

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

THEME

*LES HEMOPLASMES DES
RUMINANTS : ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE*

PRESNTER PAR:

- Mr: HADJ EL AMINE
- Mr: CHÉRIF ABDELWAHID

PROMOTEUR:

- Dr: BENALLOU BOUABDELLAH

PROMOTION: 2010 - 2011

Remerciement

Au nom de dieu le clément et miséricordieux, qui par sa seule grâce nous sommes pu réaliser ce travail.

*Nous tenons
avant tous a remercier nos
Chers parents, nos frères pour l'aide qu'ils m'avaient
prodigué tout au long de notre chemin, leur patience, leur
soutient sans faillir, financier et moral
Nos sincères remerciements pour tous ceux qui nos aidé de
prés ou de loin a accomplir nos études.*

Nous tenons à remercier :

*Notre encadreur : Le Docteur **BENALLOU
BOUABDELLAH**, dont le travail avec,
était un énorme privilège.*

*Le Directeur d' institut pour sa disponibilité pour
l'intérêt des étudiants.*

*Nous remercions tous les enseignants d'institut des
sciences vétérinaires de l'université **IBN KHALDOUN***

CHERIF ABDELWAHID ET HADJEL AMINE

Sommaire

Liste des figures	13
Liste des tableaux	15
Liste des annexes.....	17
Liste des abréviations	19
Introduction	21

I. Les hémoplasmes, de leur première mise en évidence aux changements récents de leur taxonomie	23
A. La première mise en évidence des hémoplasmes des ruminants.....	23
1. La découverte d' <i>Eperythrozoon wenyonii</i> et d' <i>Eperythrozoon ovis</i>	23
a) <i>Eperythrozoon wenyonii</i>	23
b) <i>Eperythrozoon ovis</i>	24
2. La découverte de l'espèce qui deviendra par la suite « <i>Candidatus Mycoplasma haemolamae</i> ».....	24
B. Les modifications de la taxonomie des hémoplasmes	26
1. Etat de la classification jusqu'en 2001	26
a) Caractéristiques des <i>Rickettsiales</i> que l'on peut retrouver chez les espèces du genre <i>Eperythrozoon</i>	27
b) Caractéristiques des <i>Anaplasmataceae</i> que l'on peut retrouver chez les espèces du genre <i>Eperythrozoon</i>	27
c) Comment les genres <i>Eperythrozoon</i> et <i>Haemobartonella</i> étaient-ils différenciés ? ..	27
1. Les découvertes qui ont motivé l'inclusion des espèces du genre <i>Eperythrozoon</i> dans le genre <i>Mycoplasma</i>	28
a) L'absence de paroi.....	28
b) Des divergences entre les caractéristiques des autres membres de la famille des <i>Anaplasmataceae</i> et celles des espèces du genre <i>Eperythrozoon</i>	28
c) Des études phylogénétiques ont permis de rapprocher les espèces du genre <i>Eperythrozoon</i> des mycoplasmes	29
c1. En 2001, <i>Eperythrozoon wenyonii</i> prend le statut de « <i>Candidatus Mycoplasma wenyonii</i> »	29
c2. En 2002, <i>Eperythrozoon wenyonii</i> rejoint officiellement le genre <i>Mycoplasma</i> et prend le nom de <i>Mycoplasma wenyonii</i>	31
c3. En 2002, on établit la relation phylogénétique entre la bactérie découverte à la surface des hématies de lama et les mycoplasmes	31
c4. En 2004, <i>Eperythrozoon ovis</i> devient <i>Mycoplasma ovis</i>	31
c5. En 2005, la quasi-totalité des espèces du genre <i>Eperythrozoon</i> sont transférées vers le genre <i>Mycoplasma</i>	32
C. Situation plus précise des hémoplasmes au sein du genre <i>Mycoplasma</i>	34
1. <i>Mycoplasma</i> , un genre très diversifié contenant de très nombreuses espèces	34
1. Arbre phylogénétique actuel.....	36
1. Identification de nouvelles espèces d'hémoplasmes	37
1. « <i>Candidatus Mycoplasma haemotarandirangiferis</i> », l'hémoplasme du renne	37
1. « <i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i> ».....	38

II. Etude bactériologique des hémoplasmes des ruminants.....	41
A Morphologie (en microscopie optique)	41
1 Colorations utilisables	41
2 Forme.....	42
3 Taille des organismes	43
B Structure (en microscopie électronique).....	43
C Position et répartition au niveau des hématies	46
D Génome.....	48
E Multiplication et mode de vie.....	48
F Sensibilité-Résistance.....	49
G Pouvoir pathogène	49
1 Facteurs d'adhésion	49
a) Arguments en faveur de l'existence de facteurs d'adhésion	49
b) Identification de gènes codant pour des adhésines	52
2 Altération de la membrane érythrocytaire.....	52
H Pouvoir antigénique.....	53
1 Cinétique de la réponse anticorps.....	53
2 Réactions croisées entre les différentes espèces d'hémoplasmes.....	53
3 Réactions croisées avec d'autres bactéries à tropisme sanguin.....	54
I Pouvoir immunogène.....	55
1 Mise en évidence	55
2 Transfert des anticorps de la mère au jeune	56
J Pathogénie	56
1 Diminution de la quantité de glutathion intraérythrocytaire	57
2 Réactions immunes.....	57
a) Argument : les réponses à l'infection varient selon les individus	57
b) Le rôle de la rate	58
3 Hémolyse extra-vasculaire	59
3 Cinétique de l'infection	60
III. Aspects cliniques et paracliniques.....	63
A Tableau clinique	63
1 Chez les ovins.....	63
a) La forme subaiguë	64
b) La forme aiguë à suraiguë	64
b1. chez les agneaux	64
b2. chez les brebis gestantes.....	65
c) La forme chronique	66
2 Chez les bovins.....	67
3 Chez le lama et l'alpaga	69
B. Conséquences de l'infection sur la production	69
C. Hématologie.....	71
1 Observation des frottis sanguins.....	71
2 Hémogramme	71
a) Hémogramme rouge	71
b) Hémogramme blanc.....	74
3 Temps de coagulation.....	74
D Conséquences biochimiques de l'infection	75
1 Modification des paramètres acido-basiques sanguins.....	75
1 Le piège de l'hypoglycémie	76
E. Lésions observées au cours de l'autopsie	81
F. Histopathologie	82
G. Pronostic	83

