteurs sont évoqués pour expliquer cette baisse de la charge bactérienne à ces périodes du cycle : la présence de sang et de mucus jouant le rôle d'un milieu de culture enrichi, la communication avec le vagin via le col ouvert, la présence moindre de leucocytes au niveau de la muqueuse utérine (76), ainsi que des variations physico-chimiques déplaçant l'équilibre hôte-microbiote de la même façon qu'au niveau de la muqueuse vaginale.

D'autres auteurs observent des variations différentes. Maksimovic et al. (46) mettent en évidence que 46% des bactéries isolées le sont pendant le dioestrus (100% de cultures positives). Des résultats similaires sont observés chez Schultheiss et al. (50) qui notent également une forte prévalence de cultures positives chez les chiennes prépubères. Lyman et al. (57) ne relèvent pas de variations significatives au cours du cycle, la richesse spécifique est tout de même plus faible pendant l'œstrus et le pro-œstrus que lors des autres phases.

Différents éléments viennent appuyer ces observations. Le niveau de la lactoferrine, un peptide antimicrobien non spécifique, varie au cours du cycle hormonal. L'expression du gène de la lactoferrine augmente lors du pro-œstrus et de l'œstrus puis diminue rapidement après l'ovulation pour rester très faible en dioestrus et anoestrus (77). L'expression de certains

inhibiteurs de l'adhésion cellulaire pourrait également varier au cours du cycle. C'est le cas du gène de la mucine dont l'expression, plus importante lors des chaleurs est inversement corrélée à l'adhésion de *E.coli* à l'endomètre (78). De plus l'imprégnation hormonale à l'origine d'une hyperplasie glandulo-kystique lors de ces phases favoriserait la croissance bactérienne et serait cohérente avec une plus forte prévalence du pyomètre lors du dioestrus.

Les variations de la flore endométriale ne sont pas encore totalement élucidées et les différentes études rapportent des observations contraires, chacune appuyée par différents éléments. On peut également supposer l'existence d'autres facteurs de variations comme, l'âge, la race ou les conditions de vie mais aucune étude n'est disponible à ce jour.

Le tractus génital de la chienne arbore une flore riche et diversifiée dont la complexité n'a pas encore été appréhendée dans son ensemble. Ce microbiote et son hôte sont en équilibre dynamique, sous l'influence de différents facteurs comme l'âge, l'activité sexuelle, les conditions de vie et le cycle hormonal qui induisent des fluctuations de l'environnement dans lequel ce microbiote évolue.

Les méthodes de culture bactérienne ont permis d'établir un panorama de cette flore mais arrivent à leur limite. Les nouvelles techniques de séquençage haut débit et de métagénomique ouvrent la porte à une exploration plus approfondie et complète de ce microbiote.

2 Déséquilibres du microbiote et infertilité

2.1 Diagnostic

2.1.1 Diagnostic différentiel de l'infertilité

L'infertilité est définie comme l'incapacité à concevoir et/ou à mener à terme la gestation d'une portée de chiots viables. Chez les espèces produisant des portées, on peut lui associer la sub-fertilité ou la baisse de fécondité, c'est-à-dire la baisse d'un nombre de chiots par portée (79).

L'anatomie de la chienne rend l'examen de son appareil reproducteur difficile. De plus, sa physiologie et l'inconstance de ses cycles peuvent rendre la détection des chaleurs tout comme le diagnostic d'une infertilité complexe.

Nous n'approfondirons pas les causes d'infertilités dues au mâle qui peuvent être diverses : problèmes comportementaux (mâle inexpérimenté ou inhibé par la femelle), qualité et quantité du sperme, incompatibilité anatomique, douleurs (prostatite, arthrose...),... (80). Dans la suite de cette partie, nous considérerons donc que les causes d'infertilités dues au mâle auront été préalablement écartées.

2.1.1.1 Gestion de la reproduction

Une des premières causes d'infertilité apparente serait due à une mauvaise détection de la date d'ovulation et une saillie au mauvais moment. De nombreux éleveurs inséminent entre le 10^{ème} et le 15^{ème} jour suivant l'apparition des premiers signes de chaleurs (attirance des mâles, œdème vulvaire, perte vaginale). Le pro-œstrus et l'œstrus durent en moyenne chacun 9 jours (81), la saillie ou l'insémination sont susceptibles d'aboutir à une fécondation dans un certain nombre de cas. Cependant un dosage de la progestérone permet de déterminer précisément le moment de l'ovulation peu importe les variations individuelles des durées du pro-œstrus et de l'œstrus.

La chienne peut refuser la saillie soit car le mâle est soumis devant elle soit car la période d'acceptation n'a pas été correctement détectée.

L'insémination artificielle peut être utilisée. Il existe différentes techniques, la plus commune étant l'insémination intravaginale. Moins couramment utilisée, l'insémination intra-utérine par voie trans-cervicale ainsi que par laparotomie est possible. Un matériel non adapté ou un défaut de maîtrise des gestes techniques peuvent être à l'origine d'une infertilité (82).

Certaines races présentent également des cycles plus longs (race « primitive » : Basenji, Chien loup tchèques..) ou plus courts (Berger allemand, Rottweiler..) (80). Une

mauvaise connaissance des particularités spécifiques peut rendre la détection des chaleurs difficiles et conduire à suspecter à tort une infertilité.

2.1.1.2 Maladie systémique

Le cycle de la chienne est susceptible d'être perturbé par la plupart des maladies systémiques comme le diabète ou une insuffisance rénale. L'hypercorticisme par exemple peut perturber la synthèse de l'hormone lutéinisante (LH) et être à l'origine d'une infertilité (79,80). De façon similaire la malnutrition peut altérer la fertilité ou être à l'origine d'un avortement (80).

2.1.1.3 Maladies endocriniennes

L'hypothyroïdie est l'affection endocrinienne la plus représentée chez le chien. Elle est associée à de nombreux troubles de la reproduction comme des intervalles inter-œstrus irréguliers, un œstrus plus court, des avortements ou une mortalité néonatale plus élevée sans qu'un lien de causalité ait été clairement établi (83). Elle doit être envisagée surtout si la chienne n'avait pas d'antécédents de problèmes reproducteurs avant l'apparition de l'hypothyroïdie (79).

L'insuffisance lutéale est une cause majeure d'infertilité (80). La progestérone sécrétée par le corps jaune permet le maintien de la gestation. Son taux ne chute de manière physiologique qu'à l'approche de la mise bas. Dans le cas d'insuffisance lutéale non complétement, l'avortement est systématique.

Les kystes lutéaux sécrétant de la progestérone inhibent le cycle ovarien par rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse et empêche ainsi le retour en chaleur.

Les tumeurs de la granulosa ainsi que les kystes folliculaires sécrétant des œstrogènes en grande quantité, les chiennes atteintes se retrouvent en situation d'œstrus permanent, rendant toute gestation impossible.

2.1.1.4 Maladies iatrogènes

De nombreux traitements sont à l'origine d'infertilités comme les traitements hormonaux ou les glucocorticoïdes pour les raisons évoquées précédemment.

2.1.1.5 Causes diverses

Certaines anomalies anatomiques congénitales, comme un septum vaginal ou d'autres anomalies du développement, sont un obstacle à la reproduction (84). Les hyperplasies de la muqueuse vaginale entraînant fréquemment un prolapsus lors des chaleurs sont un frein à la saillie et nécessitent une insémination artificielle (84).

Il est également possible de rencontrer des chaleurs anovulatoires, les suivantes se produisant à un intervalle plus court sont généralement ovulatoires (80,81).

2.1.1.6 Causes infectieuses

Comme nous l'avons vu précédemment le tractus génital de la chienne n'est pas stérile et possède une flore riche et diversifiée. Les espèces bactériennes retrouvées chez les chiennes apparemment saines sont pour la plupart retrouvées dans diverses situations pathologiques (74). Le caractère pathogène opportuniste rend difficile le diagnostic d'une infertilité d'origine bactérienne. Il existe peu d'informations sur les mécanismes permettant à une espèce commensale de devenir pathogène mais différentes hypothèses sont possibles : la colonisation par des souches plus virulentes, des changements de l'environnement entraînant une production de facteurs de virulences par les bactéries présentes ou encore un déséquilibre de la flore commensale. L'hypothèse d'une infertilité d'origine bactérienne doit être envisagée après avoir recherché les autres causes non infectieuses et doit être orientée par la clinique (odeur, inflammation confirmée par la cytologie, écoulement) (79). De nombreuses chiennes sont traitées à l'aide d'antibiotiques en cas d'infertilité mais il existe peu de preuves sur l'utilité d'un tel traitement (74). Les infections génitales sont souvent considérées comme secondaires à une condition prédisposante (anomalies anatomiques, maladies systémiques, immunosuppression...) (80,84).

Certaines bactéries n'appartiennent pas à la flore commensale du tractus génital de la chienne et sont responsables d'avortement ou d'infertilité : *Salmonella*, *Listeria*, *Leptospira* et *campylobacter*. *Brucella canis* est la seule bactérie connue qui soit spécifiquement responsable d'avortement et d'infertilité, elle circule activement en Europe (85) ainsi qu'en Amérique et en Asie (86). C'est une zoonose et la transmission se fait par contact ou lors de la saillie (84).

Certains parasites comme *Toxoplasma gondii* ou *Neospora caninum* sont responsables d'avortements tardifs et de mortalité néonatale (79,84).

L'herpès virus canin est responsable d'avortement (87). Il est également suspecté dans le cas d'infertilité. Chez les chiennes gestantes, des lésions sont retrouvées sur le placenta et les avortons. On retrouve également des lésions vésiculaires de tailles variables sur la

muqueuse du vestibule vaginal, principalement pendant le pro-oestrus (84). La transmission se fait par contact rapproché. L'un des signes d'appel est l'apparition de signes cliniques respiratoires dûs au tropisme de ce virus pour l'appareil respiratoire. L'hépatite de Rubarth et la maladie de Carré sont citées comme des causes probables d'avortement, d'infertilité et de mortalité néonatale, néanmoins, ces maladies sont rares du fait de la vaccination contre les virus responsables de ces affections (81,86).

Les Mycoplasmes sont souvent cités comme responsable d'infertilité (79,80,84,88–91). Cependant, comme pour toute cause infectieuse, sans signes cliniques évocateurs d'une infection génitale il convient d'avoir une approche systématique de l'infertilité et d'en exclure les autres causes avant d'envisager une infection bactérienne.

2.2 Rupture d'équilibre

2.2.1 Chez la femme : changement du type de communauté bactérienne

Il est de plus en plus admis que le microbiote génital de la femme joue un rôle dans la fertilité. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.2.1.1, la flore vaginale de la femme est naturellement dominée par différentes espèces de lactobacilles bien que cette conception soit remise en cause et qu'une approche plus fonctionnelle émerge depuis quelques années. Le terme de « vaginose bactérienne » ou de dysbiose sont employés pour parler des déséquilibres de la flore vaginale.

Les dysbioses vaginales s'accompagnent de différents critères cliniques : la présence d'une odeur forte inhabituelle, un pH anormalement élevé (supérieur ou égal à 4.5), un écoulement muqueux ainsi que la présence au microscope de cellules épithéliales recouvertes de bactéries (21). Il a été montré que chez les femmes présentant des vaginoses cliniques, la flore bactérienne était dominée par *Gardenerella vaginalis* ou *Atopobium vaginae* et que la proportion de *Lactobacillus* était très faible (21,22,92–94). Bien que les vaginoses cliniques ne soient pas systématiquement associées à des échecs de conception, elles sont associées à des grossesses à risque avec des avortements, de la mortinatalité ou des accouchements prématurés.

Cependant, ces dysbioses ne s'accompagnent pas toujours de signes cliniques apparents. L'infertilité est parfois le seul signe d'appel. Des études récentes ont montré que chez des femmes présentant une infertilité idiopathique sans autre signe clinique, les microbiotes étaient similaires à ceux de femmes présentant des vaginoses cliniques (95,96).

L'intérêt pour les troubles du microbiote génital est récent, d'autres études sont nécessaires pour comprendre comment les espèces du microbiote ou les différents types de communautés bactériennes affectent la fertilité chez la femme. La faible proportion de *Lactobacillus* est admise par de nombreux auteurs comme un facteur de risque de dysbiose et de troubles de la reproduction.

2.2.2 Chez la chienne

En dehors des pathogènes spécifiques comme *Brucella canis* et des infections systémiques ayant un effet indirect sur les fonctions de reproduction, les infections génitales sont causées par des bactéries commensales qui, sous certaines conditions peuvent devenir pathogènes.

De nombreux auteurs ont comparé les flores vaginales des chiennes saines avec d'autres présentant des troubles de la fertilité, des écoulements vaginaux, de la mortalité néonatale ou bien des pyomètres. Qualitativement, les germes isolés étaient les mêmes que chez les chiennes saines et le nombre d'isolats par prélèvement ne variait pas significativement (35,37,40,47,48,97).

Les pyomètres et les vaginites (caractérisés par un écoulement vulvaire) sont deux affections fréquentes chez chienne au cours desquelles la flore vaginale semble perturbée de façon quantitative. Au cours de ces affections, les prélèvements révèlent généralement des cultures pures.

Une seule étude évalue de façon semi-quantitative les différences entre des chiennes saines et des chiennes présentant un écoulement vulvaire : Hirsch et Wiger (35) comparent les deux groupes en étalant les écouvillons vaginaux de chaque chienne du premier au quatrième quadrant de la gélose de culture. Le grade de la culture (de 1 à 4) correspondant au nombre de colonies sur chaque quadrant (le grade 1 indiquant moins de 5 colonies sur le premier quadrant et le grade 4 plus de 5 colonies sur le dernier quadrant) permet d'évaluer de façon semi-quantitative la charge bactérienne vaginale de chaque chienne. Dans cette étude 10% des chiennes saines ont donné des cultures de grade 3 et 4 contre 36% des chiennes présentant un écoulement vulvaire. Les chiennes à vaginite semblent alors présenter un plus grand nombre de bactéries dans le vagin.

Le pyomètre est une affection résultant de facteurs hormonaux et bactériens. Si les mécanismes sont aujourd'hui bien élucidés, la chronologie de ces différents facteurs n'est pas encore certaine. L'imprégnation utérine de progestérone induit une baisse d'immunité locale

ainsi qu'une hyperplasie glandulo-kystique et l'accumulation de sécrétion. Ces éléments sont propices à une prolifération bactérienne. Cette prolifération bactérienne pourrait être facilitée par la translocation de certaines bactéries de la flore vaginale lorsque le col utérin est ouvert. *E.coli* est considéré comme responsable de 70 à 80% des pyomètres et les cultures pures sont également plus fréquentes lors de pyomètre (84). Ainsi lors de pyomètre, la flore vaginale est quantitativement plus importante mais sa diversité diminue au profit d'un germe devenu pathogène. Cependant une étude récente reposant sur le séquençage haut débit de l'ARNr 16S de chiennes atteintes de pyomètre semble remettre en cause cette conception (59). Dans cette étude menée par Young et al. (59), l'indice de Shannon ainsi que l'estimateur de richesse spécifique ACE sont tous deux plus élevés dans la population malade. D'autres indicateurs sont utilisés. Un autre estimateur de richesse spécifique, l'estimateur Chao1 dont la valeur pour la population malade est également plus élevée que dans la population saine. L'indice de Simpson permet d'apprécier la diversité d'un milieu. Il varie entre 0 et 1, plus il est élevé et plus la population est dominée par une espèce bactérienne. Dans l'étude de Young et al. l'indice de Simpson est égal à 0.25 dans la population malade et égal à 0.82 dans la population saine indiquant une plus grande équitabilité spécifique de la flore utérine des chiennes malades. Les deux estimateurs de richesse spécifique sont cohérents avec les indicateurs de diversité ; le nombre d'espèces dans la flore utérine de la population de chiennes malades est estimé à l'aide des deux méthodes à plus de 33 espèces alors que le nombre d'espèces de la flore saine est estimé inférieur à 3. L'attribution des UTOs à un genre est représentée dans la figure 6. Cette étude contraste avec la littérature attribuant une perte de diversité lors de pyomètre mais le faible nombre d'individus inclus dans cette étude ne permet pas de remettre en cause formellement cette conception. Cependant les résultats de cette étude soulignent les limites de la bactériologie classique qui sous-estime le rôle des bactéries non cultivables et ne permet pas d'apprécier le microbiote directement dans sa globalité.

Ces affections semblent se produire lors de contextes particuliers lors desquels une baisse de l'immunité locale ou globale se produit. Certaines populations peuvent ainsi prendre le pas sur la flore commensale et devenir pathogènes. Ces pathogènes opportunistes possèdent souvent des facteurs de virulences particuliers, comme certaines souches d'*E.coli* uropathogènes. Ces bactéries peuvent être à l'origine d'infertilités en rendant l'environnement hostile aux gamètes (interactions directes ou production de facteurs spermicides) ou à l'embryon (84).

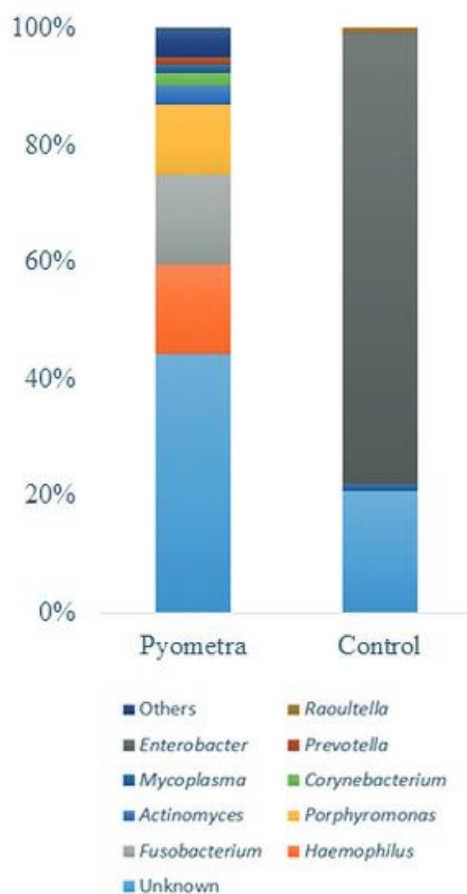


Figure 6 Attributions des UTOs séquencées aux genres bactériens chez le groupe atteint de pyomètre et le groupe contrôle (source Young et al. 2017 (59))

Comme nous l'avons vu précédemment, en l'absence de signes cliniques, une culture pure à partir d'un écouvillon vaginal ne permet pas de conclure à un désordre de la flore commensale. Un diagnostic différentiel complet doit être réalisé et des facteurs prédisposants aux troubles du microbiote vaginal doivent être recherchés lorsqu'une dysbiose est identifiée.

Cependant l'usage d'antibiotiques en cas de cultures pures chez des chiennes en bonne santé est largement répandu. Ces pratiques peuvent conduire à la sélection de souches multirésistantes potentiellement pathogènes sans que les bénéfices d'un traitement soient significatifs (98–100).

Les infections bactériennes sont l'une des principales causes de mortalité néonatale. Les germes isolés sur les chiots morts précocement sont le plus souvent les mêmes que chez la mère et des études génétiques ont pu confirmer l'origine vaginale de ces germes (101,102). Ces études confirment que la mise en place des différentes flores du chiots se fait par colonisation lors du passage par le vagin lors de la mise bas. L'étude de Björström et al. révèle un fort taux de prévalence de culture pure de *E.coli* chez les chiennes présentant de la mortalité néonatale (41.7%) (101) et la recherche spécifique de *Clostridium perfringens* par

Blunden et al. a montré une plus grande prévalence de ces bactéries chez les chiennes présentant de la mortalité néonatale (39). Cependant dans la plupart des cas, les chiennes ne semblent pas présenter de trouble apparent de l'appareil reproducteur et la colonisation du chiot par le microbiote vaginal apparaît indispensable à la bonne santé des chiots. En effet la comparaison de chiots nés par césarienne et par voie naturelle montre que les premiers possèdent un microbiote cutané moins riche associé à des croissances moins importantes au cours de premier jour de vie que les chiots du second groupe nés par voie naturelle (71). La mortalité néonatale pourrait survenir en présence d'autres facteurs comme une mauvaise prise de colostrum ou un environnement non adapté bien que la flore vaginale de la mère soit saine.

Il existe de nombreuses causes à l'infertilité. L'infertilité doit être explorée dans sa globalité et les causes infectieuses ne peuvent être suspectées en premier lieu en l'absence de signes cliniques apparents. En dehors des agents infectieux spécifiques comme *Brucella canis*, il existe des désordres du microbiote vaginal associés à différents troubles de la reproduction. La recherche et le traitement de facteurs prédisposants à ces troubles est primordiale avant la mise en place d'un traitement antibiotique dont les bénéfices ne sont pas toujours certains. Le caractère pathogène opportuniste de nombreuses bactéries commensales rend difficile le diagnostic d'une infertilité d'origine bactérienne. Les mycoplasmes, dont l'implications dans les troubles de la reproduction fait débat chez la chienne, font partie de ces pathogènes opportunistes.

3 Mycoplasmes et infertilités

3.1 Généralités sur les mycoplasmes

3.1.1 Taxonomie et phylogénie

Les « mycoplasmes » désignent dans le langage courant le genre *Mycoplasma* mais également le genre *Ureaplasma*, qui y est souvent rattaché. Ces genres forment la famille des Mycoplasmatacées. Cette famille appartient à la classe des Mollicutes et au phylum de Tenericutes. Jusqu'à récemment les Mollicutes étaient classés à l'intérieur du phylum des Firmicutes mais ont été reclassés depuis peu en raison de certains caractères remarquables comme l'absence de paroi cellulaire, un cytosquelette souple ainsi qu'un génome réduit comportant une faible proportion de guanosine et cytosine (103–105). Les Mollicutes

dériveraient de bactéries à Gram positives ayant évoluées en perdant des gènes non essentiels par réduction génétiques au point de devenir un modèle de « cellule minimale » (106).

Les Mycoplasmatacées se distinguent des autres familles de Mollicutes par leur dépendance au cholestérol exogène pour leur croissance, la localisation cytoplasmique de la NADH oxydase, ainsi qu'un génome de taille réduite (environ 5×10^8 Da).

Le terme « mycoplasme » peut servir à désigner la classe des Mollicutes, mais également la famille des Mycoplasmatacées.

Les genres *Ureaplasma* et *Mycoplasma* sont différenciés par leur capacité à hydrolyser l'urée ou non (103).

Les espèces sont classées d'après leur génome. Chalker et Brown (104) ont réalisé une classification basée sur l'analyse des séquences de l'ARNr 16S et de la région intergénique des ARNr 16S et 23S des mycoplasmes isolés dans l'espèce canine. A l'exception de deux espèces, les mycoplasmes isolés chez le chien appartiennent tous au groupe taxonomique Hominis, *M.feliminutum* et *M.haemocanis* appartiennent respectivement aux groupes Spiroplasma et Pneumoniae (voir figure 7) (104,107). Bien que n'étant pas des mycoplasmes au sens strict, *U.canigenitalium* et *A.laidlawii* appartiennent également à ces deux groupes taxonomiques.

Taxonomie et phylogénie divergent avec l'avancée des techniques de séquençage. La taxonomie est donc susceptible d'évoluer régulièrement selon les décisions du Sous-comité sur la taxonomie des Mollicutes (108).

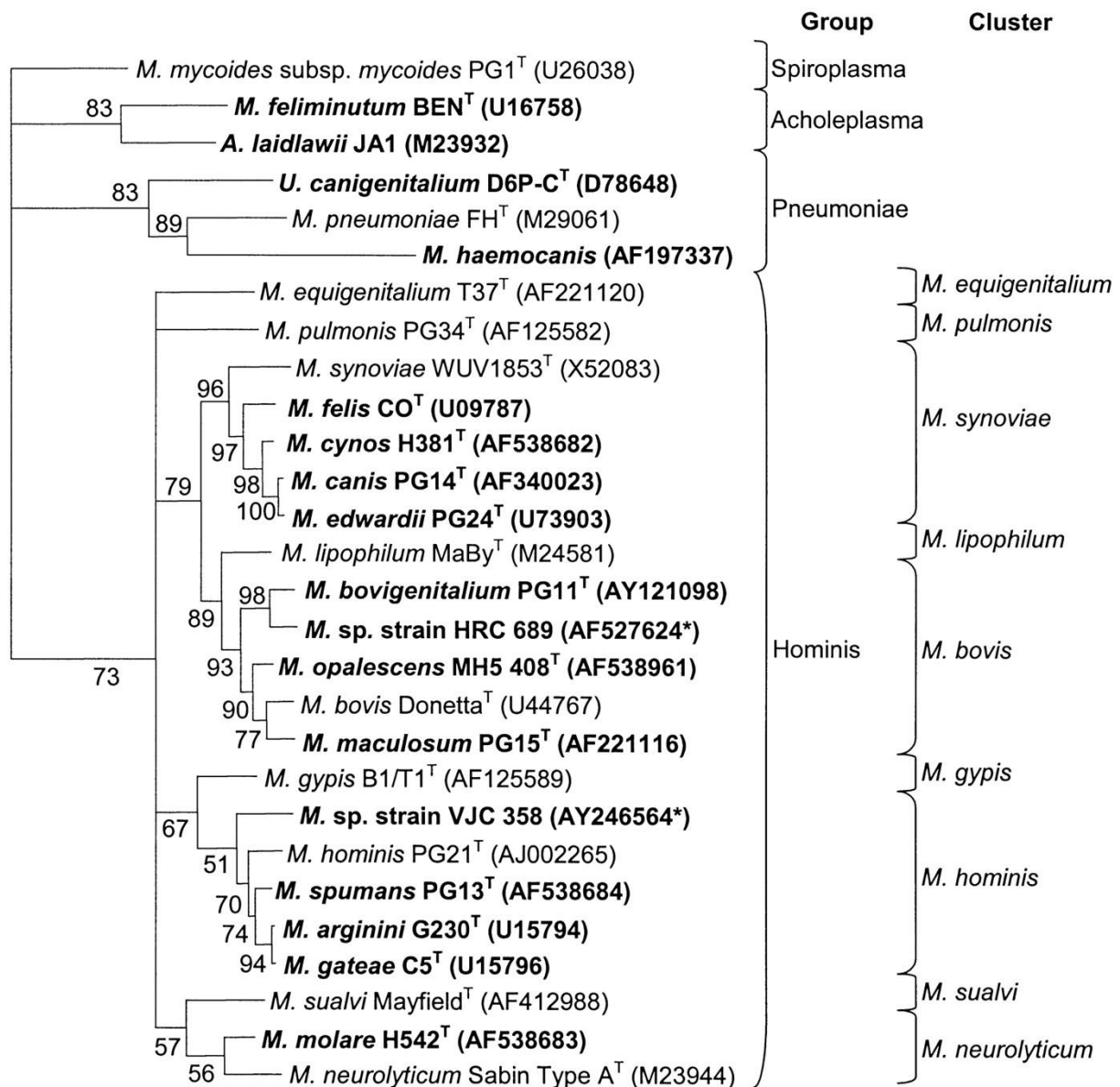


Figure 7 Arbre phylogénique établi à partir des séquences des ARNr 16S, les mycoplasmes isolés dans l'espèce canines sont notés en gras et les numéros d'accès aux séquences dans Genbank notés entre parenthèses (Source Chalker et Brown 2004 (104))

3.1.2 Génome, biologie et aspect en culture

Les mycoplasmes sont des organismes commensaux pathogènes opportunistes des mammifères. Chez le chien on les retrouve sur toutes les muqueuses mais également au niveau du cœur, du foie, des reins, de la rate et des nœuds lymphatiques (68). *M. canis* est l'espèce la plus abondante et fréquemment isolée chez les chiens.

Les mycoplasmes sont considérés comme les organismes capables d'autoréplication les plus simples. Le génome d'un mycoplasme varie de 500 à 1600 kilo paires de bases (kpb) et est composé d'une proportion de paires guanosine-cytosine variant autour de 30% (68). *M. canis* possède un génome de 795 kpb, une proportion de guanosine-cytosine légèrement inférieure à 30% (27- 29.1%) et un nombre de gènes estimé à 700 (68,109). Les deux extrêmes sont représentés par *M. genitalium*, non isolé chez le chien avec un génome de 580 kpb et moins de 500 gènes (107), et *A.laidlawii*, qui n'est pas un mycoplasme au sens strict et qui présente un génome de 1650 kpb et environ 1400 gènes (110). La taille du génome n'est pas un critère taxonomique car il peut varier en raison de répétitions de certaines séquences d'une souche à l'autre. Cependant les *Acheloplasma* et *Spiroplasma*, considérés comme des mycoplasmes plus primitifs, ont des génomes de plus grande taille que les *Mycoplasma* et *Ureaplasma*, considérés comme des mycoplasmes plus évolués ; ils supportent la thèse que les Mollicutes auraient évolué par réduction génétique. Le génome des mycoplasmes se présente comme un double brin d'ADN circulaire. La présence de plasmide est rare et n'a jamais été observée chez une espèce présente chez le chien. L'extrême simplicité du génome des mycoplasmes serait à l'origine d'une grande variabilité génétique par perte de certaines capacités de réparation de l'ADN (106,107).

La simplicité de leur génome est également à l'origine d'une grande dépendance à leur environnement car leurs capacités de synthèse sont limitées. Ces capacités de synthèses peuvent être simplifiées à l'extrême comme chez *M.genitalium* et *M.pneumoniae*, deux mycoplasmes isolés chez l'humain qui ne possèdent aucun gène impliqué dans la synthèse d'acides aminés et sont donc complètement dépendant de l'apport exogène d'acides aminés (107). Les propriétés biochimiques des mycoplasmes ont longtemps été des critères taxonomiques pour ces espèces : les Mycoplasmatocés nécessitent du cholestérol pour leur croissance, et au sein de ce groupe l'hydrolyse de l'arginine, la présence de phosphatase ou la capacité de fermenter le glucose pour produire de l'ATP peuvent être utilisées pour différencier les espèces. Le tableau 4 résume ces différentes caractéristiques chez les mycoplasmes isolés au niveau du tractus génital de la chienne.

	Fermentation du glucose	Hydrolyse de l' arginine	Présence de phosphatase	Synthèse du cholestérol
<i>Mycoplasma canis</i>	+	-	-	-
<i>M.cynos</i>	+	-	+	-
<i>M.maculosum</i>	-	+	+	-
<i>M.spumans</i>	-	+	+	-
<i>M.edwardii</i>	+	-	-	-
<i>M.molare</i>	+	-	-	-
<i>M.bovigenitalium</i>	-	-	+	-
<i>M.felimutum</i>	+	-	-	-
<i>M.gateae</i>	-	+	-	-
<i>Achelospasma laidlawii</i>	+	-	-	+
<i>Ureaplasma canigenitalum</i>	-	-	-	-

Tableau 4 Propriétés biochimiques des mycoplasmes isolés au niveau du tractus génital de la chienne

La membrane plasmique des mycoplasmes est tri laminaire et est composée de phospholipides, de glycolipides, de stérols, de protéines, de lipoprotéines et de glycoprotéines. Une grande partie de ces composants provient du milieu extérieur et en a fait un groupe de microorganismes particulièrement utiles pour l'étude de la membrane plasmique. En effet, la composition de la membrane varie directement en fonction des apports du milieu (107).

La membrane plasmique des mycoplasmes présente également une grande proportion de protéines. Cette part importante de protéines, ainsi que la faible capacité de biosynthèse des mycoplasmes laisse supposer une grande variété de transporteurs membranaires. Cependant le nombre et la proportion de gènes impliqués dans les phénomènes de transport semblent faibles comparés à d'autres bactéries (111).

L'absence de paroi ainsi que la présence de cholestérol non estérifié issu du milieu confèrerait aux mycoplasmes une grande perméabilité membranaire adaptée à leur dépendance du milieu pour leurs constituants et donc à leur mode de vie parasite. Ces propriétés permettraient également la fusion membranaire, la position intracellulaire de

certains mycoplasmes comme *Mycoplasma canis* ainsi qu'une grande variabilité antigénique (106,107,112).

L'absence de paroi donne aux mycoplasmes une grande plasticité. Il existe parmi les Mollicutes des bactéries aux formes atypiques comme le genre *Spiroplasma* caractérisé par sa forme hélicoïdale, ainsi qu'une grande variété de formes. L'existence d'un cytosquelette atypique est suggérée mais assez peu étudiée. Les recherches disponibles se portent principalement sur des protrusions cytoplasmiques de *M. pneumoniae* et *M. mobile* qui auraient un rôle dans la motilité, l'adhésion et la division cellulaire (107,113).

3.1.3 Pouvoir pathogène

Bien que faisant partie de la flore commensale du tractus urogénital de la chienne saine, les mycoplasmes peuvent avoir des effets néfastes sur leurs hôtes.

3.1.3.1 Adhésion cellulaire

Le pouvoir pathogène des mycoplasmes repose principalement sur leur capacité d'adhésion aux cellules hôtes. L'adhésion cellulaire a été particulièrement étudiée chez *M. pneumoniae*. L'adhésion cellulaire se fait à l'aide de protrusions cytoplasmiques au niveau desquelles des adhésines et des protéines accessoires se concentrent (114) (figure 8).

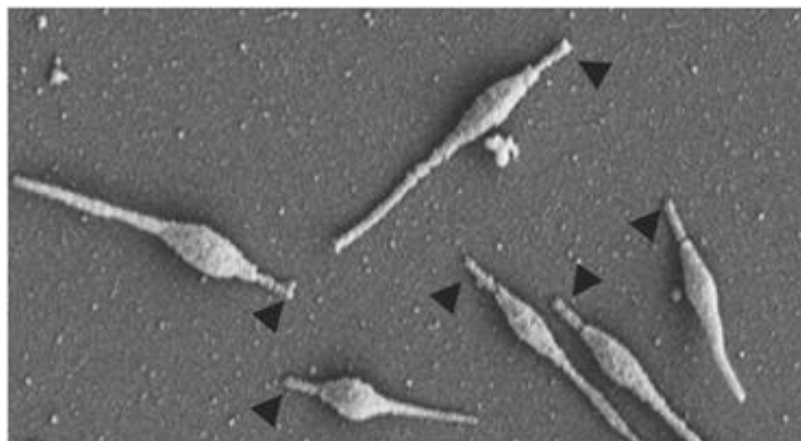


Figure 8 *Mycoplasma pneumoniae* vu au microscope électronique à balayage, les flèches noires indiquent l'extrémité effilée responsable de l'adhésion cellulaire (Source Atkinson et al. 2008)

Cette capacité d'adhésion est peu étudiée chez les mycoplasmes canins. *M. canis*, l'espèce la plus représentée au niveau de la muqueuse vaginale de la chienne, est de forme

coccoïde et ne semble pas présenter ce type de protrusion (Figure 9). Ses modalités d'attachement restent encore inconnues.

L'adhérence cellulaire permet aux mycoplasmes d'interférer avec certains transporteurs ou récepteurs membranaires de la cellule de l'hôte. Au niveau génital, cette liaison peut perturber la motilité des spermatozoïdes et masquer les récepteurs sulfoglycolipidiques nécessaires à la reconnaissance entre les gamètes lors de la fécondation (89,107,115). Cette liaison permet la libération de toxiques, comme des radicaux libres, directement au contact de la membrane de la cellule de l'hôte (116), même si cette synthèse semble trop faible chez les souches urogénitales de *M.canis* pour avoir un effet pathogène réel (112).

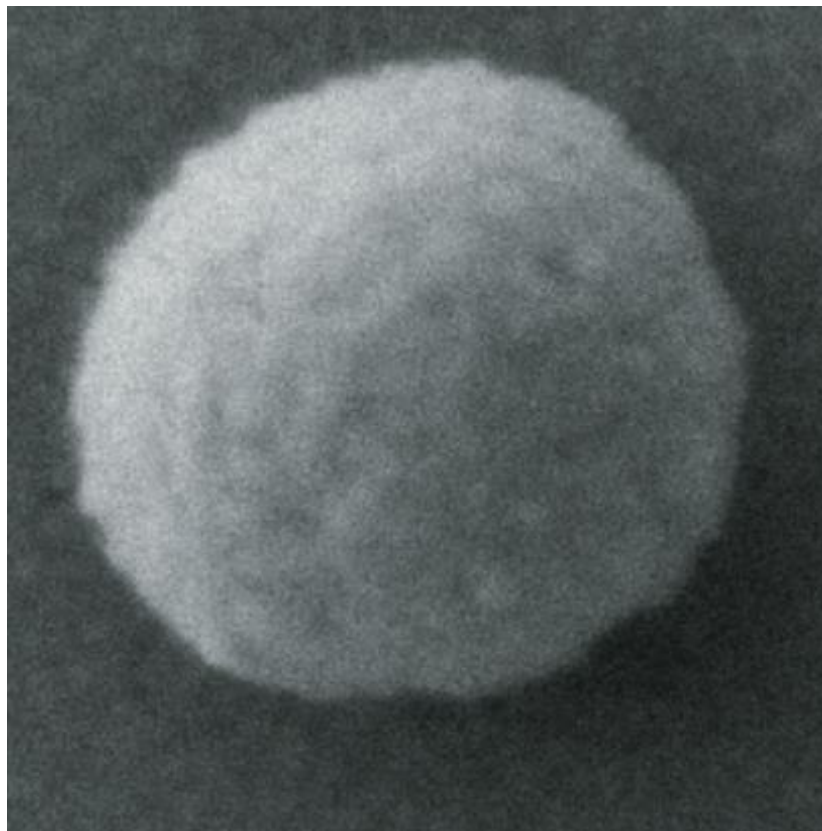


Figure 9 *Mycoplasma canis* vu au microscope électronique à balayage, la surface est marquée d'élévation circulaire de 20nm sur l'ensemble de la cellule (Source : Michaels et al. 2016)

3.1.3.2 Invasion cellulaire

L'invasion cellulaire fait suite à l'adhésion. Cette propriété permet aux mycoplasmes d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et à d'éventuels traitements antibiotiques, comme la gentamicine, utilisée pour différencier la localisation intra ou extracellulaire des mycoplasmes dans certaines études. Les souches de *M. canis* isolées au niveau de la muqueuse vaginale (UF31 et UF33) sont capables d'invasion cellulaire. Les mécanismes d'invasion cellulaire sont encore mal connus mais feraient intervenir le cytosquelette de la

cellule hôte après induction d'un signal lors de la liaison cellulaire. Les sialidases des mycoplasmes joueraient un rôle non indispensable dans l'induction de ce signal en se liant avec l'acide sialique de certaines glycoprotéines membranaires de la cellule hôte. Il existe une grande variété de sialidases et leur liaison est très spécifique, ce qui permettrait d'expliquer la spécificité des mycoplasmes pour leurs hôtes (95). Cependant, l'étude des adhésines chez différents mycoplasmes laisse suggérer l'existence d'une famille de gènes commune aux mycoplasmes et relativement bien conservée (107,116).

3.1.3.3 Fusion cellulaire

Certains mycoplasmes sont capables de fusion cellulaire. Cette capacité est permise par la grande teneur en cholestérol non estérifié de leurs membranes mais également, chez certaines espèces de mycoplasmes, par un gradient membranaire de protons (117–119).

La fusion permet de déverser dans la cellule de l'hôte de nombreuses enzymes : des protéases, des phosphatases altérant les voies de transduction et des nucléases dégradant le matériel génétique. Des constituants membranaires des mycoplasmes se retrouvent également exposés à la surface des cellules, altérant certains récepteurs, modifiant les interactions avec les cellules voisines et pouvant affecter la production de cytokines (116,119).

3.1.3.4 Synthèse de cytokines

Les mycoplasmes sont capables d'induire la synthèse de cytokines par les cellules de l'hôte. Cette synthèse est variable selon les souches de mycoplasmes, l'espèce hôte mais également le type de cellule (107,119). Les mycoplasmes sont ainsi capables d'induire une immunosuppression chez l'hôte, en inhibant ou stimulant la synthèse de certaines cytokines (91).

Les souches de *M. canis* retrouvées au niveau de la muqueuse génitale induisent la production d'un profil de cytokines pro-inflammatoires : TNF- α , IL-6, IL-10 et IFN- γ avec un rapport TNF- α /IL-10 élevé orientant vers une réponse immunitaire cellulaire de type TH1. Les autres souches isolées à partir de sites différents induisent une réponse plutôt anti-inflammatoire (112). A ce jour il ne semble pas exister de données sur les profils de cytokines induits par les autres mycoplasmes chez le chien.

Les mycoplasmes possèdent des lipides et lipoprotéines membranaires avec une terminaison aminée, jouant le rôle d'immunomodulines, équivalente au LPS chez d'autres

bactéries et responsable de l'activation des macrophages et du recrutement des leucocytes via les récepteurs de type Toll (TLR) de la cellule de l'hôte (112,118,120).

Les autres mycoplasmes canins n'ont pas fait l'objet d'étude portant sur la réponse immunitaire qu'ils peuvent induire.

3.1.3.5 Stimulation lymphocytaire

Les mycoplasmes seraient capables de stimuler des lymphocytes B et T de manière non spécifique, entraînant l'infiltration des tissus par des lymphocytes et la synthèse d'immunoglobulines non spécifiques (3,107,119,121). Ce phénomène est mal étudié chez les mycoplasmes.

La réponse immunitaire induite par les mycoplasmes chez l'hôte est souvent la principale cause des symptômes des mycoplasmoses. Au niveau de la muqueuse vaginale, l'infiltration lymphocytaire ainsi que l'environnement pro-inflammatoire créé par la synthèse des cytokines seraient à l'origine d'un environnement néfaste pour les gamètes (122).

3.1.3.6 Echappement au système immunitaire

Certains mycoplasmes sont capables de moduler la sécrétion du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II). De nombreuses espèces stimulent l'expression du CMH-II (107,118,119). Certaines souches de *M.canis* inhibent la sécrétion du CMH-II, compromettant la présentation d'antigènes de *M.canis* ou d'autres espèces aux lymphocytes CD4+ et ainsi la mise en place d'une réaction immunitaire efficace. Cependant cette propriété n'a pas été étudié chez les souches génitales de *M.canis* (112), qui induisent des profils de cytokines différents. Actuellement peu de données sont disponibles à propos des effets des mycoplasmes canins sur l'expression du CMH-II.

Une des principales capacités des mycoplasmes est, malgré leur génome extrêmement réduit, leur grande variabilité antigénique. Cette grande variabilité est une adaptation au mode de vie parasite des mycoplasmes et à l'absence de paroi. Les principaux antigènes sont les protéines et les lipoprotéines membranaires. Différents types de variations interviennent :

- l'expression ou non de certaines protéines ou lipoprotéines ;
- les variations de phase par des répétitions de courtes séquences ;
- le réarrangement des domaines exposés des antigènes ;
- l'émergence de nouveaux antigènes par duplication et mutation.

Ces variations reposent sur différents mécanismes en fonction des espèces de mycoplasmes. Ils sont aléatoires, spontanés car observés avant toute réponse immunitaire, et se produisent à haute fréquence. De plus ils sont réversibles, c'est-à-dire que chaque cellule peut produire des antigènes qu'elle ne produisait plus à un moment donné. Cette hypervariabilité antigénique est parfaitement adaptée au mode de vie parasite ainsi qu'à l'absence de paroi, leur permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte, et explique le caractère chronique de la plupart des infections à mycoplasmes (107,118–121,123).

3.1.3.7 Pouvoirs pathogènes divers

Les mycoplasmes dépendent de leur environnement pour leurs précurseurs, ces organismes peuvent agir en spoliant les cellules hôtes de ces précurseurs. Cette spoliation en cholestérol peut par exemple perturber le métabolisme de certains lipides membranaires ou encore de certains neurotransmetteurs cholinergiques. Le manque d'arginine chez les cellules hôtes peut entraîner des dysfonctionnements dans la synthèse de certaines protéines et dans les mécanismes de divisions cellulaires. Ces spoliations dépendent des capacités de synthèse de chaque mycoplasme : *M.canis* et *M.cynos* (deux principaux mycoplasmes canins) n'hydrolysant pas l'arginine, cet effet semble négligeable (118).

Chez l'homme, un potentiel pouvoir oncogène a été observé. Ces effets résulteraient d'une exposition sur une longue période et n'ont pas été observés chez le chien. Ce pouvoir oncogène pourrait faire intervenir la spoliation en arginine, perturbant la synthèse d'histone et entraînant des modifications chromosomiques et à terme, l'apparition de processus cancéreux (118,124,125).

Les mycoplasmes pourraient provoquer des réactions auto-immunes via la stimulation non spécifique des lymphocytes, la synthèses de certains profils de cytokines et des homologies avec des protéines de l'hôtes (107,126). Ces effets n'ont pas été étudiés chez les mycoplasmes vaginaux.

Les potentiels pouvoirs pathogènes des mycoplasmes ainsi que leur forte présence au niveau de la muqueuse génitale de la chienne laisse supposer qu'ils peuvent avoir des effets néfastes sur la fertilité.

3.2 Infections expérimentales

A ce jour, seules deux études d'infections expérimentales au niveau du tractus génital ont été réalisées, l'une chez la femelle (127) et l'autre chez le mâle (128).

L'étude chez la femelle porte sur 10 chiennes beagles. Un à deux millilitres d'un bouillon de culture contenant une grande concentration de *M. canis* (10^8 CFU) ont été inoculés *in utero* via laparotomie par la ligne blanche. La fertilité n'a pas été évaluée mais différentes lésions ont pu être observées pouvant être à l'origine de trouble de la reproduction : des endométrites, des endométrites purulentes, des phlegmons et de l'hyperplasie glandulo-kystique.

L'isolement de *M. canis* était plus important au niveau du col utérin que du vestibule vaginal mais les prélèvements utérins réalisés post mortem étaient tous négatifs. Deux chiennes ne présentaient aucun mycoplasme. Cette étude laisse supposer un effet pathogène au niveau de la sphère urogénitale ; cependant elle présente de nombreux biais et les informations fournies sont limitées. Tout d'abord la provenance de la souche de *M. canis* (6/L 42), cette souche est issue de chiennes présentant une maladie uro-génitale, sa virulence est donc très fortement suspectée, or on sait qu'il existe une grande variabilité génétique d'une souche de mycoplasme à une autre donc une variation du pouvoir pathogène de ces différentes souches. De plus la concentration du bouillon en *M. canis* est très élevée (10^8 CFU/ml), bien supérieure aux concentrations en mycoplasme retrouvées dans une flore vaginale saine. Enfin, le statut bactériologique des chiennes n'est pas connu, ni avant ni après inoculation, tout comme la composition précise du bouillon de culture inoculé qui pourrait contenir d'autres germes. Ainsi les lésions observées pourraient tout autant être dues à l'action d'un autre germe, d'une perturbation de la flore utérine et/ou vaginale due à l'inoculation du bouillon de mycoplasmes plus qu'à l'action pathogène de *M. canis*. Cette étude expérimentale permet donc de suspecter le rôle pathogène de *M. canis* au niveau de la muqueuse urogénitale de la chienne mais ne constitue pas une preuve formelle selon le postulat de Koch (127). Il n'existe à notre connaissance pas d'autre étude sur le même sujet.