IV. Epidémiologie descriptive.....	85
1 Répartition géographique	85
1 Hôtes.....	86
1 Hôtes de <i>Mycoplasma ovis</i>	86
a) Le mouton.....	86
b) La chèvre	86
b1. mise en évidence de l'infection de la chèvre par <i>Mycoplasma ovis</i>	86
b2. cinétique de l'infection et de la réponse anticorps	87
c) La vache	88
d) Les autres espèces	88
2. Hôtes de <i>Mycoplasma wenyonii</i>	89
3. Hôtes de « <i>Candidatus Mycoplasma haemolamae</i> ».....	89
4. Hôtes de « <i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i> » et « <i>Candidatus Mycoplasma haemotarangiferis</i> »	89
V. Epidémiologie analytique.....	91
1 Sources	91
1 Modalités de la transmission	91
1 Transmission par les arthropodes hématophages	91
a) Vecteurs de <i>Mycoplasma ovis</i>	91
b) Vecteurs de <i>Mycoplasma wenyonii</i>	94
2 Transmission iatrogène.....	94
3 Transmission verticale.....	94
4 Transmission orale.....	96
2 Dose infectante	96
1 Facteurs favorisants	97
1 Age et stade physiologique.....	97
2 Baisse d'immunité	97
3 Splénectomie	98
4 Existence d'infections intercurrentes	98
2 Hypothèses pouvant justifier les différences observées entre l'infection chez la chèvre et le mouton	99
VI. Diagnostic de l'infection par les hémoplasmes	101
1 Diagnostic épidémioclinique.....	101
1 Tableau clinique	101
1 Modifications de l'hémogramme	102
3 Diagnostic nécropsique	102
4 Prélèvement sanguin puis inoculation à un animal sain, splénectomisé	103
1 Diagnostic expérimental.....	103
1 Diagnostic expérimental direct.....	103
a) Observation au microscope optique	103
a1. réalisation des frottis sanguins.....	103
a2. coloration au Giemsa	103
a3. coloration à l'acridine orange, puis observation sous lumière UV.....	104
a4. les limites de l'observation au microscope optique dans le diagnostic	104
b) Test de Coombs (modifié par Sheriff).....	105
c) PCR.....	108
c1. PCR suivie d'une électrophorèse.....	108
c2. essai d'une technique de PCR pour dépister les lamas et alpagas porteurs de « <i>Candidatus Mycoplasma haemolamae</i> ».....	111
2 Diagnostic expérimental indirect.....	112
a) technique d'héماغlutination indirecte	112

b)	technique de fixation du complément.....	115
c)	technique d'immunofluorescence indirecte.....	115
d)	technique ELISA	117
C.	Diagnostic différentiel	117
VII.	Traitement des hémoplasmoses chez les ruminants	121
↓	Traitement causal.....	121
↓	Antibiotiques	121
↓	Chlorpromazine	122
↓	Dérivés arsenicaux.....	122
↓	Traitement adjuvant.....	122
VII.	Prophylaxie	123
↓	Prophylaxie sanitaire	123
↓	Lutte contre les vecteurs.....	123
↓	Respect des bonnes pratiques d'élevage.....	125
↓	Mesures d'assainissement	125
↓	Prophylaxie médicale	125
Conclusion	127	
Bibliographie.....	129	