La même souche a été inoculée dans les canaux déférents de trois chiens mâles, provoquant divers troubles au niveau de l'appareil reproducteurs des mâles sans que les mycoplasmes soient isolés après inoculation (128).

3.3 Données chez les autres espèces

Chez la femme, il existe 16 mycoplasmes d'origine humaine au niveau de la sphère urogénitale, mais seulement 4 d'entre eux sont considérés comme potentiellement pathogènes : *M.genitalium*, *M.hominis*, *Ureaplasma parvum* et *U.urealyticum*. Ces

mycoplasmes sont associés à des accouchements prématurés, des avortements, des cas d'infertilités, des salpingites, des cervicites et des endométrites (88,129–132). Cependant même si le rôle pathogène de ces mycoplasmes est fortement suggéré par de nombreuses études, il n'existe pas de preuve formelle d'une causalité entre la présence des mycoplasmes et les affections observées. Différentes études expérimentales qui soutiennent ce rôle pathogène ont été réalisées chez des primates (133–135) mais comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.2.1.1, la flore vaginale unique de la femme donne peu de poids à ces preuves expérimentales. Leur rôle pathogène est actuellement accepté mais remis en cause (28). En effet le manque de preuves formelles laisse supposer que ces organismes ne seraient pas la cause d'affections urogénitales mais plutôt des facteurs aggravants ou cofacteurs de certaines affections.

Chez la vache, deux espèces de mycoplasmes sont considérés comme pathogènes : *M.bovigenitalium* et *U.diversivum*. Ils sont associés à des vulvites granulomateuses à l'origine d'infertilité (136,137). Ces études ont été confirmées *in vitro* pour les uréaplasmes qui induisent des ciliostases sur des cultures d'oviducte bovin pouvant provoquer des infertilité (138).

Chez la jument, *M.equigenitalium* présente un intérêt en pathologie de la reproduction. Il est associé à des vulvites, des vaginites, des endométrites et des cas d'avortements et d'infertilité (33,139,140). Les mycoplasmoses génitales ne sont pas une problématique majeure en reproduction équine et n'ont fait l'objet que de peu d'études.

Chez la chatte, une seule étude suggère que des uréaplasmes pourraient être responsables d'avortements et de mortalité néonatale, cependant cette étude ne porte que sur un nombre très limité d'individus (141). Les mêmes auteurs ont également montré une prévalence plus forte des mycoplasmes génitaux chez les chats atteints de troubles de l'appareil reproducteur (42%) que chez les chats sains (21%) (142). Les mycoplasmes ne représentent pas une problématique majeure chez le chat en dehors de l'hémobartonellose.

3.4 Données chez la chienne

3.4.1 Aspects cliniques

Les mycoplasmoses génitales de la chienne se présentent généralement sous la forme d'une vaginite bactérienne avec des écoulements, ou bien sont associées à une métrite ou une

salpingite. Les mycoplasmes sont isolés plus fréquemment chez des chiennes présentant ces troubles que chez les chiennes apparemment en bonne santé (63,90,143). Cependant ces observations correspondent souvent à des états de « vaginose chronique » lorsque la flore est grandement modifiée. Ainsi cette plus grande charge en mycoplasmes et cette prévalence plus élevée pourrait être une conséquence de la dysbiose vaginale plutôt que les marqueurs d'une infection primaire à mycoplasme. De plus les cultures pures sont souvent obtenues lors d'affection ne répondant pas à un premier traitement antibiotique (143). Ce traitement antibiotique pourrait être à l'origine d'une sélection des mycoplasmes au détriment d'un pathogène primaire. Le rôle des mycoplasmes est également suspecté lors de pyomètre (144) sans que la causalité de l'affection leur soit clairement attribuée. Certains auteurs admettent l'implication des mycoplasmes lors d'affections urogénitales chez la chienne (80,84), cependant aucune preuve répondant au postulat de Koch n'a été apportée à ce jour.

3.4.2 Affections inapparentes

Les mycoplasmes génitaux sont le plus souvent recherchés lors d'antécédents d'infertilité (non-conception, avortements, mortinatalité). Au CERREC et au CESACAH, les mycoplasmes sont recherchés dans le cadre des suivis de chaleurs dès lors qu'ils sont suspectés chez la chienne suivie. Un seuil de pathogénicité est fixé à 10^4 UFC/échantillon pour la mise en place d'un traitement à base de josamycine 25mg/kg deux fois par jour par voie orale pendant 3 semaines. Ce seuil repose sur les travaux de Martin (122), faisant suite à Dumon et Mimouni (145). Martin a établi ce seuil en étudiant la prévalence et la charge en mycoplasmes vaginaux chez deux groupes de 20 chiennes saines et présentant des troubles de la reproduction. Bien que la différence de prévalence soit significative entre les deux groupes (40% chez les chiennes saines, 80% dans le groupe présentant des troubles), l'étude de la charge en mycoplasmes ne montre pas de réelle différence entre les deux groupes, sinon que des titres plus élevés sont observés chez un petit nombre de chiennes du groupe présentant des troubles de la reproduction. De plus le dénombrement réalisé ne prenait en compte que *M. canis*.

Récemment le CERREC a modifié son protocole vis-à-vis des mycoplasmes canins. En effet, le niveau de preuve en faveur de la pathogénicité des mycoplasmes est faible et ne justifie plus la mise en place d'un traitement antibiotique sur la seule base de l'isolement de mycoplasmes à partir d'écouvillon vaginaux de chienne présentant de l'infertilité.

Le rôle des mycoplasmes n'a jamais été étudié lors des phénomènes de résorption embryonnaire ou fœtale. Il serait intéressant d'étudier la différence de prévalence de ces phénomènes entre un groupe traité ou non contre les mycoplasmes.

3.5 Faut-il traiter ?

3.5.1 Interprétation des cultures

Comme nous l'avons vu précédemment, les mycoplasmes sont des bactéries commensales du tractus génital de la chienne. Ils appartiennent à une flore riche et un équilibre dynamique existe entre les différentes espèces de cette flore et le système immunitaire de l'hôte.

L'isolement de mycoplasmes au niveau de la muqueuse vaginale ou sur les enveloppes fœtales d'un avorton qui se coloniserait lors de la mise-bas ne sont pas des arguments suffisants pour leur attribuer la pathogénicité d'une quelconque affection de l'appareil reproducteur ou d'un avortement. Longtemps supposés stériles, l'utérus et le fœtus possèdent en réalité leur propre microbiote, même si celui-ci est moins important qu'au niveau du vagin. Des mycoplasmes ont été isolés au niveau de l'utérus de chiennes saines (43) et leur ADN a également été retrouvé au niveau de l'endomètre toujours chez des chiennes saines (57). Les prélèvements utérins ne semblent donc pas suffisants pour affirmer ou écarter le rôle pathogène des mycoplasmes. L'isolement de mycoplasmes au niveau des organes internes d'un avorton pourrait être un élément de suspicion important du rôle de ces mycoplasmes dans l'avortement. Il ne semble pas exister de données sur ce sujet.

Le dénombrement est rarement réalisé lors de la recherche de mycoplasmes. Il existe un seuil de pathogénicité fixé par les travaux de Martin et repris par Dumon et Mimouni à 10^6 UFC/ml à partir de prélèvements vaginaux. En dessous de 10^4 UFC/ml, les mycoplasmes ne seraient pas à l'origine d'affections et entre ces deux seuils, le rôle des mycoplasmes peut être fortement suspecté (122,145). Cependant ces résultats n'ont été publiés que pour la thèse de Martin et les conclusions peuvent être critiquées. En effet ces résultats portent sur un petit nombre d'individus et le seuil de suspicion est dépassé chez 50% des chiennes saines. De plus le seuil de « certitude » n'est atteint que pour 9% des chiennes présentant un trouble de la reproduction. Il n'existe à ce jour pas d'autres études portant sur la charge en mycoplasmes chez des groupes de chiennes présentant des troubles de la reproduction.

D'après certains auteurs, ce seuil de 10^6 UFC/ml justifie la mise en place d'un traitement quel que soit le germe en cause et ce, même en l'absence de signe clinique (48).

Dans un contexte de réduction de l'usage des antibiotiques, de telles pratiques semblent dangereuses.

La présence de mycoplasmes en culture pure serait également significative (146). Il est donc important d'associer une bactériologie classique pour écarter le rôle d'un autre pathogène. Cependant nous avons vu que de nombreuses cultures pures étaient obtenues chez des chiennes saines, rendant l'interprétation des résultats difficile.

3.5.2 Pratique actuelle

Depuis les travaux de Martin, le CERREC mettait en place un traitement avec de la josamycine à la dose de 25mg/kg deux fois par jour par voie orale pendant 3 semaines. Cette pratique a récemment été remise en cause en l'absence d'études permettant de prouver l'efficacité d'un tel traitement.

D'après des discussions informelles avec de nombreux vétérinaires, le traitement d'épreuve semble souvent réalisé par les praticiens, avec ou sans culture et encore plus rarement avec un dénombrement.

Les éleveurs sont également très souvent demandeurs de traitements antibiotiques systématiques sur leurs chiennes au moment de la saillie ou de l'insémination. Ces pratiques sont souvent réalisées après avoir rencontré une situation d'infertilité. Les médicaments sont souvent achetés à l'étranger via internet.

Les élevages canins se professionnalisent de plus en plus et les vétérinaires ont un rôle à jouer dans le diagnostic et la prise en charge raisonnée de l'infertilité. Les bilans sanitaires sont des occasions importantes pour discuter des bonnes pratiques d'élevages et la remise en cause celles qui sont infondées.

Il n'existe à ce jour aucune étude recensant et évaluant les usages des éleveurs et praticiens face aux mycoplasmes génitaux. Dans un contexte de réduction de l'usage des antibiotiques, un tel travail permettrait d'identifier les comportements à risque mais également d'évaluer l'intérêt d'un traitement des mycoplasmes lorsqu'ils sont suspectés. La suspicion du rôle pathogène des mycoplasmes pourrait ainsi être renforcée ou bien remise en cause.

3.6 Arsenal thérapeutique

3.6.1 Choix de l'antibiotique

L'absence de paroi permet aux mycoplasmes d'être résistants aux molécules agissant sur la synthèse de la paroi : ainsi les bêta-lactamines et polypeptides sont inefficaces. De plus les capacités de biosynthèse des mycoplasmes sont extrêmement limitées et donc l'absence de certaines enzymes les rends insensibles à d'autres molécules : l'absence de métabolisme de l'acide folique rend les sulfamides et le triméthoprimine inefficaces, l'abondance de lipides membranaires neutres est à l'origine d'une insensibilité à la polymyxine et une particularité de leur ARN polymérase les rend insensible à la rifampicine (147). Certaines quinolones de première et de deuxième génération sont également inutiles (148).

Les **macrolides** sont une des familles de choix pour traiter les mycoplasmoses. Ils inhibent la synthèse protéique en se liant à l'ARNr 23S. Cependant il n'existe pas d'AMM pour ces molécules chez le chien. La josamycine et la tylosine sont particulièrement efficaces. *M. canis* présente une résistance à l'érythromycine (149). La tulathromycine et la gamithromycine sont utilisées pour les mycoplasmoses respiratoires chez les ruminants (150), la sensibilité des mycoplasmes canins n'a pas été étudiée pour ces molécules.

Les **tétracyclines** inhibent également la synthèse des protéines en se liant sur l'ARNr 16S. Elles sont efficaces sur les mycoplasmes canins (149).

Ces deux familles de molécules sont bactériostatiques.

Les **fluoroquinolones** sont les seules molécules bactéricides disponibles. Elles induisent des dommages à l'ADN en se fixant sur les topoisomérases. Elles peuvent se lier directement au brins d'ADN et finissent par induire une mort cellulaire (150). Certains mycoplasmes sont résistants aux fluoroquinolones (151). Leur utilisation doit être réservée aux cas les plus graves.

La spectinomycine et les phénicolés ont été utilisés mais leur efficacité n'est pas prouvée (148,150). La peptide deformylase présente des perspectives intéressantes pour le traitement des mycoplasmoses humaines mais n'est pas encore utilisée en médecine vétérinaire (152,153).

Le choix de l'antibiotique dépend du contexte d'utilisation. Dans le cadre des troubles de la reproduction, le traitement est le plus souvent mis en place au moment de la saillie/insémination ou pendant la gestation. Ainsi la molécule utilisée doit être exempte d'effet tératogène ou embryotoxique. Les fluoroquinolones sont à l'origine de troubles du développement des cartilages et des ligaments alors que les tétracyclines sont responsables

d'agénésie dentaire ou de défaut d'ossification chez les nouveau nés (154). Les macrolides (josamycine et tylosine) semblent donc être les molécules de choix pour les mycoplasmoses urogénitales dans un contexte d'infertilité. Cependant ces molécules ne possédant pas d'AMM chez le chien il convient de les utiliser avec prudence en prenant en compte la balance bénéfice/risque du traitement.

3.6.2 Mycoplasmes et antibiorésistance

3.6.2.1 Contexte et enjeux

Les problématiques d'antibiorésistance se font grandissantes pour de nombreuses bactéries à travers le monde, d'autant plus que la découverte de nouvelles molécules ou familles de molécules antibiotiques ne suit pas le rythme d'apparition de ces résistances. A l'échelle nationale le plan EcoAntibio vise à faire baisser la pression de sélection de ces résistances en limitant l'usage des antibiotiques.

Les mycoplasmes n'échappent pas à cette problématique. En effet leur génome simplifié s'accompagne d'un système de réparation de l'ADN peu performant (107) et donc d'une hypervariabilité génétique importante. Ce taux de mutation élevé, ainsi que des points chauds de mutation dans des zones de leur ADN associé à des résistances aux antibiotiques, rendent propice l'apparition rapide d'antibiorésistances chez les mycoplasmes.

En effet *M. bovis* présente déjà de nombreuses résistances acquises par exemple à la tétracycline, à la clindamycine, à l'azithromycine et à l'érythromycine (155). Sa sensibilité à d'autres molécules évolue également puisqu'il a été montré que sa résistance aux tétracyclines, à la tylosine et à la tilmicosine augmentait (156).

Chez l'homme ces résistances sont également en augmentation partout dans le monde. Au Japon et en Nouvelle-Zélande, *M. genitalium* présente de plus en plus de résistances aux macrolides et aux fluoroquinolones (157,158). Le même phénomène est observé en Chine avec *M. hominis* (159). Aux Etats-Unis, plus d'un tiers des mycoplasmes isolés chez des femmes présentant des infections urinaires sont résistants à la tétracycline (160). Des niveaux de résistances encore plus inquiétants sont observés dans certaines région comme l'Afrique du Sud (161).

Les mycoplasmes canins ont été assez peu étudiés et il n'existe pas de données sur les phénomènes de résistances aux antibiotiques chez ces espèces. Cependant, il apparait vraisemblable que les mécanismes d'antibiorésistance soient similaires à ceux qui sont observés chez les autres mycoplasmes.

3.6.2.2 Les différents mécanismes de résistances

Le principal mécanisme d'antibiorésistance chez les mycoplasmes repose sur une modification de la cible des antibiotiques. Les principaux mécanismes de résistances sont résumés dans la figure 10.

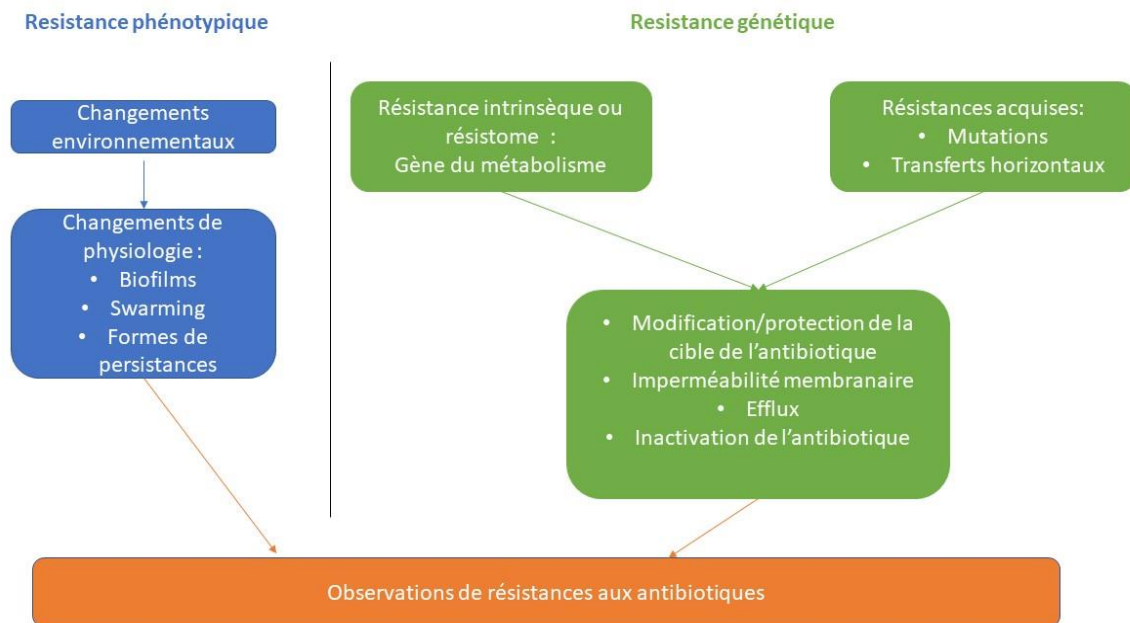


Figure 10 Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (source Khalil (2017) (150))

3.6.2.3 Résistances aux tétracyclines

La résistance aux tétracyclines fait intervenir deux mécanismes : la modification de la cible, l'ARNr 16S et la protection de cet ARNr 16S par la protéine de résistance aux tétracycline (Tet(M)), dont le gène proviendrait d'un transposon appartenant à un streptocoque (115,150). On peut retrouver ces deux mécanismes chez une même espèce de mycoplasme. Se pose alors la question du transfert horizontal de gènes chez les mycoplasmes qui pourrait être à l'origine de l'apparition rapide de résistance.

L'observation de résistances aux tétracyclines n'est pas récente et remonte à plusieurs décennies (162). Cependant comme pour la plupart des bactéries, l'observation de ces phénomènes s'accélère et réduit progressivement le panel des molécules disponibles.

3.6.2.4 Résistances aux macrolides et molécules associées

M. canis présente une résistance intrinsèque à l'érythromycine : le mécanisme repose sur une mutation atypique de l'ARNr 23S.

Chez les autres mycoplasmes les mécanismes de résistance reposent sur la modification des domaines II et V de l'ARNr 23S ainsi que des protéines ribosomiques (L4 et L22) par mutation (148,150,163,164). D'autres mécanismes comme un efflux de macrolides, sont aujourd'hui suspectés mais non prouvés chez les uréaplasmes et *M.pneumoniae* (164,165).

Les mutations à l'origine des modifications de l'ARNr 23S sont connues et permettent de prévoir à quelles molécules les mycoplasmes seront résistants (148).

3.6.2.5 Résistances aux fluoroquinolones

Les résistances aux fluoroquinolones reposent sur des modifications de la topoisomérase IV ainsi que des mutations des gènes codant pour l'ADN-gyrase (séquences *gyrA*, *gyrB*, *gyrC* et *gyrE*) (166). Il existe un effet cumulatif de ces différentes mutations qui augmente progressivement le niveau de résistance à ces molécules et que l'on retrouve plus fréquemment chez les uréaplasmes (166–169).

Un mécanisme d'efflux existe chez *M. hominis* (164) et est suspecté chez d'autres espèces comme *M. bovis* (150).

La résistance aux fluoroquinolones est moins importante que pour les autres familles de molécules. La plupart des fluoroquinolones restent efficaces là où les macrolides ont perdu leur pouvoir bactériostatique (155). Au cours des 30 dernières années, l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est modérée chez *M. bovis* comparée aux autres familles d'antibiotiques (170). Même si la tendance générale est à l'accélération des résistances, le seuil de résistances aux fluoroquinolones reste aujourd'hui en deçà d'un seuil faible. Cela pourrait s'expliquer par les mécanismes d'efflux, moins efficaces que d'autres mécanismes de résistance, ou bien à mettre en rapport avec le caractère bactéricide de ces molécules.

3.6.2.6 Cas des mycoplasmes génitaux canins

Les mécanismes d'antibiorésistances chez les mycoplasmes présents au niveau de la sphère urogénitale de la chienne n'ont pas été étudiés. Néanmoins il paraît raisonnable de supposer que les mêmes mécanismes entrent en jeu chez ces espèces.

Les mycoplasmes canins ne représentant pas un enjeu aussi important que certains mycoplasmes respiratoires ou génitaux chez l'homme ou la vache, comme *M.genitalium*, *M.bovis* ou des uréaplasmes, il est fort probable qu'ils n'aient pas été soumis à une pression de sélection par des antibiotiques aussi importante. La prévalence des résistances est donc

potentiellement moins importante chez *M.canis* et les autres espèces de mycoplasmes génitaux de la chienne.

Cependant certains éleveurs ont l'habitude de traiter avant l'insémination et la mise bas de façon systématique pour prévenir certaines infections. De plus, la mise en évidence de mycoplasmes génitaux, qui n'est pas associée à une charge bactérienne importante ou à des signes cliniques, est souvent traité à l'aide d'antibiotiques par habitude, selon un principe de précaution (145). Ces habitudes, remises en cause aujourd'hui, ont pu participer à une sélection de résistances chez les mycoplasmes.

Une étude des habitudes des éleveurs et des vétérinaires confrontés à la découverte de mycoplasmes, et de la prévalence de résistances chez ces différentes souches permettrait de poser un constat clair sur la situation actuelle.

Conclusion de l'étude bibliographique

L'analyse de la littérature montre que le microbiote vaginal de la chienne est riche. De nombreuses variations individuelles existent et les différentes méthodes utilisées ne permettent pas d'établir une description précise d'un microbiote vaginal « normal ». Une approche fonctionnelle, permettant de désigner un microbiote comme sain en l'absence de signes cliniques et permettant des fonctions reproductives normales, semble plus appropriée.

De nombreuses bactéries appartenant au microbiote vaginal de la chienne sont des pathogènes opportunistes et rendent difficile le diagnostic lors d'affection génitale et d'infertilité. L'infertilité d'origine bactérienne doit être envisagée dans une approche globale des troubles de la reproduction et les facteurs de risques doivent être systématiquement identifiés.

Les mycoplasmes appartiennent au microbiote vaginal de la chienne. Ces bactéries atypiques, appartenant à la classe des Mollicutes se caractérisent par leur petite taille, l'absence de paroi et un génome minimaliste. Ces particularités les rendent dépendantes d'un hôte. Les mycoplasmes possèdent également de nombreuses propriétés, nécessaires à leur mode de vie parasite, constituant leur pouvoir pathogène : adhésion, fusion, invasion, modulation de l'immunité et grande variabilité antigénique.

Leur rôle pathogène est connu chez d'autres espèces mais n'a jamais été confirmé chez la chienne. L'étude de la littérature permet tout de même une forte suspicion des effets délétères qu'ils peuvent provoquer, les mycoplasmoses génitales étant fréquentes lors d'affections de l'appareil reproducteur.

Bien qu'aucune preuve formelle n'existe, les mycoplasmes sont tout de même inclus dans la démarche diagnostique de l'infertilité chez la chienne. Leur simple isolement motive souvent la mise en place d'un traitement antibiotique, indépendamment d'une évaluation quantitative pourtant indispensable puisqu'il s'agit d'organismes commensaux.

Il apparaît donc nécessaire de rechercher des données qui pourraient être en faveur ou non du rôle pathogène des mycoplasmes, et d'évaluer l'intérêt des pratiques thérapeutiques actuelles, ce qui n'a pas encore été réalisé à notre connaissance.

Deuxième partie : Etude expérimentale des effets des mycoplasmes vaginaux sur la prolificité et la croissance des chiots dans une population de chiennes reproductrices

Les mycoplasmes canins et leur impact sur la fonction de reproduction ont été peu étudiés. Le rôle pathogène est mal connu et ne fait pas consensus. Pourtant ils sont régulièrement à l'origine d'un traitement antibiotique. La mise en place de ce traitement est aujourd'hui remise en cause, faute de données scientifiques claires. Le manque de moyen diagnostiques fiables pour établir le rôle des mycoplasmes rend indispensable l'évaluation de l'utilité d'un tel traitement. En effet l'augmentation des antibiorésistances impose la plus grande prudence et de la parcimonie dans l'usage des antibiotiques et des traitements basés sur des études de suspicions ne sont plus éthiquement acceptables.

Une population de chiennes suivies par le CESECAH a fait l'objet de prélèvements vaginaux. Dans cette partie nous présenterons les résultats des cultures de mycoplasmes et des cultures bactériologiques réalisées à partir de ces prélèvements.

1 Matériels et méthode

1.1 Animaux et prélèvements

Les données ont été collectées par le Docteur Bonte au CESECAH entre Janvier 2019 et Janvier 2020. Au total, 53 chiennes de races Golden retriever et Labrador faisant partie du programme d'élevage de l'Association des chiens guide d'aveugles sont suivies par le centre de reproduction. Au total ces chiennes ont mis bas 336 chiots dont les poids ont été enregistrés à la naissance, à un jour et à une semaine.

Pour chaque chienne, un prélèvement a été réalisé au moment de l'insémination. Les prélèvements sont réalisés au niveau du vagin antérieur à l'aide d'un écouvillon stérile et humidifié, protégé par une garde pour éviter toute contamination selon la méthode décrite dans le paragraphe 1.1.2.1. Deux écouvillons ont été réalisés pour chaque chienne, l'un pour une culture et un dénombrement des mycoplasmes, l'autre pour une bactériologie classique.

Toutes les chiennes ont été inséminées *in utero* par guidage endoscopique par le même opérateur à l'aide, soit d'une semence fraîche soit d'une semence congelée.

Deux chiennes ont été exclues de l'étude : l'une pour absence de gestation (infertilité attribuable au mâle), l'autre en raison d'un avortement médical faisant suite de multiples résorptions. A l'exception d'une chienne confirmée gestante après une seconde tentative d'insémination, toutes les chiennes n'ont été inséminées qu'une seule fois.

1.2 Analyses des prélèvements

Les prélèvements pour mycoplasmes sont placés dans un bouillon spécifique, identique au milieu de culture, sous couvert de froid pour le transport.

Le prélèvement pour la culture bactériologique classique est envoyé simultanément dans la gaine de l'écouvillon prévu à cet effet.

1.2.1 Isolement et dénombrement des mycoplasmes

Les analyses de mycoplasmes sont réalisées par l'UMR Mycoplasmoses des ruminants à VetAgro Sup. Le bouillon de culture utilisé est spécifique à la culture des mycoplasmes, il est fourni par Indicia Biotechnologies et contient des inhibiteurs fongiques et bactériens.

Six dilutions sont réalisées (10^{-1} à 10^{-6}) à partir de l'échantillon initial puis mises à incuber à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. L'incubation dure 3 à 4 jours jusqu'à l'apparition d'une turbidité. La validation de la présence de mycoplasmes est réalisée avec la mise en culture des bouillons suivant : le dernier et l'avant dernier bouillon présentant une turbidité ainsi que le premier ne présentant pas de turbidité. Le milieu de culture utilisé est également spécifique pour la culture de mycoplasmes et est fourni par Indicia Biotechnologies. L'observation des colonies à l'aspect typique d'« œuf au plat » valide la présence de mycoplasmes. L'identification de l'espèce n'est pas réalisée pour le diagnostic.

Cette méthode permet d'obtenir une appréciation semi quantitative de la charge en mycoplasmes. En suivant les travaux d'O.Martin (122), une culture est positive si les dilutions supérieures à 10^{-4} permettent d'obtenir une culture de mycoplasmes.

1.2.2 Bactériologie classique

La culture et l'identification sont réalisées par le Laboratoire des Leptospires et Analyses vétérinaires (LAV, anciennement LVD69) situé sur le campus de Vétérinaire de VetAgro Sup.

Pour la culture et l'identification, deux milieux, fournis par BIOMERIEUX sont utilisés : une gélose Columbia supplémentée de 5% de sang (« COS ») et une gélose identique à laquelle ont été ajoutées de l'acide nalidixique et de la colisitine (molécules inhibant les bactéries à Gram négatif et rendant le milieu spécifique des bactéries à Gram positif) (« ANC »). La moitié de chaque gélose estensemencée à l'aide de l'écouvillon vaginal, l'étalement sur la deuxième moitié des géloses est réalisé à l'aide d'une anse stérile. Les milieuxensemencés sont incubés 18 à 24 heures à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. En l'absence de pousse les géloses sont incubées 24 heures supplémentaires. En cas de culture

microbienne pure, des tests d'orientation sont réalisés (coloration de Gram, catalase ou oxydase). L'identification est ensuite réalisée par des tests biochimiques à l'aide de galeries d'identifications (BIOMERIEUX : API 20E ou API 20NE ou API STAPH ou API STREPTO ou API Coryne). Le laboratoire propose le séquençage des souches isolées ainsi que la réalisation d'antibiogramme qui n'ont pas été réalisés dans le cadre de cette étude.

1.3 Traitement

La répartition entre chiennes traitées et non traitées a été réalisée selon l'ordre chronologique d'apparition des chaleurs. La première moitié des individus arrivés en chaleurs ont été destinés à recevoir un traitement, les individus restant ne reçoivent pas de traitement.

Pour les chiennes rentrant de la catégorie traitée, le traitement varie en fonction des résultats des cultures. En cas de culture des mycoplasmes positives et de culture bactériologique pure, les chiennes reçoivent un traitement par voie orale pendant 3 semaines à base d'amoxicilline à la dose de 12.5 mg/kg deux fois par jour et de josamycine à la dose de 25 mg/kg deux fois par jour. Si seule la culture des mycoplasmes est positive, alors les chiennes n'ont reçu que la josamycine. Inversement, si la culture des mycoplasmes est négative mais qu'une culture pure en bactériologie classique est obtenue, les chiennes reçoivent uniquement le traitement à base d'amoxicilline.

En cas de cultures négatives pour les mycoplasmes et de culture mixte en bactériologie, les chiennes basculent dans la catégorie non traitée.

Les chiennes de la catégorie non traitée n'ont reçu aucun traitement quels que soient les résultats des cultures de mycoplasmes et bactériologie classique.

1.4 Groupes, objectif et Analyse statistique

La population sera donc divisée en trois groupes : les chiennes négatives (Groupe Neg) pour la recherche de mycoplasmes, les chiennes positives traitées (Groupe Pos_traitées) et les chiennes positives non traitées (Groupe Pos_non_traitées). Le but de cette division est d'identifier un potentiel effet des mycoplasmes sur différents paramètres de la reproduction et d'évaluer l'intérêt d'un traitement chez les chiennes positives.

Il est également possible de subdiviser les groupes en fonction des résultats de la bactériologie pour évaluer l'influence d'autres micro-organismes et mettre en perspective les résultats basés sur la seule analyse des mycoplasmes. Par la suite nous désignerons chaque sous-groupe par un numéro comme indiqué dans le tableau 5.

<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Bactériologie Mycoplasmes </div>		Culture mixte	Culture pure
		I	II
Culture négative	Non traitée	I	II
	Traitées		VII
Culture positive	Non traitées	III	IV
	Traitées	V	VI

Tableau 5 Numéro attribué à chaque sous-groupe de la population d'étude en fonction des résultats des cultures et de la mise en place d'un traitement

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 3.6.3) (171). Les tests statistiques ont été choisis après vérification de la normalité des distributions (appréciation visuelle grâce aux interquartiles et grâce au test de normalité de Shapiro-Wilk) et de l'égalité des variances (test de Levene). La valeur seuil de p (p-value) au-dessous de laquelle une différence sera considérée significative est fixée à 0.05.

Les différences globales de moyenne de chiots par chienne ou de gain de poids relatif des chiots appartenant aux différents groupes et sous-groupes ont été comparées, soit à l'aide de l'analyse des variances à un facteur (pour variances supposées non égales, test de Welch et son extension, ANOVA et test de Student dans le cas de variances égales) si le théorème de l'approximation normale pouvait s'appliquer pour la distribution des valeurs, soit à l'aide du test de la somme des rangs de Kruskal-Wallis dans le cas contraire. Lorsqu'une différence globale a été mise en évidence, la méthode de Bonferroni-Holm a été utilisée pour mettre en évidence une différence deux à deux.

Des régressions ont été réalisées pour étudier les interactions entre les différents facteurs. La prolificité est une variable de comptage (entier positif ne prenant que quelques valeurs) et non une variable quantitative continue (suivant une distribution gaussienne). Une régression de Poisson multivariée a donc été réalisée (plutôt qu'une régression linéaire) avec la prolificité comme variable dépendante du résultat pour la recherche de Mycoplasmes, de la bactériologie, du groupe de traitement et de la dilution. Les interactions ont été traitées deux à

deux et représentées graphiquement. Le gain de poids relatif est une variable quantitative continue. Une régression linéaire a été réalisée pour cette variable et les effets d'interaction observés graphiquement deux à deux de façon similaire.

2 Résultats

2.1 Mycoplasmes et bactériologie

Une seule chienne ne présentait aucun mycoplasmes (dilution 0), la répartition de la dernière dilution présentant une turbidité de chaque prélèvement est représentée sur la figure 11.

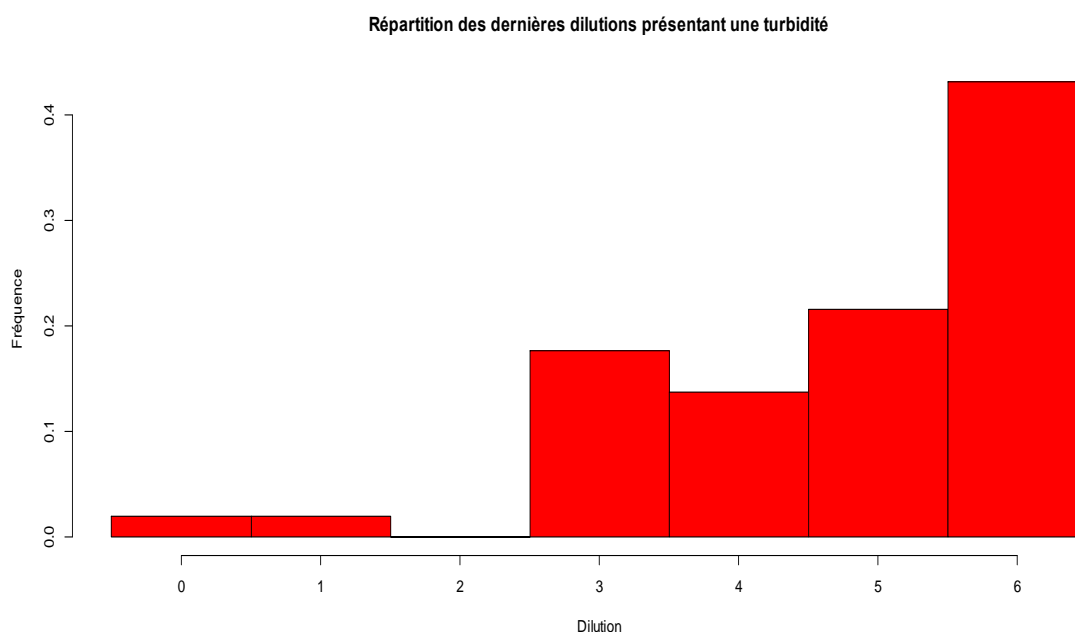


Figure 11 Histogramme de la répartition des dernières dilutions présentant une turbidité. Le nombre x en abscisse correspond à la dilution à 10^{-x} , le seuil de positivité d'un échantillon est fixé à la dilution 10^{-4}

Un seul échantillon s'est avéré stérile à la bactériologie, différent de l'échantillon stérile à la culture de mycoplasmes. Les prélèvements de 14 chiennes ont donné des cultures pures et sont donc considérés positives à la bactériologie. Les bactéries isolées en cultures pures sont, par ordre de prévalence décroissant : *Pasteurella multocida* (4), *E.coli* (3), *Streptococcus canis* (2), des staphylocoques à coagulase positives (2), *Streptococcus dysgalactiae* (2) et *Gardnerella vaginalis* (1). Ces bactéries appartiennent toute à la flore commensale de la chienne et sont connues pour être des pathogènes opportunistes. Aucune des chiennes dont la bactériologie a permis d'isoler un germe en culture pure ne présentait de

symptômes de vaginites ou évocateurs d'autres affections génitales. Les cultures mixtes comportaient toutes au moins trois germes en cultures.

Il n'y avait pas de chienne destinée à recevoir un traitement dont les prélèvements étaient négatifs pour la recherche de mycoplasme et ont abouti à une culture pure en bactériologie. Le sous-groupe VII présente donc un effectif nul. Le reste des effectifs de chaque sous-groupe est présenté dans le tableau.

Bactériologie Mycoplasmes		Culture mixte	Culture pure	Total
		-	9 (I)	3 (II)
+	Non traitées	12 (III)	5 (IV)	17 (Pos_non_traitées)
	Traitées	16 (V)	6 (VI)	22 (Pos_traitées)
Total		37	14	51

Tableau 6 Effectifs des sous-groupes résumés en tableau 5

2.2 Fertilité

Toutes les chiennes de l'étude ont mené une gestation à terme. L'analyse de la fertilité ne permet donc pas d'évaluer un potentiel rôle pathogène des mycoplasmes ni l'effet du traitement.

2.3 Prolificité

2.3.1 Etude statistique simple

Les chiennes de l'étude ont mis bas 336 chiots au total, soit une moyenne de 6.9 chiots par chienne.

Les trois groupes de chiennes présentent des prolificités différentes. La plus importante se retrouve chez le groupe Neg avec une moyenne de 7.7 chiots par chienne, les chiennes du groupe Pos_traitées de 6.9 chiots par chienne et les chiennes du groupe Pos_non_traitées de 6.3 chiots par chiennes. La distribution du nombre de chiot par chienne et les diagrammes en boîtes correspondant sont représentés dans la figure 12. Les différences de prolificité ne sont pas significatives entre les trois groupes (Extension du test de Welch, p-value = 0.268).

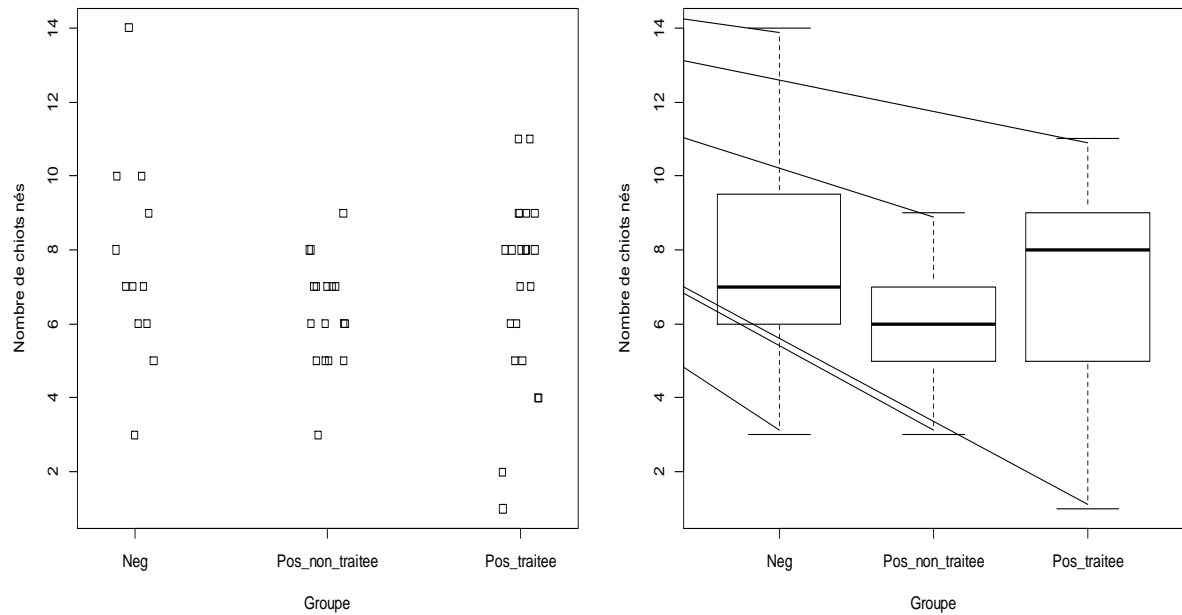


Figure 12 Distribution des chiots nés par chienne et diagramme en boîte correspondant (De gauche à droite sont représentés les groupes négatives, positives non traitées et positives traitées)

Lorsque l'on s'intéresse uniquement au résultat de la recherche de mycoplasmes on observe une différence : 7.7 chiots par portée chez les chiennes négatives pour la recherche de mycoplasmes et 6.7 pour les positives ; cette différence n'est pas significative (test de Student, p-value = 0.279).

Il n'y a pas de différence si l'on compare la prolificité des chiennes ayant ou non reçu de la josamycine (sans tenir compte du résultat de la culture des mycoplasmes). La moyenne pour les individus traités est de 7.0 chiots/ chienne contre 6.9 pour les chiennes n'ayant pas reçu de traitement ; cette différence est non significative (test de Student, p-value=0.894).

La différence de prolificité entre les chiennes positives traitées (6.9 chiots) et les chiennes positives non traitées (6.3 chiots) est faible. Le traitement ne semble pas avoir un impact intéressant sur la prolificité (augmentation inférieure à un chiot par portée) en cas de résultat positif pour les mycoplasmes. De plus cette différence n'est pas significative comme vu avec la comparaison des moyennes de ces deux groupes et de celle du groupe des chiennes négatives pour la recherche de mycoplasmes (extension du test de Welch, p-value=0.268).

En cas de culture bactériologique pure, la moyenne de chiots par portée est de 7.1, tandis que les chiennes dont les prélèvements ont donné des cultures mixtes ont en moyenne des portées de 6.8 chiots. Cette différence n'est pas statistiquement significative (test de Student, p-value=0.646).

L'analyse portant sur les groupes plus restreints intégrant les résultats de la bactériologie et de la culture de mycoplasmes permet de révéler des différences significatives.

Le tableau 7 résume les différentes moyennes de chiots par portée dans les différents sous-groupes. On retrouve globalement les mêmes différences que pour les groupes plus larges : les chiennes négatives pour les mycoplasmes et la bactériologie ont la prolificité la plus importante suivie par les chiennes traitées et les chiennes non traitées. Les différences sont plus importantes que pour les comparaisons précédentes, avec des différences entre deux groupes allant de 1 à 3 chiots par portée. Les effectifs étant très faibles pour certains groupes (inférieurs ou égaux à 5 pour les groupes II et IV), les tests statistiques ne peuvent s'appliquer correctement à l'ensemble des groupes. Le résultat d'un test de la somme des rangs de Kruskal-Wallis confirme l'absence de différence non significative ($p\text{-value}=0.08189$). En excluant les groupes II et IV (effectifs inférieur ou égal à 5 individus) on obtient une différence globale significative entre les autres groupes (test de la somme des rangs de Kruskal-Wallis, $p\text{-value}=0.04416$) cependant il n'existe pas de différences significatives entre deux groupes.

Groupe	I	II	III	IV	V	VI
Moyenne de chiots par chiennes	8.4	5.3	6.1	6.8	6.4	8.3
[min-max]	[5-14]	[3-7]	[3-8]	[5-9]	[1-11]	[4-11]

Tableau 7 Moyenne des chiots par chienne (le détail des groupes est donné dans le tableau 5)

2.3.2 Réalisation d'un modèle statistique pour l'étude des interactions entre variables

Pour étudier les effets des différents prédicteurs sur la prolificité, les variables (mycoplasmes, bactériologie, traitement et résultat de la dilution) ont été intégrées dans un modèle de Poisson, adapté lorsque la variable à analyser résulte d'un processus de comptage comme dans le cas du nombre de chiots par portée. Aucune des variables n'influent significativement sur la prolificité dans notre modèle car aucune des valeurs de p associées aux différents prédicteurs simple n'est inférieure à 0.05. Le modèle utilisé ne semble donc pas pertinent pour conclure sur les effets des différentes variables mais il permet d'observer des tendances et de les comparer aux résultats observés. Le résumé statistique des différents coefficients associés au modèle est indiqué dans le tableau 8 ; et la tendance des effets des prédicteurs est représentée graphiquement en figure 13.