Liste des figures

Figure 1 : observation au microscope optique et au microscope électronique à transmission de « <i>Candidatus Mycoplasma haemolamae</i> ».....	25
Figure 2 : position dans la classification du genre <i>Eperythrozoon</i> , en 2001.....	26
Figure 3 : arbre phylogénétique, établi suite à l'étude du gène codant pour l'ARNr 16S, et montrant la relation phylogénétique entre <i>Eperythrozoon wenyonii</i> et certaines espèces du genre <i>Mycoplasma</i> , obtenu en 2001 par Neimark et ses collaborateurs.....	30
Figure 4 : arbre phylogénétique établi par Neimark, Hoff et Ganter en 2004 suite à l'étude du gène codant pour l'ARNr 16S, en vue de montrer la relation entre <i>Mycoplasma ovis</i> , les autres hémoplasmes, et les autres mycoplasmes.....	32
Figure 5 : arbre montrant les relations phylogénétiques entre les différentes espèces d'hémoplasmes, ainsi qu'entre les hémoplasmes et le genre <i>Mycoplasma</i> , établi suite à l'étude du gène codant pour l'ARNr 16S.....	37
Figure 6 : observation au microscope optique d'hématies infectées par <i>Mycoplasma ovis</i>	38
Figure 7 : coloration de <i>Mycoplasma suis</i> à l'acridine orange.....	42
Figure 8 : observation au microscope électronique à transmission d'une hématie infectée par <i>Mycoplasma ovis</i>	43
Figure 9 : observation au microscope électronique à transmission d'une forme en coque de <i>Mycoplasma ovis</i> , détachée d'une hématie.....	44
Figure 10 : observation au microscope électronique à balayage d'hématies infectées par <i>Mycoplasma ovis</i>	44
Figure 11 : vue au microscope électronique à balayage de « <i>Candidatus Mycoplasma haemolamae</i> ».....	45
Figure 12 : observation au microscope électronique à contraste de phase d'une forme en bacille de <i>Mycoplasma wenyonii</i> contenant 2 éléments en relief, à la surface d'une hématie (objectif x12500).....	45
Figure 13 : observation au microscope électronique à transmission d'un <i>Mycoplasma ovis</i> étroitement accolé à la membrane érythrocytaire.....	46
Figure 14 : observation au microscope optique d'hématies infectées par <i>Mycoplasma wenyonii</i>	47
Figure 15 : observation au microscope électronique à transmission d'indentations de la membrane d'un érythrocyte infecté par <i>Mycoplasma ovis</i>	50
Figure 16 : observation au microscope électronique à transmission de fines fibrilles entre <i>Mycoplasma ovis</i> et une hématie.....	50
Figure 17 : protrusions membranaires d'une hématie infectée par <i>Mycoplasma ovis</i> , observées au microscope électronique à balayage.....	51
Figure 18 : mise en évidence au microscope électronique d'une substance transparente aux électrons entre <i>Mycoplasma haemofelis</i> et la membrane de l'érythrocyte.....	51
Figure 19 : observation d'une coupe de rate provenant d'un ovin infecté expérimentalement.....	59
Figure 20 : évolution des paramètres hématologiques au cours du temps chez le mouton infecté par <i>Mycoplasma ovis</i>	72
Figure 21 : évolution de la glycémie moyenne au cours d'une infection expérimentale par <i>Mycoplasma ovis</i> chez 7 agneaux.....	77
Figure 22 : évolution au cours du temps de la glycémie et de l'hématocrite chez un veau splénectomisé infecté par <i>Mycoplasma wenyonii</i>	77
Figure 23 : influence du délai entre le prélèvement et la mesure de la glycémie plasmatique dans les prélèvements de sang hépariné chez un individu infecté par <i>Mycoplasma ovis</i> (un jour après le début du traitement à l'oxytétracycline) et chez un individu sain.....	79
Figure 24 : influence du degré de bactériémie sur la valeur de la glycémie plasmatique.....	79

Figure 25 : évolution au cours du temps de la concentration en glucose d'un sérum équin (0,93mg/dl de glucose) incubé avec le sang total d'un mouton infecté par <i>Mycoplasma ovis</i> : comparaison des résultats obtenus selon le nombre de jours de traitement à l'oxytétracycline (à court terme).....	80
Figure 26 : dépôts d'hémosidérine sur une coupe de rein chez un ovin infecté expérimentalement par <i>Mycoplasma ovis</i> (coloration avec le bleu de Prusse et le rouge neutre).....	82
Figure 27 : dépôts d'hémosidérine dans les tubules contournés proximaux du rein, chez un ovin infecté expérimentalement par <i>Mycoplasma ovis</i> (coloration avec le bleu de Prusse et le rouge neutre).....	83
Figure 28 : résultats obtenus suite à la PCR et la DGGE par Mc Auliffe et ses collaborateurs.....	111

Liste des tableaux

Tableau I : principales différences entre les espèces du genre <i>Eperythrozoon</i> et celles du genre <i>Haemobartonella</i>	28
Tableau II : taxonomie des <i>Mollicutes</i> et hôtes.....	35
Tableau III : réactions sérologiques croisées entre les hémoplasmes et les anaplasmes.....	54
Tableau IV : évolution des paramètres hématologiques au cours du temps chez un veau infecté par <i>Mycoplasma wenyonii</i>	73
Tableau V : délais d'apparition de l'infection à <i>Mycoplasma ovis</i> en fonction de la dilution du sang d'un donneur infecté.....	97
Tableau VI : résultats obtenus au test de Coombs modifié par Sheriff, en fonction du statut infecté/non infecté, et des différentes phases de l'infection.....	106
Tableau VII : mise en évidence de l'hémoplasme ovin par observation de frottis et par le test de Coombs modifié, pour 2 troupeaux infectés naturellement.....	107
Tableau VIII : comparaison des titres obtenus avec l'hémagglutination et l'inhibition de l'hémagglutination, chez des bovins atteints et des bovins sains.....	113
Tableau IX : recherche d'une corrélation entre le résultat obtenu au test d'hémagglutination, la valeur de l'hématocrite, et l'observation des frottis sanguins.....	114
Tableau X : évolution au cours du temps (J0=inoculation) des valeurs moyennes de la bactériémie, des titres obtenus à l'IFI de l'hématocrite et de la concentration en hémoglobine, chez 21 agneaux infectés expérimentalement par <i>Mycoplasma ovis</i>	116

Liste des annexes

Annexe 1 : coloration de May-Grünwald-Giemsa ; protocole.....	13737
Annexe 2 : valeurs usuelles de l'hémogramme chez les bovins	13939
Annexe 3 : valeurs usuelles de l'hémogramme chez les ovins	141
Annexe 4 : valeurs usuelles de l'hémogramme chez le lama	143
Annexe 5 : exemple de protocole de PCR pour la détection de <i>Mycoplasma wenyonii</i> dans un échantillon sanguin.....	145

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ARNr : Acide Ribo-Nucléique ribosomal

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (= électrophorèse en gradient de dénaturation)

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

GMQ : Gain Moyen Quotidien

ICSP : International Committee on Systematics of Prokaryotes

IFI : Immunofluorescence Indirecte

IgG : Immunoglobuline G

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCV : Packed Cell Volume (=hématocrite)

UV : Ultra-Violets

Introduction

Les hémoplasmes regroupent toutes les espèces qui appartenaient aux genres *Eperythrozoon* et *Haemobartonella*. Ces espèces ont été récemment incluses dans le genre *Mycoplasma*, ou sont candidates à cette inclusion (statut *Candidatus*). Ce sont des germes que l'on trouve :