	Coefficient estimé	Ecart-type	Valeur de z	Pr(z) (valeur de p)
Intercept	1.95920	0.19567	10.013	$< 2 \times 10^{-16}$
Dilution	0.02569	0.06511	0.395	0.693
Bactériologie	0.05226	0.11838	0.441	0.659
Traitement	0.10124	0.12606	0.803	0.422
Mycoplasmes	-0.27470	0.23727	-1.158	0.247

Tableau 8 Résumé des coefficients de la régression de Poisson sans termes d'interaction, réalisé à partir des données de prolificité

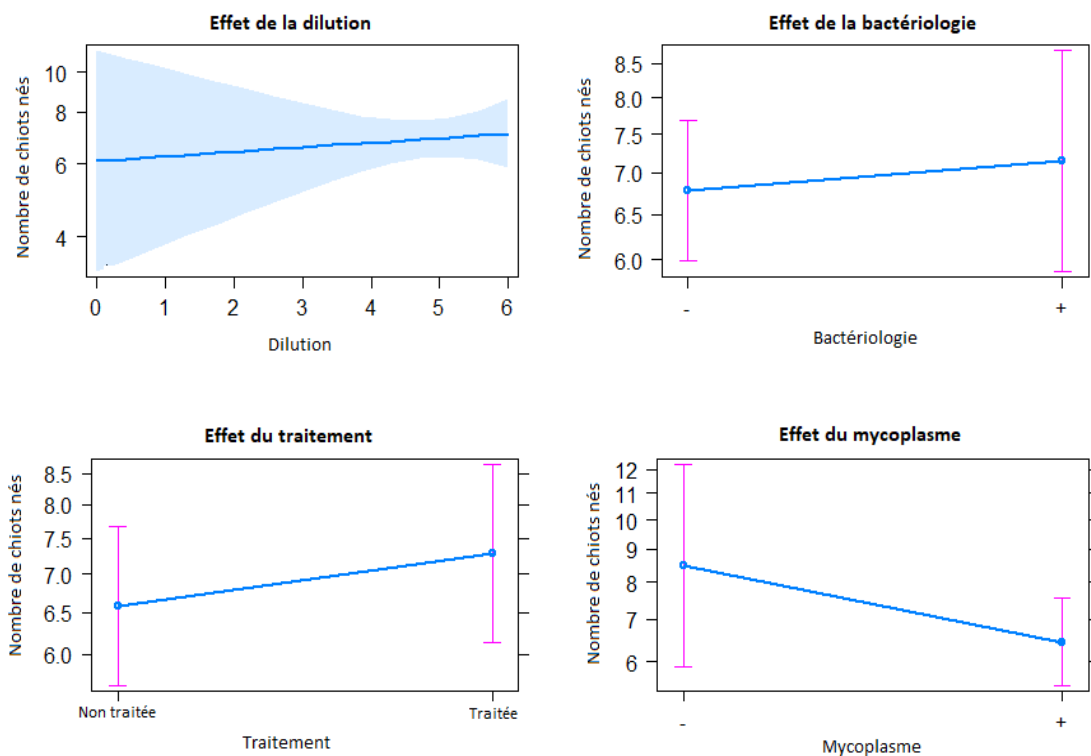


Figure 13 Représentation graphique de l'effet des prédicteurs simples dans la régression de Poisson réalisée sur la prolificité

Une fois intégrés dans le modèle choisi, les prédicteurs ont des effets cohérents avec les résultats obtenus dans l'étude statistique simple. Les effets du traitement et de la bactériologie sont minimes (l'écart étant inférieur à un chiot par portée). La prédiction de l'effet des mycoplasmes par le modèle semble supérieure à l'écart observé (écart de deux

chiots par portée dans le modèle pour un écart observé d'un chiot). Cependant cet écart n'est pas significatif, les intervalles de confiance se chevauchant très largement. L'effet de la dilution prévu dans le modèle semble négligeable. En effet le manque de valeurs dans les dilutions faibles (faible charge en mycoplasmes) induit des intervalles de confiances rendant toute interprétation impossible. Dans les valeurs de dilutions hautes, nous disposons de plus de valeurs et le modèle semble plus fiable. La tendance semble être inverse à l'effet des mycoplasmes catégorisé en positif et négatif à partir du seuil de la 4^{ème} dilution. Cet effet est surprenant mais ne pose pas de problème dans l'interprétation car aucuns des paramètres n'est significatif. Cependant intégrer deux covariables (le résultat des mycoplasmes est directement dépendant de la dilution) peut poser des problèmes de multicollinéarité et aurait empêché toute interprétation en cas de résultat significatif.

Pour étudier les effets d'interactions entre les différentes variables nous avons ajouté un à un au modèle les termes d'interactions entre les variables. En cas d'interaction significative l'apport de ce terme au modèle est testé par un ANOVA. Les interactions non significatives ont tout de même été représentées pour observer des tendances générales.

L'ajout du terme d'interaction entre le résultat de la bactériologie et le traitement n'est pas significatif (p-value=0.107). La représentation graphique des coefficients du modèle avec cette interaction est montrée par la figure 14. Bien que non significative, il semble qu'une interaction soit présente entre les deux variables. Le traitement n'engendrant aucune amélioration de la prolificité dans le cas d'une culture mixte (bactériologie négative ou « - »), alors que ce même traitement semble augmenter la prolificité de plus de deux chiots en cas de culture pure (bactériologie positive ou « + »), cependant les intervalles de confiance se chevauchent. En cas de culture pure en bactériologie la mise en place d'un traitement antibiotique pourrait avoir un intérêt en termes de prolificité.

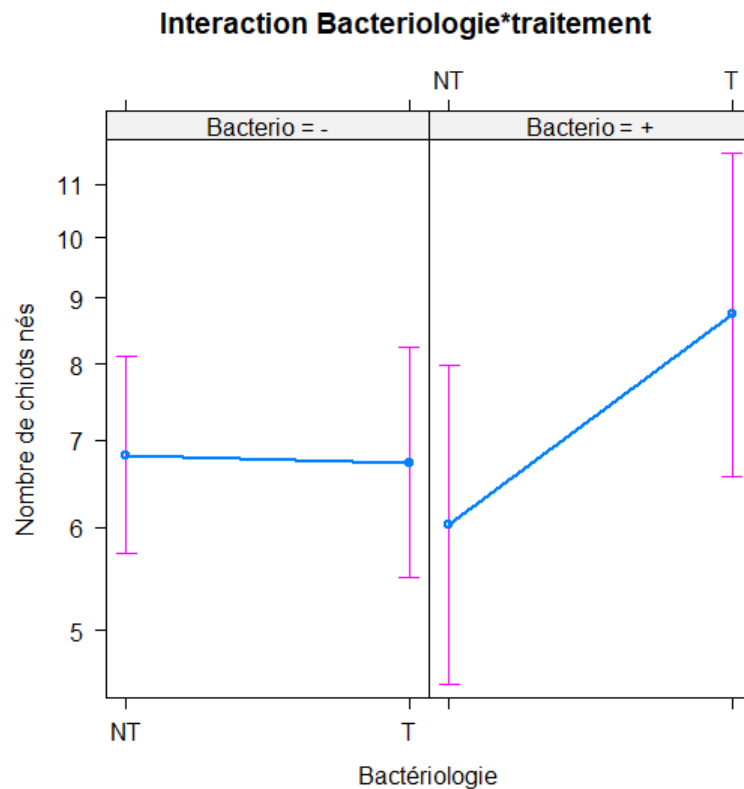


Figure 14 Représentation graphique de l'interaction entre le résultat de la bactériologie et la mise en place d'un traitement dans une régression de Poisson

L'interaction entre la bactériologie et la valeur de la dilution peut être considérée comme faiblement significative (p -value = 0.0535). La valeur de p est très proche du seuil de significativité choisi dans notre travail. L'apport de cette interaction au modèle a tout de même été testé et le résultat de l'ANOVA montre que le modèle est plus pertinent en prenant en compte ce terme d'interaction (p -value=0.0479). La représentation graphique des coefficients du modèle avec cette interaction est montrée par la figure 15. L'interaction entre la bactériologie et le résultat mycoplasme (directement dépendant de la dilution) semble plus intéressante d'un point de vue statistique (p -value =0.0337), la valeur de p étant plus faible. La réalisation d'un test ANOVA montre également une amélioration du modèle lorsque ce terme d'interaction est pris en compte (p -value =0.0272). Le graphique des coefficients du modèle en prenant en compte l'interaction entre la bactériologie et les mycoplasmes est représenté en figure 16. Les deux interactions sont très similaires. On observe une inversion de tendance en fonction du résultat de la recherche de mycoplasmes. Pour de faibles charges en mycoplasmes (faibles valeurs de la dilution ou mycoplasmes négatif « - »), il semblerait que la bactériologie ait un effet sur la prolificité. En effet on observe une baisse importante (plusieurs chiots de différence par portée) en cas de culture bactériologique pure. En revanche pour de fortes charges en mycoplasmes (dilution élevée ou mycoplasmes positif « + »)

+ »), le résultat de la bactériologie n'ait pas d'effet, les proliférations n'étant pas différentes. Les mycoplasmes viendraient ainsi balancer les effets néfastes d'une flore bactérienne anormale (une culture pure étant considérée comme anormale) sur la prolifération. Cependant, nous disposons de nombreuses observations pour de fortes charges en mycoplasmes mais peu pour de faibles charges. Ainsi notre modèle semble fiable pour les fortes charges en mycoplasmes mais ne nous permet pas de conclure pour les faibles charges et le résultat négatif en mycoplasmes. Cela est confirmé par des intervalles de confiance très larges pour les faibles charges en mycoplasmes.

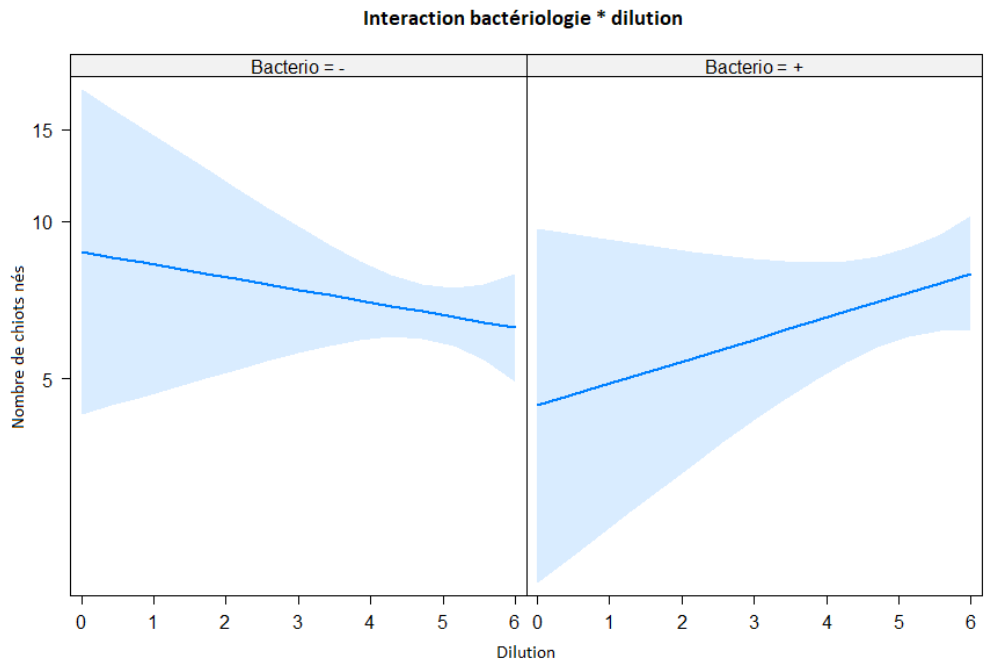


Figure 15 Représentation graphique de l'interaction entre le résultat de la bactériologie et la valeur de la dilution dans une régression de Poisson

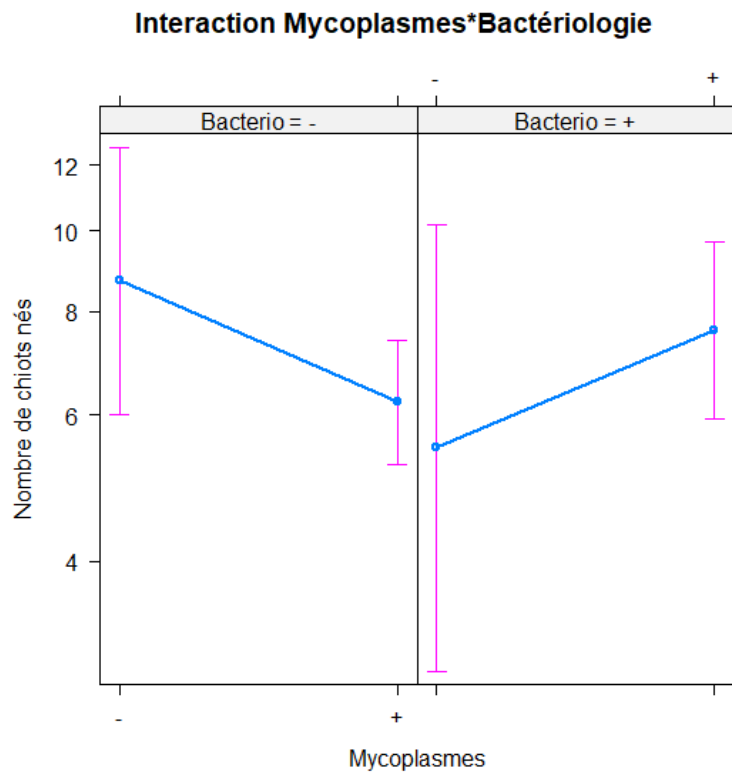


Figure 16 Représentation graphique de l'interaction entre le résultat de la bactériologie et la recherche de mycoplasmes dans une régression de Poisson

L'analyse de l'interaction entre le résultat des mycoplasmes et la dilution ne fait pas sens car le premier est directement dépendant du second.

Dans notre étude les chiennes négatives pour la recherche de mycoplasmes (dilution strictement inférieure à 4) ne sont pas traitées, nous ne disposons donc d'aucune observation de chiennes négatives et traitées. Il n'est pas possible d'extrapoler des valeurs à l'aide de notre modèle à partir d'une variable qualitative («+ » ou «- »). Pour observer une interaction entre le traitement et la charge en mycoplasmes nous devons donc utiliser la dilution, les valeurs pour des chiennes traitées mais ayant de faibles charges en mycoplasmes sont extrapolées à partir des observations des chiennes traitées et ayant de fortes charges en mycoplasmes. Cette interaction n'est pas significative (p -value =0.574). La figure 17 représente le graphique de l'interaction entre le traitement et la valeur de la dilution.

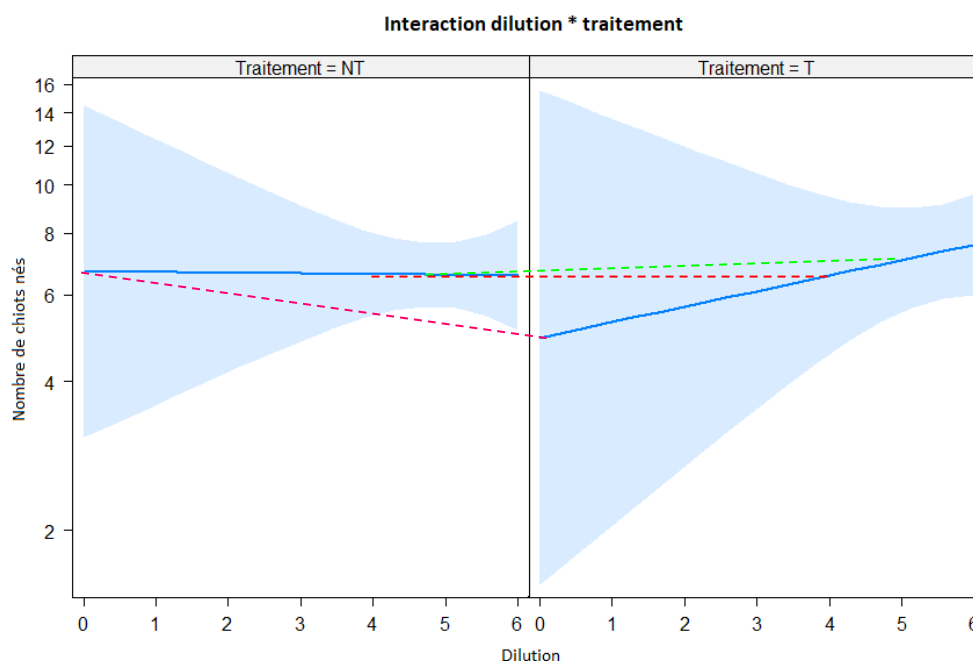


Figure 17 Représentation graphique de l'interaction entre la dilution et la mise en place d'un traitement dans une régression de Poisson

Dans le groupe non traité la charge en mycoplasmes ne semble avoir aucun effet sur la prolificité, la droite de régression étant horizontale. Cependant la valeur observée pour les chiennes négatives (et donc non traitées) était supérieure à celle pour les positives non traitées (respectivement 7.7 et 6.3 chiots) bien que cette différence ne fût pas significative. Le modèle ne semble pas représentatif pour ces catégories de chiennes. Dans le groupe des chiennes traitées la droite de régression présente une légère pente ascendante. Les prolificités des chiennes avec de fortes charges en mycoplasmes (mycoplasmes « + » ou dilution supérieure

ou égale à 4) prévues par le modèle sont similaires (avec ou sans traitement) de la même façon que les moyennes observées étaient proches entre les chiennes positives traitées et non traitées (respectivement 6.3 et 6.9 chiots). On peut étudier les tendances de l'effet du traitement pour chaque valeur de la dilution. Trois droites sont représentées en pointillés sur le graphique (respectivement violet, rouge et vert pour les dilutions 0, 4 et 5). On observe une inversion de la pente entre la dilution 4 et 5. Cette observation semble aller dans le sens de l'intérêt du traitement à partir de la dilution 4 qui est par ailleurs le seuil de positivité retenu pour les mycoplasmes. En revanche les pentes observées sont faibles, l'effet suspecté n'est pas significatif et on remarque également des intervalles de confiance aberrants (de 0 à 16 chiots) autour de la valeur prédite par le modèle pour les chiennes traitées avec de faibles charges en mycoplasmes. Ce manque de précision empêche toute conclusion mais il semblerait que, malgré l'observation de certaines tendances, la charge en mycoplasmes et le traitement n'interagissent pas significativement l'un avec l'autre et même que les mycoplasmes ne semblent pas avoir un effet délétère significatif sur la prolificité.

La charge en mycoplasmes ainsi que la mise en place d'un traitement n'apportent donc aucun bénéfice, les différences observées entre les groupes étant faibles et ne justifiant pas un investissement de la part de l'éleveur pour rechercher et traiter les mycoplasmes. Notre effectif est relativement faible et ne suffit pas à montrer une différence significative. A titre d'exemple pour une différence de 2 chiots par portée, la réalisation d'un test de puissance nous indique que les groupes devraient avoir un effectif de 30 chiennes pour qu'une différence statistiquement significative puisse être mise en évidence. La prise en compte de la bactériologie permet de suspecter des différences plus importantes mais les effectifs des sous-groupes sont encore plus réduits ; de la même façon un test de puissance indique qu'il faudrait des effectifs supérieurs à 23 chiennes par groupe pour montrer l'existence de différences significatives entre les sous-groupes. L'étude des interactions n'est pas significative à l'exception de celle de l'interaction entre les mycoplasmes et la bactériologie, les désavantages (non significatifs) apportés par une forte charge en mycoplasmes et une flore dominée par un germe (culture pure) semblent s'annuler. De plus, l'interactions entre la dilution et le traitement indique une piste de réflexion intéressante sur le seuil de positivité des mycoplasmes et la mise en place d'un traitement à partir de ce seuil.

2.4 Poids des chiots

2.4.1 Etude statistique simple

L'analyse du poids des chiots révèle des différences significatives. Les moyennes et les médianes du poids à une semaine ainsi que les gains de poids pondérés par le poids de naissance sont résumés dans le tableau 9. Les poids des chiots à la naissance et à une semaine sont représentés graphiquement dans la figure 18. Dans cette figure les chiots ont été répartis selon les groupes initiaux (en fonction du résultat mycoplasmes et du traitement) pour le graphique de gauche et selon les groupes restreints (en prenant également en compte la bactériologie) pour le graphique de droite.

		Total	Négative (89 chiots)	Positive traitée (147 chiots)	Positive non traitée (100)
Naissance	Moyenne	0.4498	0.4329	0.4524	0.4579
	Médiane	0.4500	0.4400	0.4600	0.4550
Une semaine	Moyenne	0.8277	0.7779	0.7999	0.9100
	Médiane	0.8300	0.7850	0.7950	0.9250
Gain de poids	Moyenne	84%	78%	78%	98%
	Médiane	85%	84%	77%	97%

Tableau 9 Moyennes et médianes du poids des chiots (kg) à la naissance et à une semaine. Le gain de poids est indiqué en pourcentage

Les poids de naissances sont similaires entre les trois groupes. Les poids à une semaine présentent des différences importantes. Graphiquement, on observe sur la figure 18 que le poids des chiots à une semaine du groupe des chiennes Pos_non_traitées (en vert sur le graphique de gauche) se détache des deux autres groupes. Le gain de poids est de 98% pour les chiots de ce groupe alors que les deux autres groupes présentent un gain de poids de seulement 78%. Cette différence est significative (ANOVA, p-value = 2.81×10^{-8}). Cette différence est également significative deux à deux entre le groupe positives non traitées et le groupe négatives et positives traitées (méthode de Bonferroni-Holm, respectivement p-value = 7.6×10^{-8} et p-value = 1.6×10^{-12}).

L'analyse des groupes plus restreint donne des résultats similaires. On observe sur la figure 18 (graphique de droite) : les poids de naissances sont similaires et les poids des chiots à une semaine montre deux tendances. Les groupes II, III et IV (groupes n'ayant reçu aucun traitement et ayant une culture pure en bactériologie et/ou une culture de mycoplasmes positives) présentent des gains de poids supérieur (respectivement 98%, 98% et 100%) aux groupes I, V et V (groupes ayant reçu un traitement ou n'ayant que des résultats négatifs en bactériologie et mycoplasmes) dont les chiots ont des croissances inférieures à 81%. Cette

différence globale est également significative (Kruskal-Wallis, $p\text{-value}=3.086\times 10^{-14}$). Les effectifs étant faibles pour plusieurs des groupes restreints, ces résultats doivent être interprétés avec précaution.

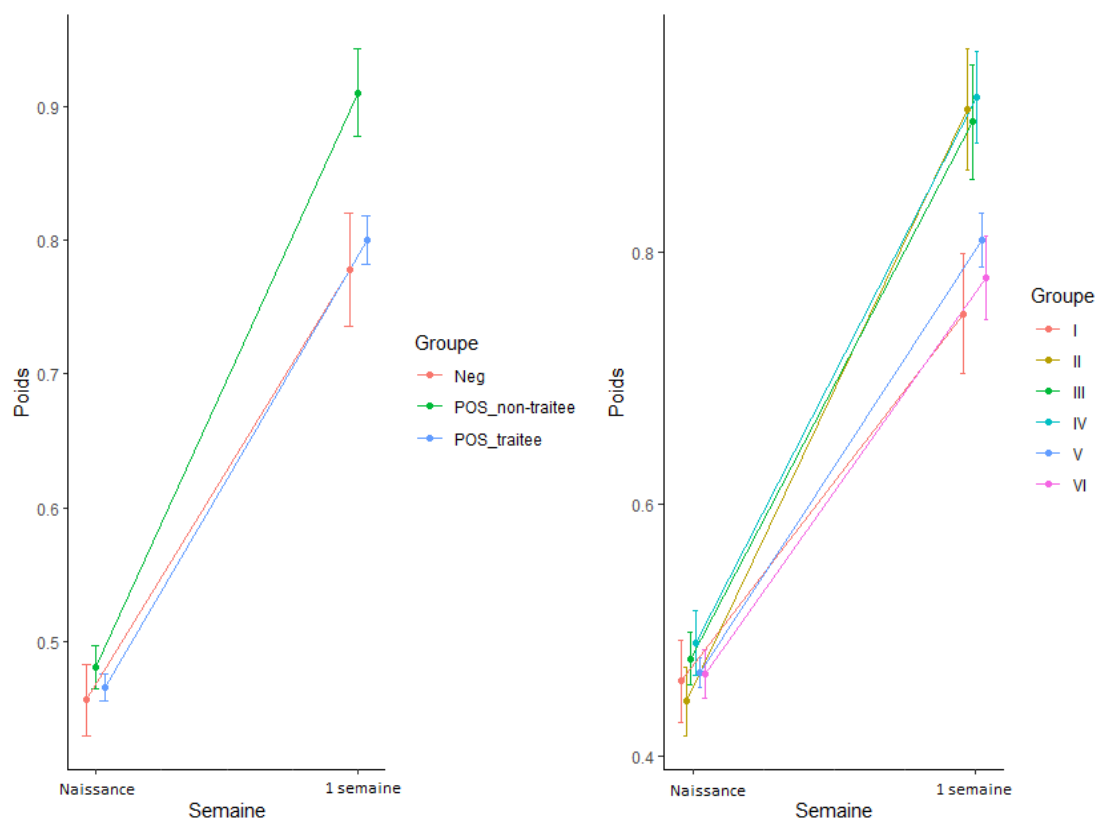


Figure 18 Représentation graphique des poids à la naissance et à une semaine des chiots (à gauche les groupes selon le résultat mycoplasmes et le traitement, à droite les sous-groupes prenant en compte le résultat de la bactériologie)

La comparaison des chiennes traitées ou non (sans prendre en compte les résultats des cultures) donne des résultats similaires. Les poids de naissances sont égaux (450g pour les deux groupes). Les gains de poids sont différents : prise de poids de 77% en une semaine pour les chiots issus de mères traitées contre 89% pour les chiots issus de mères non traitées (test de Student, $p\text{-value}=9.792\times 10^{-6}$). Cette différence est moindre que les différences observées entre les chiennes positives mycoplasmes et non traitées et les deux autres groupes (négatives et positives traitées).

Indépendamment de la mise en place d'un traitement, il existe une différence significative (test de Student, $p\text{-value} = 0.012$) entre les gains de poids des chiots issus de mères positives pour les mycoplasmes et ceux issus de mères négatives, respectivement 86 et 78%. A l'inverse la différence entre les chiots issus de mère dont les cultures bactériologiques pures et

celles dont les cultures étaient mixtes n'est pas significative (test de Student, p-value= 0.114), les gains de poids étaient respectivement de 87 et 83%.

On remarque donc que les chiots issus de chiennes présentant des cultures bactériologiques et/ou des recherches de mycoplasmes positives (qu'on peut donc supposer comme ayant des flores vaginales plus riche quantitativement) présentent des croissances plus importantes de l'ordre de 5 à 10%. De plus la mise en place d'un traitement semble diminuer le gain de poids des chiots lors de leur première semaine (de l'ordre de 10%) et ce de façon significative. L'analyse des différents groupes répartis selon ces trois critères montrent des différences significatives encore plus importante, de l'ordre de 20%. La mise en place d'un traitement semble donc interagir avec les résultats de la bactériologie et de la recherche de mycoplasmes. Nous allons étudier ces interactions à l'aide d'un modèle statistique.

2.4.2 Réalisation d'un modèle statistique pour l'étude des interactions entre variables

Le gain de poids pondéré par le poids de naissance est une variable quantitative continue. Nous avons donc réalisé une régression linéaire sur le gain poids des chiots. Le résumé des coefficients est présenté dans le tableau 8. Deux variables apparaissent comme significativement associées au gain de poids : la mise en place d'un traitement et le résultat de la recherche de mycoplasmes. Cependant le but de cette régression n'est pas de construire un modèle pour prédire des valeurs. Ne garder que ces deux variables dans notre modèle ne permet pas d'étudier d'interactions (et n'améliore pas significativement notre modèle, ANOVA, p-value=0.385), car la mise en place d'un traitement est directement dépendante du résultat des mycoplasmes. Comme pour l'analyse de de la prolificité nous garderons toutes les variables dans notre modèle et étudierons les tendances lorsque les interactions ne sont pas significatives. Les effets des variables prévus par le modèle sont représentés graphiquement en figure 19.

	Coefficient estimé	Ecart-type	Valeur de z	Pr(z) (valeur de p)
Intercept	0.81935	0.04716	17.372	$< 2 \times 10^{-16}$
Dilution	-0.01760	0.01607	-1.095	0.274
Bactériologie	0.02944	0.02933	1.004	0.316
Traitement	-0.20530	0.02975	-6.901	2.75×10^{-11}
Mycoplasmes	0.25221	0.05783	4.361	1.74×10^{-5}

Tableau 10 Résumé des coefficients de la régression linéaire sans terme d'interaction réalisée sur le gain de poids relatif des chiots à une semaine

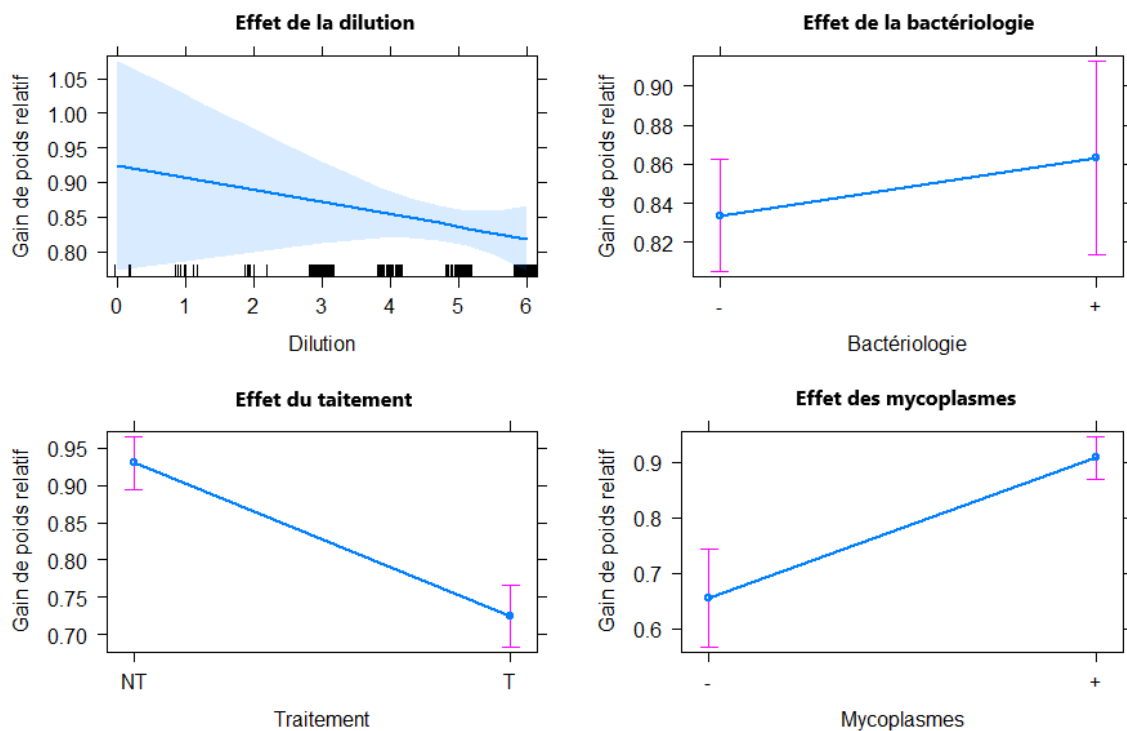


Figure 19 Représentation graphique de l'effet des prédicteurs simple dans la régression linéaire réalisée sur le gain de poids relatif des chiots

Les effets des prédicteurs prévus par le modèle sont cohérents avec les valeurs observées. Les effets prévus du traitement et des mycoplasmes semblent toutefois majorés dans notre modèle avec des différences de l'ordre de 20% alors que les écarts observés étaient plus proches de 10%. L'effet de la bactériologie prévu montre une tendance identique aux valeurs observées. A l'instar de la régression de Poisson sur la prolificité, les effets prévus de la dilution sont inverses à l'effet du résultat des mycoplasmes. Toutefois la tendance selon la dilution prévue par le modèle est faible (diminution du gain de poids de 10% de la dilution 0 à la dilution 6) et n'est pas significative.

L'interaction entre le résultat de la bactériologie et la mise en place d'un traitement est significative (p-value= 0.002108). L'interaction de la bactériologie et du traitement est représentée graphiquement en figure 20. Les intervalles de confiance ne se chevauchent pas et permettent d'observer les effets contradictoires du résultat de la bactériologie en fonction du traitement. Parmi les chiennes ne recevant pas de traitement, une culture pure en bactériologie est associée à une meilleure prise de poids des chiots. En revanche dans le groupe traitée, l'effet ne semble pas important et tend à être inverse. Il est possible d'analyser ce graphique d'une autre façon (pointillé rouge). Si l'on considère les chiennes avec des cultures mixtes en bactériologie (« - »), l'ajout du traitement a un effet délétère sur la prise de poids. Pour ces chiennes le traitement ne contient que de la josamycine. Cet effet délétère du traitement est également présent et semble plus important (pente plus marquée) pour le groupe de chiots issus de chiennes dont les cultures bactériologies étaient pures (« + »), ces chiennes ayant reçu une double antibiothérapie (josamycine et amoxicilline).

La bactériologie n'influe pas significativement sur le gain de poids de chiots mais elle interagit avec le traitement. En effet, une culture pure en bactériologie est associée chez les chiennes traitées à l'ajout d'une molécule antibiotique par rapport aux chiennes traitées dont la culture bactériologique est mixte. La mise en place d'un traitement antibiotique est donc associée à un effet délétère sur l'indicateur de bonne santé des chiots qu'est la prise de poids. Or ces résultats laissent supposer que cet effet délétère semble renforcé par l'utilisation de plusieurs molécules antibiotiques : dans notre étude les chiennes traitées et négatives pour la bactériologie sont positives pour les mycoplasmes et ont donc reçu de la josamycine, les chiennes traitées et positives pour la bactériologie étaient également positives pour les mycoplasmes et ont donc reçu josamycine et amoxicilline. La pente entre ces deux groupes est descendante sur la partie droite du graphique.

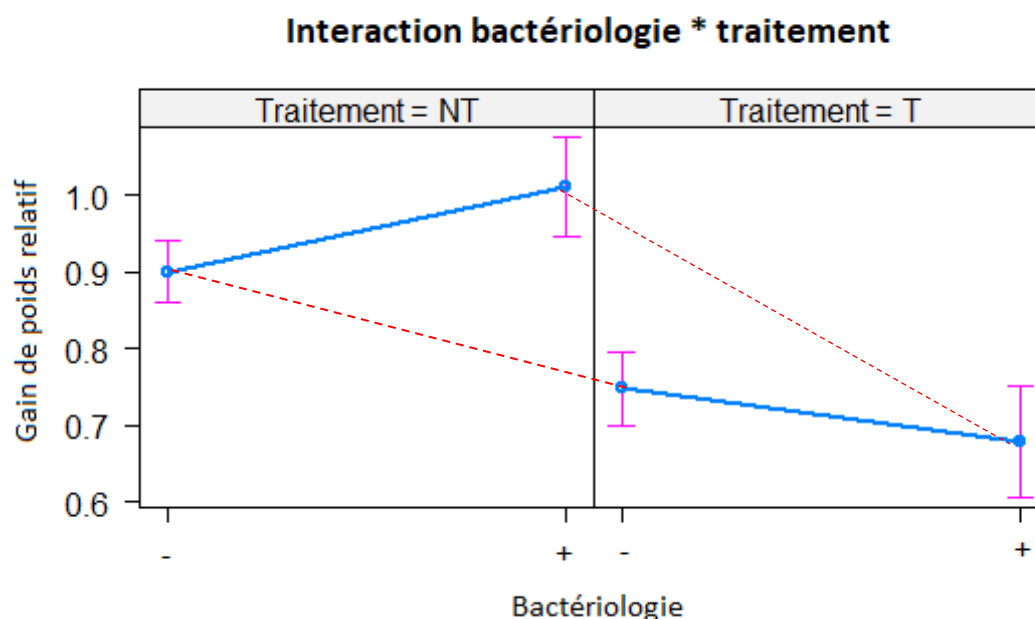


Figure 20 Représentation graphique de l'interaction en la bactériologie et la mise en place d'un traitement dans la régression linéaire réalisée sur le gain de poids relatif des chiots

Les interactions entre la bactériologie et la charge en mycoplasmes sous la forme de la dilution ou du résultat positif qualitatif ont été testées en parallèle. Les deux interactions sont significatives (respectivement p-value= 0.003619 et 0.000503) et sont représentées en figure 21 et 22. Les tendances observées sont similaires pour les deux interactions. En cas de culture mixte en bactériologie, l'augmentation de la charge en mycoplasmes est associée à une augmentation du gain de poids des chiots. Cette augmentation semble significative lorsque l'on considère le résultat qualitatif au lieu de la dilution. En cas de culture bactériologique pure, le résultat mycoplasmes semble peu influencer sur le gain de poids, la tendance étant plus à une baisse de ce gain de poids. Ces graphiques laissent donc supposer que ces les effets bénéfiques sur le gain de poids d'une forte charge en mycoplasmes et d'une culture pure en bactériologique ne sont pas supérieurs à l'addition de chacun des effets isolés.

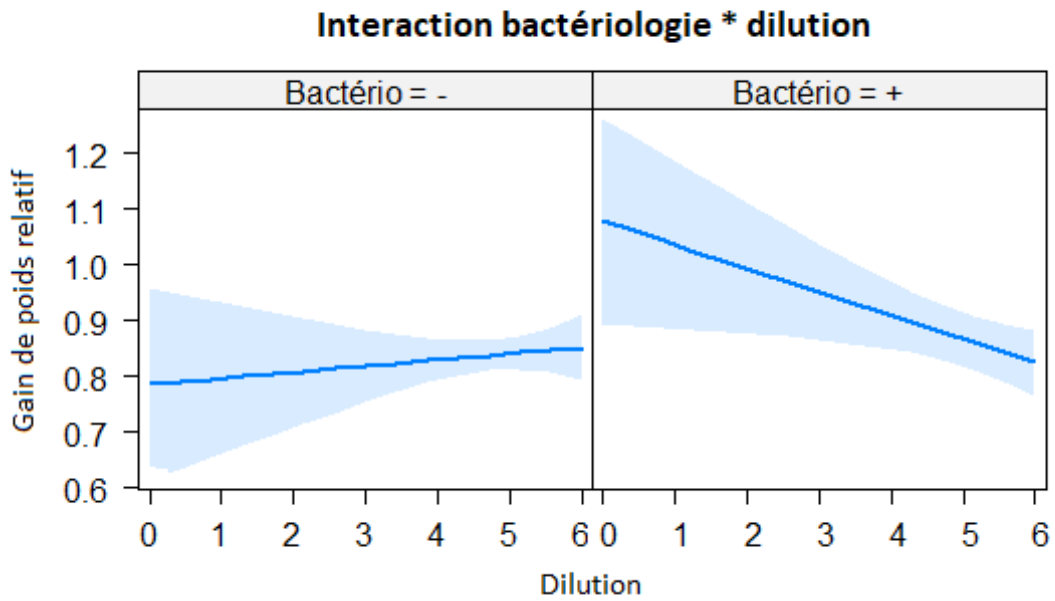


Figure 21 Représentation graphique de l'interaction en la bactériologie et la dilution dans la régression linéaire réalisée sur le gain de poids relatif des chiots

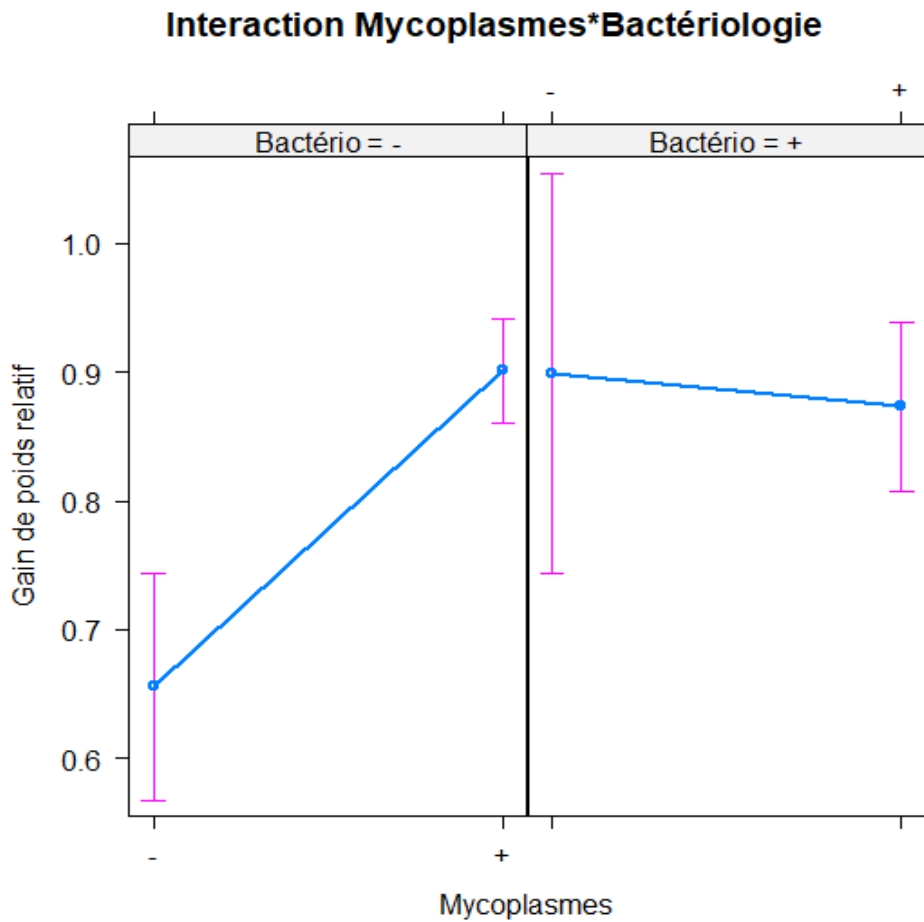


Figure 22 Représentation graphique de l'interaction en la bactériologie et le résultat mycoplasme dans la régression linéaire réalisée sur le gain de poids relatif des chiots

L'interaction entre le résultat mycoplasmes et le traitement ne peut pas être testée par notre modèle car les deux variables sont codépendantes ; notre modèle ne permet pas de prévoir de valeur pour des chiennes négatives mycoplasmes et traitées. Nous avons donc représenté l'interaction entre la dilution et le traitement. En effet la dilution étant une variable quantitative notre modèle permet d'extrapoler des valeurs pour des chiennes avec de faibles charges en mycoplasmes et traitées, à partir des valeurs des chiennes traitées avec de fortes charges en mycoplasmes.

L'interaction entre la dilution et le traitement n'est pas significative (p -value = 0.9636) et est négligeable (coefficient estimé inférieur à 0.001). L'interaction est représentée graphiquement sur la figure 23. Les deux droites sont parallèles et montrent bien une absence d'interaction.

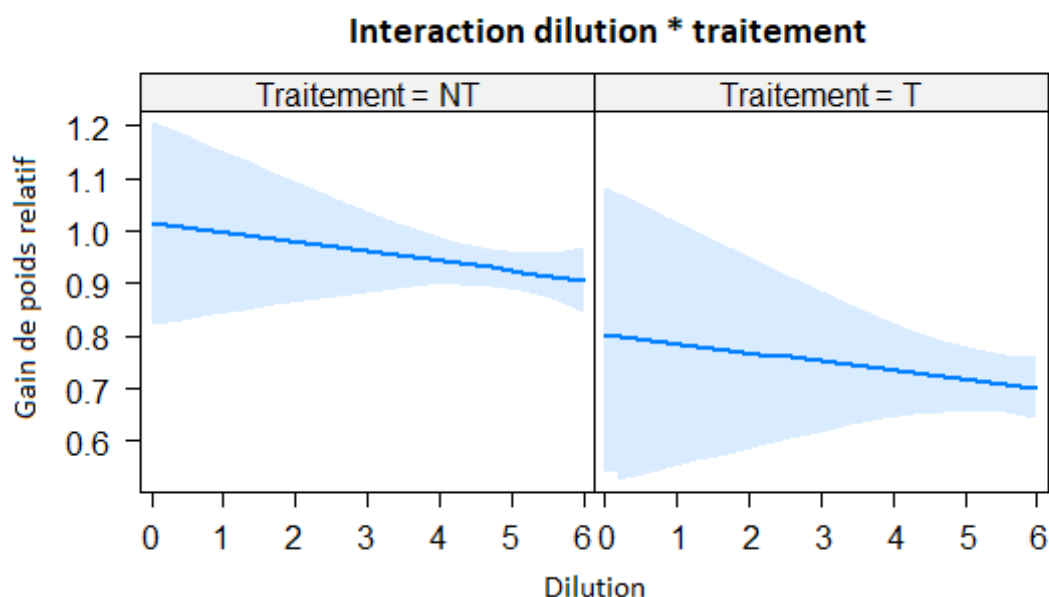


Figure 23 Représentation graphique de l'interaction en la dilution et la mise en place d'un traitement dans la régression linéaire réalisée sur le gain de poids relatif des chiots

La charge en mycoplasmes, le statut bactériologique et la mise en place d'un traitement antibiotique influent sur la croissance des chiots durant leur première semaine de vie. Les chiots associés à des microbiotes vaginaux riches (cultures positives) présentent des croissances plus importantes. Les mycoplasmes et le résultat de la bactériologie interagissent et les bénéfices pour la croissance des chiots ne sont pas additifs. La mise en place d'un traitement antibiotique est délétère pour la croissance des chiots. L'ajout de plusieurs molécules semble accentuer cet effet délétère.

2.5 Mortinatalité

La mortinatalité est faible dans chacun des groupes. Elle est de 5% pour les groupes négatives et positives non traitées et de 3% pour le groupe positives traitées. Cette différence n'est pas significative.

3 Discussion

3.1 Protocole utilisé

Les données ont été fournies par le docteur Bonte et le CESECAH. Les manipulations ont toutes été réalisées par le même manipulateur permettant d'éliminer les biais dans la collecte des échantillons et dans les inséminations des chiennes.

Les cultures de mycoplasmes ont été réalisées par l'UMR Mycoplasmoses des ruminants à VetAgro Sup qui est un laboratoire de référence en mycoplasmologie animale. Cependant les résultats fournis nous donnent une estimation semi-quantitative de la charge en mycoplasmes. Le seuil de pathogénicité, fixé à l'observation d'une turbidité à la dilution 10^{-4} , repose sur les conclusions d'O.Martin (122). Pendant de nombreuses années, ces conclusions ont justifié la mise en place d'un traitement à la josamycine chez les chiennes présentées au CERREC pour des troubles de la fertilité chez qui les mycoplasmes étaient isolés. Cependant ces pratiques ont été récemment remises en question devant le faible niveau de preuve de l'efficacité du traitement. Dans la régression de Poisson réalisée sur la prolificité, l'interaction entre la dilution et le traitement, bien que non significative, montre que la mise en place d'un traitement pourrait devenir intéressante à partir de la dilution 4 ou 5. Cette observation est cohérente avec les pratiques actuelles mais nécessiterait plus de données, notamment un groupe de contrôle recevant le traitement pour de faible charge en mycoplasmes afin d'affiner le modèle statistique.

L'identification des espèces de mycoplasmes n'a pas été réalisée. On peut supposer que l'espèce majoritaire retrouvée serait *M. canis*. L'identification des différents mycoplasmes auraient pu être réalisées sur la base de critères biochimiques ou bien par PCR (recherche *Mycoplasma spp*) puis séquençage. L'identification nécessiterait des moyens techniques et financiers importants.