- chez les carnivores domestiques : *Mycoplasma haemocanis* (anciennement *Haemobartonella canis*) et « *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* » chez le chien, *Mycoplasma haemofelis* (anciennement *Haemobartonella felis* large form) ainsi que « *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (anciennement *Haemobartonella felis* small form) et « *Candidatus Mycoplasma turicensis* » chez le chat.
- chez la souris : *Eperythrozoon coccoides* (également connue sous le nom de « *Gyromorpha musculi* ») et *Mycoplasma haemomuris* (anciennement *Haemobartonella muris*)
- chez le porc : *Mycoplasma suis* (anciennement *Eperythrozoon suis*)
- chez les bovins : *Mycoplasma wenyonii* (anciennement *Eperythrozoon wenyonii*) ainsi que « *Candidatus Mycoplasma haemobos* »
- chez les ovins : *Mycoplasma ovis* (anciennement *Eperythrozoon ovis*)
- chez le lama et l'alpaga : « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* »
- chez le renne (« *Candidatus Mycoplasma haemotarandirangiferis* »), l'opossum (« *Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis* »), le singe écureuil (« *Candidatus Mycoplasma kahanei* »)

Dans notre étude bibliographique, nous nous limiterons à l'étude des hémoplasmes pathogènes chez les ruminants, c'est-à-dire aux espèces *Mycoplasma wenyonii*, *Mycoplasma ovis* et « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* » ; nous décrirons également brièvement la mise en évidence de « *Candidatus Mycoplasma haemotarandirangiferis* » et de « *Candidatus Mycoplasma haemobos* ». En revanche, nous ne parlerons pas des espèces *Eperythrozoon tuomii* et *Eperythrozoon teganodes*, dont la pathogénicité n'a jamais pu être prouvée.

Nous expliquerons tout d'abord les raisons qui ont motivé ces changements de taxonomie. Ensuite nous présenterons les caractéristiques bactériologiques de ces germes, ainsi que l'expression clinique et l'épidémiologie de l'infection par les hémoplasmes. Nous aborderons également les moyens de diagnostic, le traitement et la prophylaxie des hémoplasmoses.

I. Les hémoplasmes, de leur première mise en évidence aux changements récents de leur taxonomie

A. La première mise en évidence des hémoplasmes des ruminants

La découverte des hémoplasmes des ruminants est assez récente, puisque toutes les espèces connues à ce jour ont été observées pour la première fois au XXe siècle.

1. La découverte d'*Eperythrozoon wenyonii* et d'*Eperythrozoon ovis*

Eperythrozoon wenyonii et *Eperythrozoon ovis* ont été observés pour la première fois en 1934, respectivement chez la vache (*Bos taurus*) et le mouton (*Ovis aries*) ; ce sont les premières espèces d'hémoplasmes à avoir été mises en évidence.

a) *Eperythrozoon wenyonii*

La première description d'*Eperythrozoon wenyonii* a été effectuée par Adler et Ellenbogen [1934], en Palestine, lors d'une étude qui portait initialement sur l'infection par *Theileria annulata* chez des veaux splénectomisés. Ils ont été surpris par la présence de bactéries à la fois dans les hématies, à la surface de celles-ci mais également libres dans le plasma, et d'une hyperthermie chez les veaux (entre 40 et 41°C), entre 38 et 44 jours après l'inoculation.

En injectant le sang d'un animal infecté à un autre veau splénectomisé, ils ont mis en évidence une contamination de l'animal récepteur. Ces deux scientifiques ont trouvé que la morphologie de ces germes et leur localisation rappelaient fortement celles d'*Eperythrozoon coccoides*, mis en évidence par Schilling en 1928 chez des souris splénectomisées et considéré comme l'« espèce-type » du genre *Eperythrozoon*. Ils ont alors proposé pour la bactérie qu'ils venaient de découvrir le nom *Eperythrozoon wenyonii*, en l'honneur du Dr C.M. Wenyon qui avait travaillé sur cette espèce. (pour l'historique, voir [Euzéby, 2005]).

NB : Aujourd'hui, on sait qu'*Eperythrozoon wenyonii* n'est retrouvé qu'à l'extérieur des érythrocytes. Or, Adler et Ellenbogen affirment les avoir observés à l'intérieur des globules rouges. Il est possible qu'ils aient pris des composants intracellulaires des hématies pour cette bactérie, car on sait qu'il est difficile de les distinguer des corps de Heinz, de Howell-Jolly, de

Pappenheimer, ou encore des inclusions basophiles qui signent une anémie régénérative [Neimark et al, 2001].

b) *Eperythrozoon ovis*

Plus tard au cours de l'année 1934, c'est également de façon fortuite qu'a été découvert l'hémoplasme ovin (*Eperythrozoon ovis*), par Neitz *et al.* [1934], alors qu'ils étaient en train d'étudier l'agent responsable de la cowdriose.

Au début ils ont cru à des artéfacts, mais ils ont constaté que ces éléments anormaux étaient de plus en plus nombreux au fil des jours [Scott et Woldehiwet, 1993]. Ils ont tenté d'inoculer du sang contenant ces organismes à trois moutons sains, et les ont retrouvés dans le sang de ces trois moutons une semaine plus tard. Comme pour *Eperythrozoon wenyonii*, ils ont trouvé une grande similitude entre cette bactérie et *Eperythrozoon coccoides*, et ont donc proposé le nom *Eperythrozoon ovis* pour le germe qu'ils venaient de mettre en évidence. De plus, ils ont constaté des ressemblances entre les genres *Eperythrozoon*, *Bartonella*, *Grahamella* et *Anaplasma* ; ils ont alors suggéré de réunir ces quatre genres dans une même famille, celle des *Anaplasmataceae* [Neitz et al, 1934].

Cette famille ne sera officiellement reconnue qu'en 1957 [Euzeby, 2005], suite aux travaux de Philip.

2. La découverte de l'espèce qui deviendra par la suite

« *Candidatus Mycoplasma haemolamae* »

La mise en évidence de cette espèce est beaucoup plus récente, puisqu'elle date de 1990. Mc Laughlin et ses collaborateurs, en observant des prélèvements sanguins issus de neuf lamas (*Lama glama*) morts (appartenant à un troupeau de 84 animaux), ont observé, chez deux individus, des micro-organismes à la surface de leurs hématies, et également libres dans le plasma (figure 1).

Ils ont alors prélevé du sang chez les autres lamas du troupeau, et ont observé des bactéries semblables chez douze d'entre eux.

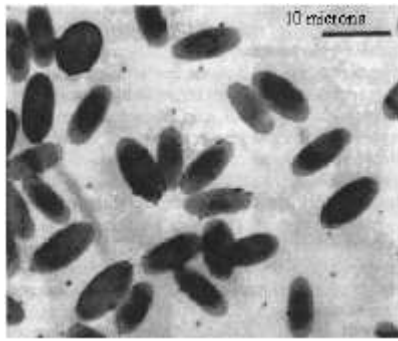


Figure 1 : observation au microscope optique et au microscope électronique à transmission de « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* » ; d'après [Mc Laughlin et al, 1990]

Cette bactérie, de par sa morphologie et ses étapes de maturation, leur a rappelé fortement *Eperythrozoon suis*, mais ils n'ont pas donné de nom à l'espèce qu'ils venaient de découvrir [Mc Laughlin et al., 1990].

L'année suivante, Mc Laughlin aidé d'une autre équipe a soumis le sérum de lamas infectés à un test d'inhibition de l'hémagglutination utilisant comme antigène des hématies porcines massivement infectées par *Eperythrozoon suis*. Ils ont obtenu un résultat positif, ce qui suggérait que cette bactérie nouvellement découverte pouvait appartenir au genre *Eperythrozoon*. On sait que les espèces du genre *Eperythrozoon* possèdent une spécificité d'hôte et qu'aucune réaction croisée naturelle n'a été décrite ; il est donc très probable que ce micro-organisme observé chez le lama soit une espèce inconnue auparavant, et spécifique du lama. Après avoir constaté que de nombreux lamas infectés avaient été en contact avec des chats de ferme, Mc Laughlin et son équipe ont essayé de transmettre ces micro-organismes à des chats, afin de s'assurer qu'il ne s'agisse pas de l'espèce *Haemobartonella felis*. Cette transmission a échoué comme la transmission au porc et au mouton : il ne s'agissait donc pas des espèces *Eperythrozoon suis* et *Eperythrozoon ovis* [McLaughlin et al, 1991].

B. Les modifications de la taxonomie des hémoplasmes

1. Etat de la classification jusqu'en 2001

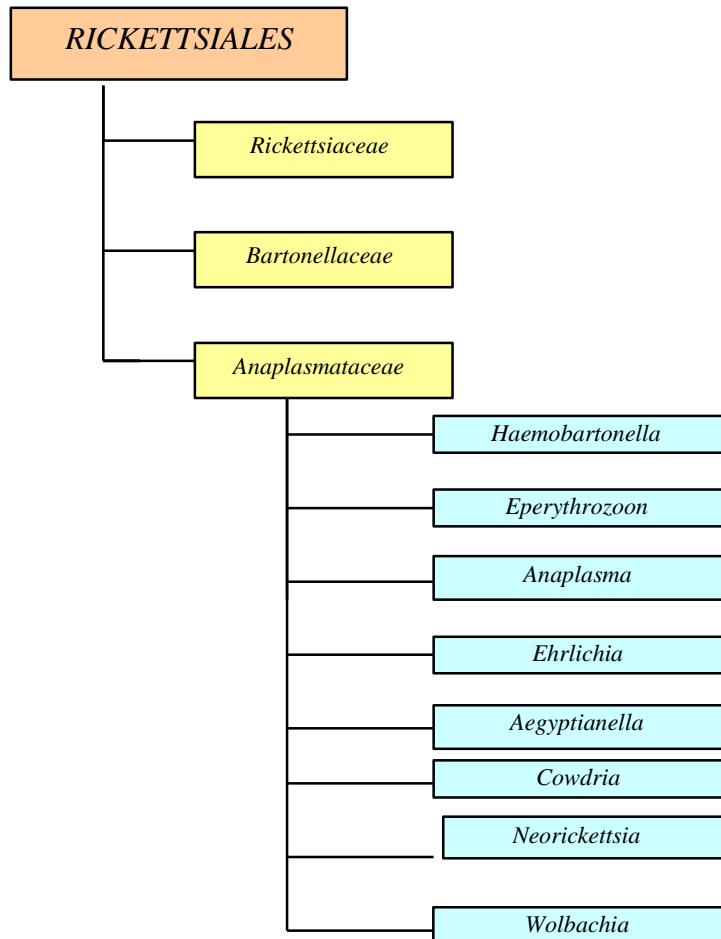


Figure 2 : position dans la classification du genre *Eperythrozoon*, en 2001 ; d'après [Moulder, 1974]

Avant 2001, les hémoplasmes étaient regroupés dans le genre *Eperythrozoon*, au sein de la famille des *Anaplasmataceae*, dans l'ordre des *Rickettsiales* (figure 2) [Messick, 2004] [Euzéby, 2005].

a) Caractéristiques des *Rickettsiales* que l'on peut retrouver chez les espèces du genre *Eperythrozoon*

Les *Rickettsiales* et les membres du genre *Eperythrozoon* partagent les caractéristiques suivantes :