Il n'existe à ce jour pas de technique de quantification par PCR de *M. canis*. Les travaux de C.Savatier (13) n'ont pas abouti dans la mise en place d'une PCR quantitative *M. canis*. Les amorces utilisées n'étaient pas suffisamment spécifiques et permettaient d'amplifier d'autres espèces de mycoplasmes. La mise en place d'une qPCR de *M. canis* nécessite des recherches afin d'identifier une séquence et des amorces spécifiques de cette

espèce. On peut envisager que la mise en place d'une qPCR *Mycoplasma spp* pourrait être une alternative rapide et peu coûteuse à la méthode de dénombrement par dilution utilisée dans notre étude.

L'un des principaux biais de notre étude repose sur la technique d'insémination. En effet toutes les chiennes ont été inséminées *in utero* sous contrôle endoscopique. Cette technique assure un fort taux de réussite à l'insémination. Des écouvillons vaginaux ont été réalisés pour la recherche de mycoplasmes et la bactériologie. Nous avons vu dans notre étude bibliographique que la flore utérine était proche de la flore vaginale dont elle était issue. Cependant, des différences qualitatives et quantitatives peuvent exister. Les résultats des prélèvements ne reflètent pas de façon certaine le microbiote utérin lors de la fécondation, de la nidification ou de la croissance embryonnaire. L'écouvillonnage de la muqueuse utérine par voie transcervicale au moment de l'insémination ou bien de l'extrémité du matériel d'insémination pourrait permettre de connaître le statut bactériologique et la charge en mycoplasmes de l'utérus. De plus les mycoplasmes sont capable d'induire une baisse de la motilité des spermatozoïdes (115,131). L'insémination *in utero* pourrait donc permettre de limiter l'expositions des spermatozoïdes aux mycoplasmes vaginaux et limiter leur impact sur la fertilité. Nos prélèvements reflètent à priori bien le microbiote cutané des chiots qui se « contaminent » avec la flore vaginale lors de la mise bas.

3.2 Analyses des résultats

3.2.1 Cultures

- Bactériologie

Une seule culture est revenue stérile. Une erreur d'échantillonnage semble exclue car la culture de mycoplasmes de cet individu n'était pas stérile. Un problème lors du transport ou pendant la mise en culture pourrait expliquer ce résultat. La plupart des échantillons présentent une culture mixte de 3 germes ou plus. Ces observations sont en adéquations avec les données bibliographiques, le microbiote vaginal étant riche. Cependant plusieurs chiennes ont présenté des cultures pures sans présenter de symptômes d'écoulement vaginaux ou de troubles de la reproduction plus important qu'en cas de culture mixte. A l'instar de nombreux auteurs il apparait essentiel d'interpréter les résultats de la bactériologie à la lumière de la clinique de l'animal. Le diagnostic bactérien de trouble de la reproduction ne peut reposer sur le seul résultat d'une culture pure. Dans l'interprétation de nos résultats, nous avons considéré que les flores vaginales des chiennes dont les cultures étaient pures, devaient être plus riche

quantitativement. Ce postulat découle de notre analyse bibliographique mais n'a pas été vérifiées par une quelconque mesure de la charge bactérienne des écouvillons.

- Mycoplasmes

Un seul échantillon s'est révélé totalement dépourvu de mycoplasmes. La prévalence des mycoplasmes, proche des 99%, dans notre étude est supérieure à celle de toutes les autres études utilisant des méthodes de cultures classiques. Notre résultat s'approche du taux de 100% de l'étude de Lyman et al. (57) qui utilise la métagénomique ciblée. Nos résultats sont donc cohérents avec le fait que les mycoplasmes appartiennent au microbiote vaginal de la chienne. L'identification des espèces présentes permettrait de préciser la place qu'occupent ces mycoplasmes. De plus, peu de données sont actuellement disponible sur la charge en mycoplasmes dans la littérature. Notre étude permet de montrer une grande variation de cette charge (facteur 10^5) sans qu'il y ait d'impact négatif significatif sur les performances reproductives. Ces résultats sont à interpréter précautionneusement car le dénombrement des mycoplasmes est semi quantitatif et repose sur les capacités de croissance des mycoplasmes présents. En effet, il pourrait exister des différences de croissances entre les différentes espèces ou souche de mycoplasmes pour le milieu que nous avons utilisés. L'établissement d'une méthode précise reposant sur une PCR quantitative comme envisagé par C. Savatier (13) serait utile pour confirmer ces résultats.

3.2.2 Fertilité

Toutes les chiennes de l'étude ont été gestantes à la première insémination à une exception pour laquelle le mâle a été mis en cause. Il semblerait que la charge en mycoplasmes et la mise en place d'un traitement n'influent pas sur la fertilité des chiennes dans le cadre d'une insémination *in utero*. Cette méthode d'insémination pourrait en effet constituer un biais. Le fort taux de réussite de la méthode d'insémination pourrait masquer un effet délétère des mycoplasmes. Il est nécessaire de collecter d'autres données dans le cas d'une monte naturelle ou d'une insémination intravaginale qui sont bien plus souvent utilisées que l'insémination *in utero*.

3.2.3 Prolificité

L'analyse du nombre de chiot nés par chienne révèle des différences entre les groupes. Ces résultats vont dans le sens d'un rôle délétère des mycoplasmes pour la reproduction. En effet le groupe des chiennes « négatives » présente une prolificité supérieure aux autres groupes. Les chiennes « positives » non traitées ont la prolificité la plus faible. Cependant,

ces différences restent faibles, l'écart de prolificité entre deux groupes étant toujours inférieur à un chiot par portée. La recherche de la présence de mycoplasmes ainsi que la mise en place d'un traitement impliquent un investissement financier important de la part de l'éleveur n'aboutissant qu'à un bénéfice limité, à savoir un chiot par chienne. On peut donc se poser la question de la pertinence de ces démarches. De plus, ces différences ne sont statistiquement pas significatives. On ne peut donc pas conclure sur un réel effet des mycoplasmes sur la prolificité. L'analyse des groupes plus restreints qui prennent en compte la bactériologie montre des résultats intéressants avec des écarts plus importants cependant les effectifs sont très faibles.

La réalisation de tests de puissances montre que les différences entre les groupes restreints seraient significatives si les effectifs étaient supérieurs à 23 chiennes par groupe ce qui est loin d'être le cas dans notre étude. De même si on considère qu'une augmentation de 2 chiots par portée représente un véritable gain pour l'éleveur, les groupes Négatives, Positives traitées et non traitées devraient avoir des effectifs de 30 chiennes pour que cette différence soit significative. Dans notre étude nous manquons donc d'effectif et nous tentons de montrer des effets trop faibles pour être statistiquement significatifs.

La réalisation d'une régression de Poisson ne permet pas de construire un modèle explicatif. La plupart des interactions ne sont pas significatives. L'interaction entre les mycoplasmes et la bactériologie est statistiquement significative. Cependant les intervalles de confiance associés aux valeurs prédites ne permettent pas d'identifier un gain ou une perte de prolificité.

Dans la régression de Poisson, la figure 13 qui représente les effets simples de chaque prédicteur montre que la pente de l'effet de la dilution est inverse à la pente du résultat qualitatif des mycoplasmes. Cette observation se retrouve également dans la régression linéaire sur les poids des chiots (figure 19). Les pentes associées à la dilution sont faibles et l'effet de ce paramètre n'est jamais significatif. On peut toutefois se demander comment ces deux variables codépendantes ne produisent pas des effets similaires. Cette observation semble provenir de la fonction de lissage par défaut de la fonction `allEffects()` utilisée pour représenter les effets des prédicteurs. Sur le nuage de points des prolificités représenté en figure 24, les droites rouges et bleues représentent deux fonctions de lissage testées « manuellement ». Ainsi on peut changer de fonction de lissage pour faire concorder les pentes de la dilution et du résultat mycoplasmes. On voit ainsi que notre étude statistique manque de puissance et qu'il est difficile d'interpréter des tendances sur des effectifs aussi restreints et dispersés.

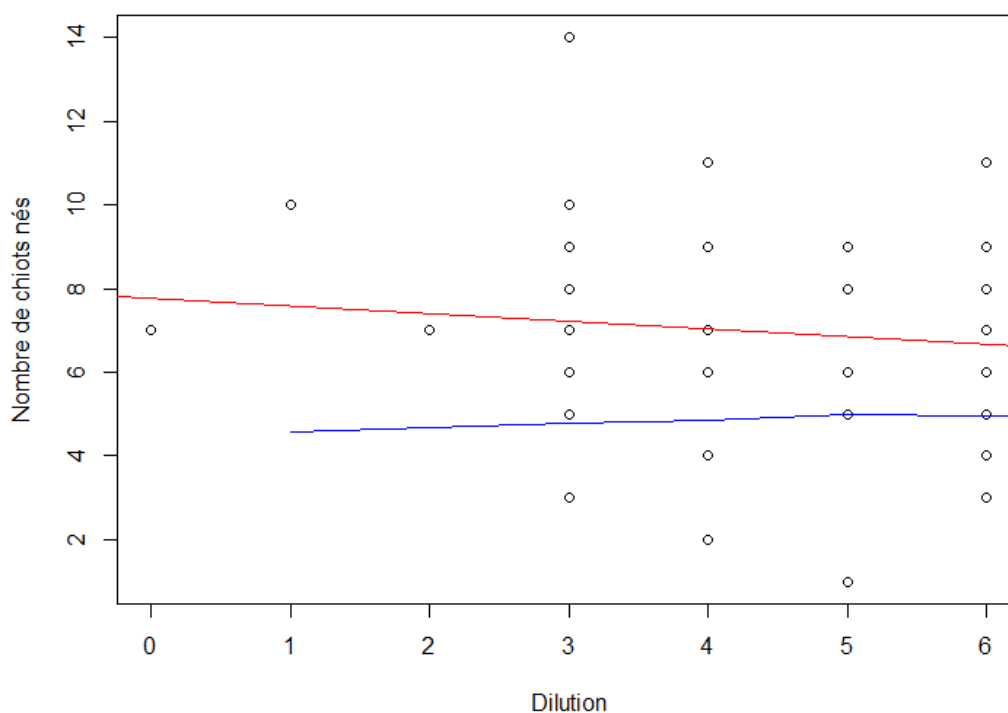


Figure 24 Nuage de point des prolificité et droites de régression utilisant les fonction lm (rouge) et lowess (bleu)

3.2.4 Poids des chiots

La prise de poids à une semaine est un indicateur important de la bonne santé des chiots pour les éleveurs, elle reflète également la bonne santé reproductive de la chienne. En pratique, ce paramètre n'est pas toujours suivi avec attention par les éleveurs.

Les gains de poids des chiots sont significativement différents entre les groupes. Les chiennes positives non traitées produisent des chiots avec une croissance à une semaine supérieure de 20% par rapport aux deux autres groupes. Cette observation est surprenante et ne semble pas cohérente avec un rôle pathogène des mycoplasmes sur la reproduction. Ces observations sont confirmées par l'analyse des groupes restreints : les chiots issus des groupes présentant des cultures positives (mycoplasmes et/ou bactériologie en culture pure) et n'ayant pas été traités présentent des croissances plus importantes.

La réalisation d'un modèle linéaire pour étudier les interactions entre les facteurs apporte des informations intéressantes. Le grand nombre de chiots permet d'obtenir des intervalles de confiance plus réduits.

Il semblerait donc que la richesse (quantitative) de la flore vaginale ait un effet positif sur la croissance des chiots. Les chiennes négatives, et celles qui ont reçues un traitement possèdent un microbiote vaginal moins riche. Le microbiote cutané et intestinal du chiot

provient en grande partie de la contamination par la flore vaginale de la mère lors de la parturition mais également au cours de la gestation, l'utérus n'étant pas un environnement stérile. Une étude récente a montré le rôle prépondérant du microbiote des chiots dans leur croissance pendant les premiers jours de vie (71).

Nous ne disposons pas de données précises sur la mortalité néonatale. En effet certaines valeurs des poids à une semaine sont manquantes sans que l'on sache si c'est un manque de suivi ou bien une mort associée ou non aux mycoplasmes. De plus nous ne disposons d'aucune donnée sur la santé des chiots après une semaine, il est possible que les différences de prise de poids soient rattrapées par la suite. Dans un futur travail de recherche un meilleur suivi permettrait d'explorer les potentiels effets des mycoplasmes vaginaux sur la mortalité.

3.2.5 Perspective

Notre étude manque de puissance pour montrer des effets sur la prolificité. De plus grand effectifs sont nécessaires ; seuls des groupes de 20 à 30 chiennes permettrait de montrer des différences significatives. De plus, certains profils manquent : des chiennes traitées uniquement avec de l'amoxicilline, des chiennes négatives pour les prélèvements et ayant reçu un traitement...

Notre étude utilise des méthodes d'identification et de quantification ayant montré leurs limites dans l'étude des microbiotes. Les nouvelles techniques de séquençage sont aujourd'hui de plus en plus accessibles et pourront à l'avenir servir dans une étude similaire.

Conclusion de l'étude expérimentale

Notre étude expérimentale apporte des résultats intéressants. La place des mycoplasmes dans une flore vaginale saine est renforcée par une forte prévalence d'isolement. Des cultures pures en bactériologie ne sont pas systématiquement associés à des signes cliniques et de l'infertilité.

La baisse de prolificité induite par de fortes charges en mycoplasmes est faible. L'avantage apporté par la mise en place d'un traitement semble peu intéressant pour un éleveur de chien compte tenu de l'investissement pour diagnostiquer et traiter les mycoplasmes. De plus aucun de ces effets n'est statistiquement significatif. Il apparaît judicieux de ne pas considérer seulement les mycoplasmes, mais l'ensemble du microbiote vaginal. En effet les résultats de la bactériologie semblent interagir avec les autres facteurs. Ainsi, évaluer l'ensemble du microbiote et mettre en place un traitement adapté pourrait apporter un bénéfice sur la prolificité.

L'étude du gain de poids des chiots, un indicateur de bonne santé, a mis en évidence des résultats inattendus. Les mycoplasmes sont associés positivement avec un meilleur gain de poids tandis que la mise en place d'un traitement y est négativement associée. Ces résultats sont significatifs, les différences allant jusqu'à 20%. L'étude des interactions avec le résultat de la bactériologie nous indique à l'instar de la prolificité, que le microbiote doit être considéré dans son ensemble pour apprécier les effets des différents facteurs.

D'après ces résultats, la mise en place d'un traitement contre les mycoplasmes ne semble pas présenter un véritable intérêt sur la prolificité et pourrait même s'avérer néfaste pour les chiots à naître.

Conclusion

Le microbiote vaginal de la chienne est un écosystème riche et diversifié. De nombreuses espèces de bactéries y évoluent dans un équilibre dynamique avec le système immunitaire de l'hôte et son cycle hormonal.

En médecine vétérinaire l'exploration de ce microbiote repose presque uniquement sur des méthodes de cultures, les nouvelles techniques de génétique moléculaire restant aujourd'hui des domaines réservés à la recherche.

La présence d'un agent bactérien potentiellement pathogène est souvent source de confusion pour le praticien qui peut à tort retenir l'hypothèse d'une infertilité d'origine infectieuse, quand bien même les examens bactériologiques devraient être systématiquement corrélés à la présence de signes cliniques.

Les mycoplasmes sont des organismes atypiques, modèles de cellule « simplifiée » et appartiennent au microbiote vaginal de la chienne. Dans la littérature il n'existe pas de preuve formelle de leur rôle pathogène en reproduction chez la chienne : pourtant ils motivent très souvent l'instauration d'un traitement antibiotique en clientèle.

Notre étude expérimentale confirme la place des mycoplasmes dans le microbiote vaginal « sain » d'une chienne. Leur présence ne semble pas corrélée avec une altération de la fonction de reproduction chez la chienne et l'instauration d'un traitement antibiotique n'apporte aucun bénéfice perceptible. En revanche l'instauration d'un tel traitement pourrait même s'avérer délétère pour la santé ultérieure des chiots à naître notamment si l'on s'intéresse à leur poids.

Il apparaît au terme de cette étude que les problématiques d'infertilité d'origine infectieuse doivent être abordées en prenant en compte le microbiote vaginal dans son ensemble et non une espèce bactérienne isolée et que la mise en place d'un traitement n'est pas toujours sans effet néfaste.

Bibliographie

1. Lamoureux I. Flore intestinale et pathologie : étude historique des concepts du microbiote [Internet] Thèse de Doctorat en médecine. Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2016. Disponible sur: <http://thesesante.ups-tlse.fr/1582/>
2. Rohde K. Parasitism. In: Levin SA, éditeur. Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition) [Internet]. Waltham: Academic Press; 2013. p. 656-73. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847195001039>
3. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biol. 2016;14(8):e1002533.
4. Ayres JS. Cooperative microbial tolerance behaviors in host-microbiota mutualism. Cell. 2 juin 2016;165(6):1323-31.
5. Poreau B. Microbiome et commensalisme : instabilité d'une association biologique. Bull Dhistoire Depistemologie Sci Vie. 2013;Volume 20(2):139-50.
6. Walker AW. Chapter 19 - The Human Microbiota and Pathogen Interactions. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, éditeurs. Molecular Medical Microbiology (Second Edition) [Internet]. Boston: Academic Press; 2015. p. 347-56. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123971692000196>
7. Simon J-C, Marchesi JR, Mougél C, Selosse M-A. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. Microbiome [Internet]. 11 janv 2019 ;7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6330386/>
8. Littman DR, Pamer EG. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. Cell Host Microbe. 20 oct 2011;10(4):311-23.
9. Lederberg J, McCray AT. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. :2.
10. NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. Genome Res. déc 2009;19(12):2317-23.
11. Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota—new player in town. Fertil Steril. 1 juill 2017;108(1):32-9.
12. Kustritz MVR. Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. Theriogenology. août 2006;66(3):567-74.
13. Savatier C. Mycoplasmosse vaginale et infertilité chez la chienne : synthèse bibliographique et mise en place d'une PCR quantitative Mycoplasma canis [Internet]. Thèse de Doctorat Vétérinaire (Lyon); 2019. Disponible sur: <http://alex.vetagro-sup.fr/Record.htm?idlist=3&record=19441765124912699479>
14. Prymak C, Bright RM. CHAPTER 58 - Diseases of the Vagina. In: Morgan RV, éditeur. Handbook of Small Animal Practice (Fifth Edition) [Internet]. Saint Louis: W.B. Saunders; 2008. p. 582-6. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416039495500625>
15. Morrow DA. Current therapy in theriogenology : diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals [Internet]. W.B. Saunders Company; 1980. Disponible sur: <http://alex.vetagro-sup.fr/Record.htm?idlist=5&record=19111303124919395859>
16. Olson PN, Mather EC. Canine vaginal and uterine bacterial flora. J Am Vet Med Assoc. 15 mars 1978;172(6):708-11.
17. Green KA, Zarek SM, Catherino WH. Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract. Fertil Steril. 1 déc 2015;104(6):1351-7.

18. Netgen. Génomique et métagénomique bactériennes : applications cliniques et importance médicale [Internet]. *Revue Médicale Suisse*. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-450/Genomique-et-metagenomique-bacteriennes-applications-cliniques-et-importance-medicale>
19. David M. [Albert and Gustav Döderlein -- a critical view to the biographies of two German professors]. *Zentralbl Gynakol*. avr 2006;128(2):56-9.
20. Vanechoutte M. The human vaginal microbial community. *Res Microbiol*. nov 2017;168(9-10):811-25.
21. García-Velasco JA, Menabrito M, Catalán IB. What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review. *Reprod Biomed Online*. juill 2017;35(1):103-12.
22. Heil BA, Paccamonti DL, Sones JL. Role for the mammalian female reproductive tract microbiome in pregnancy outcomes. *Physiol Genomics*. 28 juin 2019;51(8):390-9.
23. A Comparison of Lower Genital Tract Glycogen and Lactic Acid Levels in Women and Macaques: Implications for HIV and SIV Susceptibility | *AIDS Research and Human Retroviruses* [Internet]. Disponible sur: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/aid.2011.0071>
24. Miller EA, Beasley DE, Dunn RR, Archie EA. Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why Is the Human Vaginal Microbiome Unique? *Front Microbiol* [Internet]. 2016;7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5143676/>
25. Rumyantseva T, Khayrullina G, Guschin A, Donders G. Prevalence of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* in healthy women and patients with flora alterations. *Diagn Microbiol Infect Dis*. mars 2019;93(3):227-31.
26. Leli C, Mencacci A, Latino MA, Clerici P, Rassu M, Perito S, et al. Prevalence of cervical colonization by *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in childbearing age women by a commercially available multiplex real-time PCR: An Italian observational multicentre study. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*. avr 2018;51(2):220-5.
27. Taylor-Robinson D. Mollicutes in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium*. *Res Microbiol*. déc 2017;168(9-10):875-81.
28. Horner P, Donders G, Cusini M, Gomberg M, Jensen JS, Unemo M. Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in men and women? - a position statement from the European STI Guidelines Editorial Board. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. nov 2018;32(11):1845-51.
29. Holst BS, Bergstrom A, Lagerstedt A-S, Karlstam E, Englund L, Baverud V. Characterization of the bacterial population of the genital tract of adult cats. *Am J Vet Res*. août 2003;64(8):963-8.
30. Clemetson LL, Ward AC. Bacterial flora of the vagina and uterus of healthy cats. *J Am Vet Med Assoc*. 15 mars 1990;196(6):902-6.
31. Tan RJS, Lim EW, Ishak B. Ecology of *Mycoplasmas* in Clinically Healthy Cats. *Aust Vet J*. 1977;53(11):515-8.
32. CHARLOT-VALDIEU A. Contribution à l'étude du diagnostic de l'infertilité chez la jument [Internet]. Thèse de Doctorat Vétérinaire (Lyon); 2006. Disponible sur: <http://alex.vetagro-sup.fr/Record.htm?idlist=1&record=19147716124919659989>
33. 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.
34. Moorthy ARS, Spradbrow PB, Eisler MED. Isolation of mycoplasmas from the genital tract of horses. *Aust Vet J*. avr 1977;53(4):167-9.
35. Hirsh DC, Wiger N. The bacterial flora of the normal canine vagina compared with that of vaginal exudates. *J Small Anim Pract*. 1 janv 1977;18(1):25-30.