- leur polymorphisme ainsi que leur petite taille,
- le mode de vie « parasitaire » [Euzeby, 2005].

b) Caractéristiques des *Anaplasmataceae* que l'on peut retrouver chez les espèces du genre *Eperythrozoon*

Les *Anaplasmataceae* et les espèces du genre *Eperythrozoon* ont en commun :

- le fait qu'on les trouve chez les vertébrés, à la surface des hématies ou bien libres dans le plasma
- leur pléomorphisme (avec une fréquence des formes en coques et bâtonnets, isolés, en chaînes ou en amas), leur petite taille, l'absence d'organes de mobilité,
- le fait qu'ils ne soient pas cultivables,
- leur reproduction par fission binaire,
- leur transmission par les arthropodes [Moulder, 1974] [Kreier et Gothe, 1976].

c) Comment les genres *Eperythrozoon* et *Haemobartonella* étaient-ils différenciés ?

Les genres *Eperythrozoon* et *Haemobartonella* sont très proches par la morphologie des espèces qui y sont incluses : elles sont de petite taille, pléomorphes (en bâtonnets, coques, anneaux...), et on ne peut pas les différencier par la seule observation au microscope optique [Scott et Woldehiwet, 1993]. De plus, elles infectent les hématies de nombreuses espèces de Vertébrés, à la surface desquelles on les retrouve seules ou en chaînes [Euzeby, 2005]. Les principales différences reposent sur la morphologie et la distribution des micro-organismes et sont présentées dans le tableau I.

Il faut noter que la différence entre les genres *Eperythrozoon* et *Haemobartonella* était considérée comme arbitraire par certains auteurs. En effet, elle reposait sur l'identité de l'hôte (*Haemobartonella* pour les carnivores domestiques, *Eperythrozoon* pour les ruminants et le porc), ce qui ne constitue pas un critère très rigoureux [Euzeby, 2005].

Tableau I : principales différences entre les espèces du genre *Eperythrozoon* et celles du genre *Haemobartonella*, d'après [Kreier et Gothe, 1976] et [Euzeby, 2005]

	MORPHOLOGIE (coloration au Giemsa)	DISTRIBUTION
<i>Haemobartonella</i>	Fréquemment en longues chaînes de coques ou de bâtonnets Rarement en anneaux	Rarement libres dans le plasma Lié de façon très étroite à l'hématie
<i>Eperythrozoon</i>	Fréquemment en anneaux ou en disques, isolés ou en chaînes	Plus souvent observés libres dans le plasma Liaison plus lâche entre la bactérie et le globule rouge

2. Les découvertes qui ont motivé l'inclusion des espèces du genre *Eperythrozoon* dans le genre *Mycoplasma*

a) L'absence de paroi

En 1965, Tanaka et ses collaborateurs remarquent qu' *Haemobartonella muris* et *Eperythrozoon coccoides* sont dépourvus de paroi et qu'il est difficile de les différencier morphologiquement de *Mycoplasma pulmonis* par observation au microscope électronique. Plus tard la même observation est effectuée chez *Eperythrozoon wenyonii*, *Eperythrozoon ovis* ainsi qu' *Haemobartonella felis* [Neimark et al, 2001].

b) Des divergences entre les caractéristiques des autres membres de la famille des *Anaplasmataceae* et celles des espèces du genre *Eperythrozoon*

Contrairement aux autres membres de la famille des *Anaplasmataceae*, les espèces du genre *Eperythrozoon* sont localisées à l'extérieur des hématies [Kreier et Gothe, 1976].

c) Des études phylogénétiques ont permis de rapprocher les espèces du genre *Eperythrozoon* des mycoplasmes

En 1997, la relation entre des espèces d'hémoplasmes du porc, de la souris et du chat et le genre *Mycoplasma* a été établie grâce à une étude effectuée par Rikihisa et son équipe. Ils ont déterminé la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de deux souches d'*Eperythrozoon suis*, d'une souche d'*Haemobartonella muris* et de quatre souches d'*Haemobartonella felis*. Grâce à une analyse phylogénétique, ils ont conclu que ces espèces sont plus proches du genre *Mycoplasma* (79 à 83% d'homologie) que du genre *Anaplasma* (72 à 75% d'homologie) [Rikihisa et al, 1997]

La même année, Neimark et Kocan [1997], en utilisant la même méthode, en arrivent à la même conclusion pour l'espèce *Eperythrozoon wenyonii*.

c1. En 2001, *Eperythrozoon wenyonii* prend le statut de « Candidatus *Mycoplasma wenyonii* »

En 2001, Neimark et ses collaborateurs ont confronté la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S d'*Eperythrozoon wenyonii* à celles de plusieurs espèces appartenant aux genres *Mycoplasma*, *Spiroplasma*, *Anaeroplasma* et *Asteroleplasma* ; le « groupe externe » (outgroup) utilisé est *Asteroleplasma anaerobium*. Ils parviennent ensuite à construire un arbre phylogénétique (figure 3) [Neimark et al, 2001].

Les espèces des genres *Haemobartonella* et *Eperythrozoon* se trouvent au sein d'une même branche phylogénétique, elle-même placée au sein du genre *Mycoplasma*, et plus précisément du groupe « pneumoniae ». Neimark propose alors que la taxonomie des espèces appartenant à *Haemobartonella* et *Eperythrozoon* soit modifiée afin de refléter cette relation avec les mycoplasmes, en les incluant à l'intérieur du genre *Mycoplasma*.

Pour bien marquer leur singularité vis-à-vis des mycoplasmes plus « classiques » qui concernent principalement les tractus respiratoire et urogénital en touchant souvent les articulations, ces « nouveaux mycoplasmes » sont qualifiés de mycoplasmes hémotropes, d'hémomycoplasmes, ou encore d'hémoplasmes.

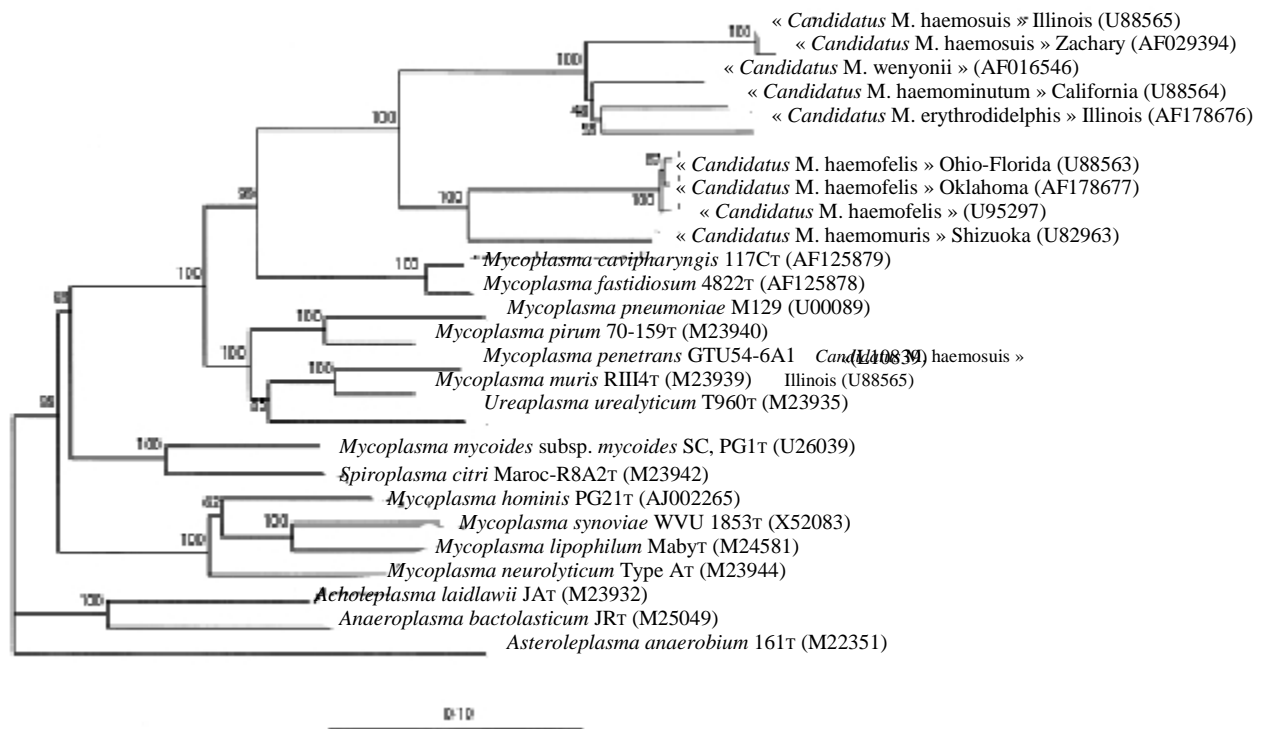


Figure 3 : Arbre phylogénétique, établi suite à l'étude du gène codant pour l'ARNr 16S, et montrant la relation phylogénétique entre *Eperythrozoon wenyonii* et certaines espèces du genre *Mycoplasma*, obtenu en 2001 par Neimark et ses collaborateurs ; d'après [Neimark et al, 2001]

La longueur de la barre 0-10 = 1 substitution pour 10 nucléotides.

Neimark propose alors le statut « Candidatus » pour l'espèce *Eperythrozoon wenyonii*, qui devient alors « *Candidatus Mycoplasma wenyonii* » [Neimark et al, 2001].

Le statut « Candidatus » est une catégorie à part, destinée à recenser les bactéries nouvellement découvertes qui sont non cultivables ou cultivables mais pas de façon stable. Comme il est particulièrement difficile de les étudier de façon précise, les informations relatives à ces organismes (séquences génomiques utilisables pour une étude phylogénétique, structure, métabolisme, reproduction) sont insuffisantes pour qu'ils soient décrits selon les règles du Code de Nomenclature. Ainsi, lorsqu' *Eperythrozoon wenyonii* devient « *Candidatus Mycoplasma wenyonii* », cette espèce perd sa place dans la nomenclature : elle ne fait plus partie du genre *Eperythrozoon*, mais elle n'est pas non plus officiellement un mycoplasme. Le statut « Candidatus » n'est donc qu'un statut provisoire [Murray et Stackebrandt, 1995].

c2. En 2002, *Eperythrozoon wenyonii* rejoint officiellement le genre *Mycoplasma* et prend le nom de *Mycoplasma wenyonii*

Le statut « Candidatus » ayant été déclaré inadéquat par les commissions de nomenclature, Neimark et son équipe publient un nouvel article dans lequel ils proposent qu'*Eperythrozoon wenyonii* soit désormais dénommé *Mycoplasma wenyonii* [Neimark et al, 2002].

c3. En 2002, on établit la relation phylogénétique entre la bactérie découverte à la surface des hématies de lama et les mycoplasmes

Le 16 mai 2002, Messick et ses collaborateurs publient un article présentant les résultats d'une étude visant à déterminer la position dans la taxonomie de la bactérie qui avait été mise en évidence chez le lama en 1990. Ils ont amplifié le gène codant pour l'ARNr 16S en utilisant les amorces spécifiques d'*Eperythrozoon suis* ; ils ont ensuite séquencé ce gène et l'ont comparé à la séquence du même gène chez d'autres espèces.

Ils ont obtenu 89,9 à 91,7% d'homologie entre l'hémoplasme du lama et le « cluster haemosuis », c'est-à-dire les espèces *Mycoplasma wenyonii*, *Mycoplasma suis* et « *Candidatus Mycoplasma haemominutum* ».