36. Ling GV, Ruby AL. Aerobic bacterial flora of the prepuce, urethra, and vagina of normal adult dogs. *Am J Vet Res.* avr 1978;39(4):695-8.
37. Allen WE, Dagnall GJR. Some observations on the aerobic bacterial flora of the genital tract of the dog and bitch. *J Small Anim Pract.* 1 juin 1982;23(6):325-35.
38. Baba E, Hata H, Fukata T, Arakawa A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. *Am J Vet Res.* avr 1983;44(4):606-9.
39. Blunden AS. Isolation of *Clostridium perfringens* from the canine genital tract. *Vet Rec.* 6 août 1983;113(6):133.
40. Bjurström L, Linde-Forsberg C. Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches. *Am J Vet Res.* mai 1992;53(5):665-9.
41. Watts JR, Wright PJ, Whithear KC. Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *J Small Anim Pract.* févr 1996;37(2):54-60.
42. Msheila G.D., Amin J.D., Chaudhary S.U.R. Vaginal Bacterial Flora of Nigeria Local Bitches During Different Stages of Reproductive Cycle. *Int J Agric Biol.* 2001;03(2):183-5.
43. Findik M. The Relationship Between the Stages of the Sexual Cycle, the Pregnancy and Postpartum Periods and Vaginal Flora in Kangal Breed Bitches. *Turk J Vet Anim Sci.* 1 mars 2003;27(3):761-5.
44. Noguchi K, Tsukumi K, Urano T. Qualitative and Quantitative Differences in Normal Vaginal Flora of Conventionally Reared Mice, Rats, Hamsters, Rabbits, and Dogs [Internet]. American Association for Laboratory Animal Science; 2003. Disponible sur: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/2003/00000053/00000004/art00010;jsessionid=791d10pl9bf1d.x-ic-live-03#>
45. Günay Ü, Günay A, Ülgen M, Özel AE. Investigation of the Vaginal Bacterial Flora at Different Stage of Sexual Cycle in the Bitch. 2004;5.
46. 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.* 13 oct 2012;171(15):375.1-375.
47. Hutchins RG, Vaden SL, Jacob ME, Harris TL, Bowles KD, Wood MW, et al. Vaginal Microbiota of Spayed Dogs with or without Recurrent Urinary Tract Infections. *J Vet Intern Med.* 2014;28(2):300-4.
48. Groppetti D, Pecile A, Barbero C, Martino PA. Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. *Theriogenology.* mai 2012;77(8):1549-56.
49. Sykes JE. Chapter 34 - Streptococcal and Enterococcal Infections. In: Sykes JE, éditeur. *Canine and Feline Infectious Diseases* [Internet]. Saint Louis: W.B. Saunders; 2014. p. 334-46. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978143770795300034X>
50. Schultheiss PC, Jones RL, Kesel ML, Olson PN. Normal Bacterial Flora in Canine and Feline Uteri. *J Vet Diagn Invest.* 1 nov 1999;11(6):560-2.
51. *Staphylococcus Infections* [Internet]. W.B. Saunders; 2014. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781437707953000351>
52. Bailiff NL, Westropp JL, Jang SS, Ling GV. *Corynebacterium urealyticum* urinary tract infection in dogs and cats: 7 cases (1996–2003). *J Am Vet Med Assoc.* 1 mai 2005;226(10):1676-80.
53. Sykes JE. Chapter 36 - Gram-negative Bacterial Infections. In: Sykes JE, éditeur. *Canine and Feline Infectious Diseases* [Internet]. Saint Louis: W.B. Saunders; 2014. p. 355-63. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781437707953000363>

54. Sykes JE. Chapter 37 - Anaerobic Bacterial Infections. In: Sykes JE, éditeur. *Canine and Feline Infectious Diseases* [Internet]. Saint Louis: W.B. Saunders; 2014. p. 364-71. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781437707953000375>
55. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci*. 9 juin 1998;95(12):6578-83.
56. Theron J, Cloete TE. Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments. *Crit Rev Microbiol*. 1 janv 2000;26(1):37-57.
57. Lyman CC, Holyoak GR, Meinkoth K, Wieneke X, Chillemi KA, DeSilva U. Canine endometrial and vaginal microbiomes reveal distinct and complex ecosystems. *PLoS ONE* [Internet]. 7 janv 2019;14(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6322750/>
58. Kämpfer P, Lodders N, Falsen E. *Hydrotalea flava* gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes and allocation of the genera *Chitinophaga*, *Sediminibacterium*, *Lacibacter*, *Flaviumibacter*, *Flavisolibacter*, *Niabella*, *Niastella*, *Segetibacter*, *Parasegetibacter*, *Terrimonas*, *Ferruginibacter*, *Filimonas* and *Hydrotalea* to the family *Chitinophagaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011;61(3):518-23.
59. Young YG, Guevarra RB, Jun HL, Wattanaphansak S, Bit NK, Hyeun BK, et al. Comparative analysis of the reproductive tract microbial communities in female dogs with and without pyometra through the 16S rRNA gene pyrosequencing. *Jpn J Vet Res*. nov 2017;65(4):193-200.
60. Edward DG, Fitzgerald WA. The isolation of organisms of the pleuropneumonia group from dogs. *J Gen Microbiol*. août 1951;5(3):566-75.
61. Rosendal S. Canine mycoplasmas. I. Cultivation from conjunctivae, respiratory- and genital tracts. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol*. août 1973;81(4):441-5.
62. Bruchim A, Lutsky I, Rosendal S. Isolation of mycoplasmas from the canine genital tract: a survey of 108 healthy dogs. *Res Vet Sci*. sept 1978;25(2):243-5.
63. Doig PA, Ruhnke HL, Bosu WT. The genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* flora of healthy and diseased dogs. *Can J Comp Med*. juill 1981;45(3):233-8.
64. Janowski T, Zdu A, Jurczak A, Socha P. Incidence of *Mycoplasma canis* in the vagina in three groups of BITCHES. :3.
65. Maksimović Z, Maksimović A, Halilbašić A, Rifatbegović M. Genital mycoplasmas of healthy bitches. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc*. juill 2018;30(4):651-3.
66. Rosendal S. Canine mycoplasmas : cultivation from conjunctivae, respiratory- and genital tracts. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol*. 1 sept 1973;81B(4):441-5.
67. Chalker VJ. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology*. 1 oct 2004;150(10):3491-7.
68. Chalker VJ. Canine mycoplasmas. *Res Vet Sci*. août 2005;79(1):1-8.
69. Kotani H, Ogata M. Isolation and Serological Grouping of *Ureaplasmas* from Dogs. *Jpn J Vet Sci*. 1979;41(6):639-46.
70. Taylor-robinson D, Martin-Bourgon C, Watanabe T, Addey Jp. Isolation of T-mycoplasmas from Dogs and Squirrel Monkeys: Biological and Serological Comparison with those Isolated from Man and Cattle. *Microbiology*,. 1971;68(1):97-107.
71. Zakošek Pipan M, Kajdič L, Kalin A, Plavec T, Zdovc I. Do newborn puppies have their own microbiota at birth? Influence of type of birth on newborn puppy microbiota. *Theriogenology*. 1 août 2020;152:18-28.
72. Gotelli NJ, Colwell RK. Estimating species richness. :16.

73. Marcon E. 3 Mesures neutres de la diversité α ou γ | Mesures de la Biodiversité [Internet]. Disponible sur: <https://ericmarcon.github.io/MesuresBioDiv2/3-chap-MesuresNeutres.html#indice-de-shannon>
74. E van D. Significance of the Vaginal Bacterial Flora in the Bitch: A Review [Internet]. Vol. 131, The Veterinary record. Vet Rec; 1992. Disponible sur: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1441153/?from_term=dog+genital+flora&from_pos=4
75. The normal vaginal and uterine bacterial microbiome in giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). Microbiol Res. 1 juin 2017;199:1-9.
76. Watts JR, Wright PJ, Lee CS. Endometrial cytology of the normal bitch throughout the reproductive cycle. J Small Anim Pract. janv 1998;39(1):2-9.
77. 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. 15 sept 2006;66(5):1325-33.
78. Ishiguro K, Baba E, Torii R, Tamada H, Kawate N, Hatoya S, et al. Reduction of mucin-1 gene expression associated with increased *Escherichia coli* adherence in the canine uterus in the early stage of dioestrus. Vet J. 1 mars 2007;173(2):325-32.
79. Wilborn RR, Maxwell HS. Clinical Approaches to Infertility in the Bitch. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1 mai 2012;42(3):457-68.
80. Root Kustritz MV. Chapter 19 - Infertility in the Dog and Cat. In: Root Kustritz MV, Messonnier SP, éditeurs. Small Animal Theriogenology [Internet]. Saint Louis: Butterworth-Heinemann; 2003. p. 561-98. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780750674089500256>
81. Root Kustritz MV. Managing the Reproductive Cycle in the Bitch. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1 mai 2012;42(3):423-37.
82. Makloski CL. Clinical Techniques of Artificial Insemination in Dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1 mai 2012;42(3):439-44.
83. Johnson CA. Thyroid issues in reproduction. Clin Tech Small Anim Pract. août 2002;17(3):129-32.
84. England GCW. Infertility in the Bitch and Queen. In: Veterinary Reproduction and Obstetrics [Internet]. Elsevier; 2019. p. 593-612. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702072338000331>
85. Buhmann G, Paul F, Herbst W, Melzer F, Wolf G, Hartmann K, et al. Canine Brucellosis: Insights Into the Epidemiologic Situation in Europe. Front Vet Sci [Internet]. 31 mai 2019;6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6554662/>
86. Kauffman LK, Petersen CA. Canine Brucellosis: Old Foe and Reemerging Scourge. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1 juill 2019;49(4):763-79.
87. Decaro N, Carmichael LE, Buonavoglia C. Viral Reproductive Pathogens of Dogs and Cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract. mai 2012;42(3):583-98.
88. Wallach EE, Styler M, Shapiro SS. Mollicutes (mycoplasma) in infertility. Fertil Steril. juill 1985;44(1):1-12.
89. Lingwood CA, Quinn PA, Wilansky S, Nutikka A, Ruhnke HL, Miller RB. Common sulfoglycolipid receptor for mycoplasmas involved in animal and human infertility. Biol Reprod. oct 1990;43(4):694-7.
90. Johnson CA. Diagnosis and Treatment of Chronic Vaginitis in the Bitch. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1 mai 1991;21(3):523-31.
91. Nicolson GL, Nasralla MY, Nicolson NL. The pathogenesis and treatment of mycoplasmal infections. Antimicrob Infect Dis Newsl. nov 1998;17(11):81-7.

92. Moreno I, Simon C. Deciphering the effect of reproductive tract microbiota on human reproduction. *Reprod Med Biol.* janv 2019;18(1):40-50.
93. Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, Hallén A, Fredlund H, Jensen JS, et al. Composition of the Vaginal Microbiota in Women of Reproductive Age – Sensitive and Specific Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis Is Possible? *PLOS ONE.* 9 avr 2013;8(4):e60670.
94. Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, D'Argenio V. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Female Infertility. *High-Throughput.* 3 mai 2020;9(2).
95. Wee BA, Thomas M, Sweeney EL, Frentiu FD, Samios M, Ravel J, et al. A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2018;58(3):341-8.
96. Campisciano G, Florian F, D'Eustacchio A, Stanković D, Ricci G, De Seta F, et al. Subclinical alteration of the cervical-vaginal microbiome in women with idiopathic infertility. *J Cell Physiol.* juill 2017;232(7):1681-8.
97. Delucchi L, Fraga M, Perelmutter K, Cidade E, Zunino P. Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of in vitro probiotic activity of selected isolates. *Can Vet J.* oct 2008;49(10):991-4.
98. Ström B, Linde-Forsberg C. Effects of ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole on the vaginal bacterial flora of bitches. *Am J Vet Res.* juin 1993;54(6):891-6.
99. Rota A, Milani C, Drigo I, Drigo M, Corrà M. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from breeding dogs. *Theriogenology.* 1 janv 2011;75(1):115-21.
100. Milani C, Corrà M, Drigo M, Rota A. Antimicrobial resistance in bacteria from breeding dogs housed in kennels with differing neonatal mortality and use of antibiotics. *Theriogenology.* 1 oct 2012;78(6):1321-8.
101. Bjurström L. Aerobic bacteria occurring in the vagina of bitches with reproductive disorders. *Acta Vet Scand.* 1993;34(1):29-34.
102. Münnich A, Küchenmeister U. Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: cornerstones of practical approach. *Reprod Domest Anim Zuchthyg.* juin 2014;49 Suppl 2:64-74.
103. Freundt EA. A2 - PRINCIPLES OF MYCOPLASMA CLASSIFICATION AND TAXONOMY. In: Razin S, Tully JG, éditeurs. *Methods in Mycoplasmaology* [Internet]. Academic Press; 1983. p. 9-13. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125838016500081>
104. Chalker VJ, Brownlie J. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *Int J Syst Evol Microbiol.* mars 2004;54(Pt 2):537-42.
105. Brown DR. Tenericutes. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [Internet]. American Cancer Society; 2018. p. 1-3. Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.pbm00025.pub2>
106. 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.* 29 avr 2016;88(suppl 1):599-607.
107. Razin S, Herrmann R, éditeurs. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas* [Internet]. Springer US; 2002. Disponible sur: <https://www.springer.com/gp/book/9781475782325>
108. May M, Brown DR. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Mollicutes: Minutes of the closed meeting, 8 July 2018, Portsmouth, New Hampshire, USA. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69(7):2169-71.
109. Brown DR, May M, Michaels DL, Barbet AF. Genome Annotation of Five *Mycoplasma canis* Strains. *J Bacteriol.* août 2012;194(15):4138-9.

110. Lazarev VN, Levitskii SA, Basovskii YI, Chukin MM, Akopian TA, Vereshchagin VV, et al. Complete genome and proteome of *Acholeplasma laidlawii*. *J Bacteriol.* sept 2011;193(18):4943-53.
111. Himmelreich R, Plagens H, Hilbert H, Reiner B, Herrmann R. Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res.* 15 févr 1997;25(4):701-12.
112. 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.
113. Miyata M, Ogaki H. Cytoskeleton of *Mollicutes*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2006;11(3-5):256-64.
114. Chaudhry R, Ghosh A, Chandolia A. Pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae*: An update. *Indian J Med Microbiol.* mars 2016;34(1):7-16.
115. Ljubin-Sternak S, Meštrović T. Chlamydia trachomatis and Genital Mycoplasmas: Pathogens with an Impact on Human Reproductive Health. *J Pathog.* 2014;2014:183167.
116. Rottem S. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells. *Physiol Rev.* 1 avr 2003;83(2):417-32.
117. Tarshis M, Salman M, Rottem S. Cholesterol is required for the fusion of single unilamellar vesicles with *Mycoplasma capricolum*. *Biophys J.* mars 1993;64(3):709-15.
118. Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev.* avr 2003;83(2):417-32.
119. Rottem S, Naot Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends Microbiol.* nov 1998;6(11):436-40.
120. Chambaud I, Wróblewski H, Blanchard A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol.* déc 1999;7(12):493-9.
121. Simecka JW, Ross SE, Cassell GH, Davis JK. Interactions of Mycoplasmas with B Cells: Antibody Production and Nonspecific Effects. *Clin Infect Dis.* 1 août 1993;17(Supplement_1):S176-82.
122. MARTIN O. La microflore vaginale de la chienne : synthèse bibliographique et étude spéciale de l'infection à *Mycoplasma canis* [Internet]. Thèse de Doctorat Vétérinaire (Lyon); 2001. Disponible sur: <http://alex.vetagro-sup.fr/Record.htm?idlist=5&record=19137621124919558039>
123. Citti C, Nouvel L-X, Baranowski E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol.* 1 juill 2010;5(7):1073-85.
124. Tsai S, Wear DJ, Shih JW, Lo SC. Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 oct 1995;92(22):10197-201.
125. 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.* déc 1999;19(12):7995-8002.
126. Root-Bernstein RS, Hobbs SH. Homologies between mycoplasma adhesion peptide, CD4 and class II MHC proteins: a possible mechanism for HIV-mycoplasma synergism in AIDS. *Res Immunol.* janv 1991;142(7):519-23.
127. Experimentally induced mycoplasmal infection in the genital tract of the female dog. *Theriogenology.* 1 déc 1979;12(6):355-70.
128. Laber G, Holzmann A. Experimentally induced mycoplasmal infection in the genital tract of the male dog: II. Andrological and microbiological investigations after exposure to mycoplasmas. *Theriogenology.* 1 avr 1977;7(4):177-88.
129. Haggerty CL. Evidence for a role of *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease: *Curr Opin Infect Dis.* févr 2008;21(1):65-9.

130. Capoccia R, Greub G, Baud D. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis.* juin 2013;26(3):231-40.
131. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to Multicolored Butterfly. *Clin Microbiol Rev.* juill 2011;24(3):498-514.
132. Ljubin-Sternak S, Meštrović T. *Chlamydia trachomatis* and Genital Mycoplasmas: Pathogens with an Impact on Human Reproductive Health. *J Pathog.* 2014;2014:1-15.
133. Møller BR, Freundt EA. Experimental infection of the genital tract of female grivet monkeys by *Mycoplasma hominis*: effects of different routes of infection. *Infect Immun.* déc 1979;26(3):1123-8.
134. Taylor-Robinson D, Furr PM, Tully JG, Barile MF, Møller BR. Animal models of *Mycoplasma genitalium* urogenital infection. *Isr J Med Sci.* juin 1987;23(6):561-4.
135. Wood GE, Patton DL, Cummings PK, Iverson-Cabral SL, Totten PA. Experimental Infection of Pig-Tailed Macaques (*Macaca nemestrina*) with *Mycoplasma genitalium*. *Infect Immun.* 2017;85(2).
136. Ruhnke HL, Doig PA, MacKay AL, Gagnon A, Kierstead M. Isolation of *Ureaplasma* from bovine granular vulvitis. *Can J Comp Med Rev Can Med Comp.* avr 1978;42(2):151-5.
137. Doig PA, Ruhnke HL, MacKay AL, Palmer NC. Bovine granular vulvitis associated with ureaplasma infection. *Can Vet J Rev Veterinaire Can.* avr 1979;20(4):89-94.
138. Stalheim OH, Proctor SJ, Gallagher JE. Growth and effects of ureaplasmas (T mycoplasmas) in bovine oviductal organ cultures. *Infect Immun.* mars 1976;13(3):915-25.
139. Moorthy AR, Spradbrow PB, Eisler ME. Isolation of mycoplasmas from the genital tract of horses. *Aust Vet J.* avr 1977;53(4):167-9.
140. Lemcke RM. 5 - EQUINE MYCOPLASMAS. In: Tully JG, Whitcomb RF, éditeurs. *The Mycoplasmas* [Internet]. Academic Press; 1979. p. 177-89. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120784028500115>
141. Tan RJS, Miles J a. R. Possible Role of Feline T-Strain Mycoplasmas in Cat Abortion. *Aust Vet J.* 1974;50(4):142-5.
142. Tan RJ, Miles JA. Incidence and significance of mycoplasmas in sick cats. *Res Vet Sci.* janv 1974;16(1):27-34.
143. L'Abée-Lund TM, Heiene R, Friis NR, Ahrens P, Sørum H. *Mycoplasma canis* and urogenital disease in dogs in Norway. *Vet Rec.* 23 août 2003;153(8):231-5.
144. Mycoplasmas from vagina of a bitch with open cervix pyometra | *Veterinary Record* [Internet]. [cité 19 oct 2020]. Disponible sur: <https://veterinaryrecord.bmj.com/content/102/3/62>
145. Dumon C, Mimouni P. Mortinatalité en élevage canin liée à des maladies infectieuses : brucelloses, herpès virose, mycoplasmoses. *EMC - Vét.* 1 mars 2005;2(1):54-62.
146. Ulgen M, Cetin C, Sentürk S, Ozel AE, Ozdemir U. Urinary tract infections due to *Mycoplasma canis* in dogs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* sept 2006;53(7):379-82.
147. 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* [Internet]. 1 sept 2018 ;365(18). Disponible sur: <https://academic.oup.com/femsle/article/365/18/fny185/5057471>
148. Waites K, Lysnyansky I, Bebear C. Emerging Antimicrobial Resistance in Mycoplasmas of Humans and Animals. In: *Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis*. Caister Academic Press. 2014. p. 289-322.
149. 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.* 1 juin 1972;34(4):197-206.

150. Khalil D. Résistance aux antibiotiques chez *Mycoplasma bovis* : mécanismes moléculaires et évolution en France [Internet] [phdthesis]. Université de Lyon; 2016. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01447763>
151. Judlin P. [Genital mycoplasmas]. *Gynecol Obstet Fertil.* nov 2003;31(11):954-9.
152. Guay DRP. Drug forecast – the peptide deformylase inhibitors as antibacterial agents. *Ther Clin Risk Manag.* août 2007;3(4):513-25.
153. 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.
154. Wiebe VJ, Howard JP. Pharmacologic Advances in Canine and Feline Reproduction. *Top Companion Anim Med.* 1 mai 2009;24(2):71-99.
155. Francoz D, Fortin M, Fecteau G, Messier S. Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. *Vet Microbiol.* 5 janv 2005;105(1):57-64.
156. Cai HY, McDowall R, Parker L, Kaufman EI, Caswell JL. Changes in antimicrobial susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* over time. *Can J Vet Res.* janv 2019;83(1):34-41.
157. 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.* nov 2017;55(11):3242-8.
158. Deguchi T, Ito S, Yasuda M, Sato Y, Uchida C, Sawamura M, et al. Surveillance of the prevalence of macrolide and/or fluoroquinolone resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium* in Japan. *J Infect Chemother.* nov 2018;24(11):861-7.
159. 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.* avr 1997;214(4):359-66.
160. Valentine-King MA, Brown MB. Antibacterial Resistance in *Ureaplasma* Species and *Mycoplasma hominis* Isolates from Urine Cultures in College-Aged Females. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 22 sept 2017;61(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5610494/>
161. Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Lombaard HA, Kock MM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *BMC Infect Dis.* 28 mars 2014;14:171.
162. Spaepen MS, Kundsinn RB, Horne HW. Tetracycline-resistant T-mycoplasmas (*Ureaplasma urealyticum*) from patients with a history of reproductive failure. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 1976;9(6):1012-8.
163. Taylor-Robinson D, Bébéar C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *J Antimicrob Chemother.* nov 1997;40(5):622-30.
164. Gautier-Bouchardon AV. Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol Spectr.* 2018;6(4).
165. 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.* mai 2017;30(5):343-50.
166. Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* août 1998;27 Suppl 1:S54-63.
167. 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.* 5 févr 2016;82(4):1060-8.
168. Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Gruson D, Lefrançois 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.* sept 2000;44(9):2557-60.

169. 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.* avr 2006;44(4):1590-1.
170. Overall Decrease in the Susceptibility of *Mycoplasma bovis* to Antimicrobials over the Past 30 Years in France [Internet]. Disponible sur: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087672>
171. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [cité 21 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.r-project.org/>

Infection vaginale à mycoplasmes chez la chienne : étude de l'intérêt d'un traitement antibiotiques pendant la gestation

Auteur

Konter Guillaume

Résumé

Le microbiote vaginal de la chienne est constitué d'une grande diversité de bactéries. Son rôle dans les troubles de la fertilité est mal connu et les moyens d'explorations disponibles sont limités. Les mycoplasmes sont des organismes appartenant au microbiote vaginal de la chienne et sont suspectés de jouer un rôle pathogène en reproduction. Leur détection motive la mise en place de traitement antibiotique. L'étude d'une population de chiennes reproductrices permet de remettre en cause cette suspicion et les pratiques associées à la détection de mycoplasmes vaginaux. La fertilité ne semble pas impactée par la présence des mycoplasmes. D'autres indicateurs comme la prolificité et la prise de poids des chiots lors de leur première semaine de vie montrent une absence d'effet délétère significatif de la part des mycoplasmes.

Mots-clés

Mycoplasmes, mycoplasmoses, microbiote, flore, bactériologie, reproduction, chienne, prolificité, infertilité, fertilité, antibiotiques

Jury

Président du jury	:	Professeure	DESESTRET Virginie
Directeur de thèse	:	Professeur	BUFF Samuel
Assesseur	:	Professeure	RENE-MARTELLET Magalie
Membre invité	:	DOCTEUR	BONTE Tancredi