Ils proposent alors la dénomination de « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* » pour l'hémoplasme découvert chez le lama [Messick et al, 2002].

Cette espèce ne peut être directement incluse dans le genre *Mycoplasma* car elle est nouvelle et n'a pas été complètement décrite [Messick, 2004].

Ils émettent l'hypothèse d'un ancêtre commun entre les hémoplasmes d'une part et *Mycoplasma cavipharyngis* et *Mycoplasma fastidiosum* d'autre part [Messick et al, 2002].

c4. En 2004, *Eperythrozoon ovis* devient *Mycoplasma ovis*

Neimark et al. [2004], comme pour les espèces précédemment reclassées parmi les mycoplasmes, ont effectué une étude phylogénétique basée sur la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S. (figure 4)

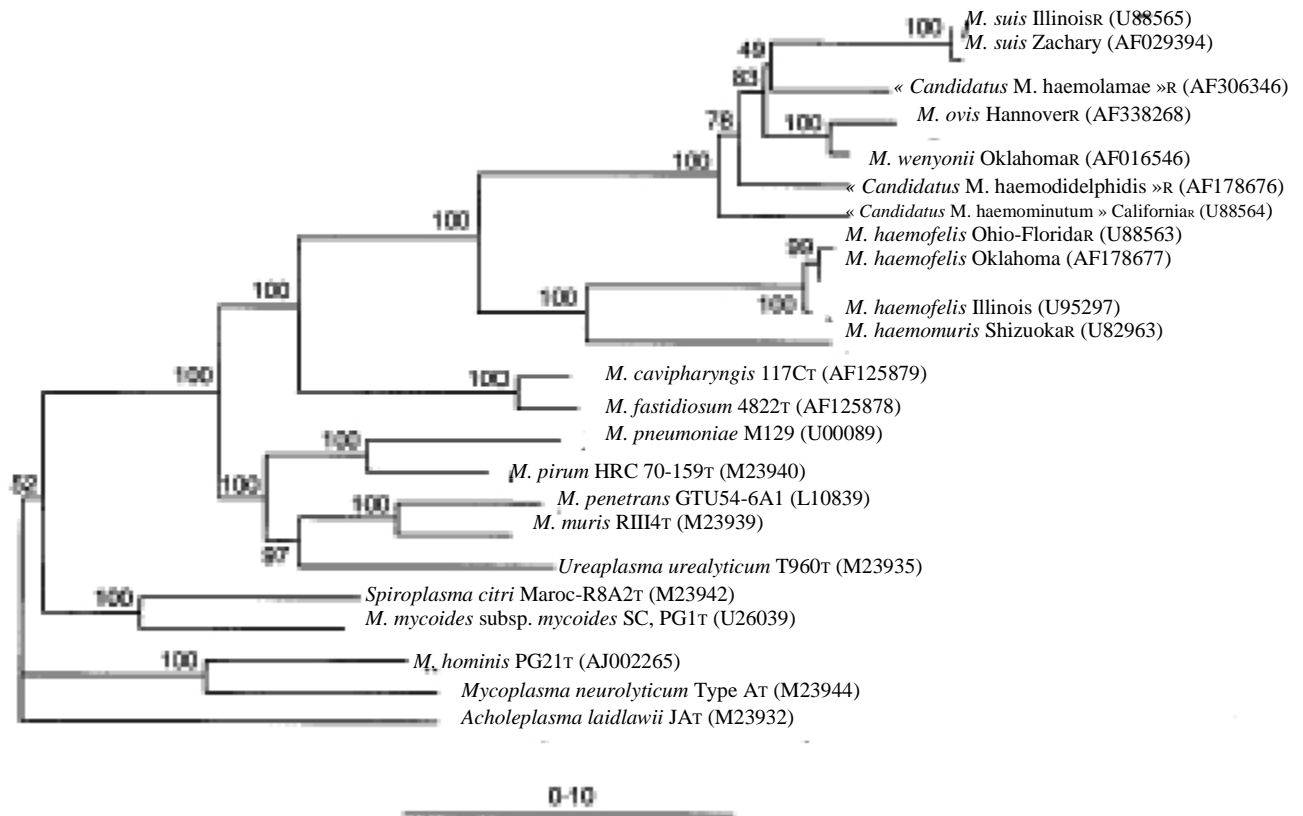


Figure 4 : Arbre phylogénétique établi par Neimark, Hoff et Ganter en 2004 suite à l'étude du gène codant pour l'ARNr 16S, en vue de montrer la relation entre *Mycoplasma ovis*, les autres hémoplasmes, et les autres mycoplasmes ; d'après [Neimark et al, 2004].

R = souches de référence

« groupe externe » (outgroup) : *Acholeplasma laidlawii*

Ils ont pu remarquer une analogie très importante entre *Eperythrozoon ovis* et les autres hémoplasmes, et à ce titre, ont affirmé qu'on pouvait considérer *Eperythrozoon ovis* comme un membre du genre *Mycoplasma*, et plus précisément comme un hémoplasme appartenant également au groupe pneumoniae. Les auteurs ont alors proposé que l'espèce *Eperythrozoon ovis* soit rebaptisée *Mycoplasma ovis*.

Il faut noter que l'espèce *Mycoplasma wenyonii* est celle qui est la plus proche de *Mycoplasma ovis*, avec 95% d'homologie [Neimark et al, 2004].

c5. En 2005, la quasi-totalité des espèces du genre *Eperythrozoon* sont transférées vers le genre *Mycoplasma*

Une nouvelle étude phylogénétique de Neimark et al [2005] révèle encore que l'espèce *Eperythrozoon coccoides* devrait également être un *Mycoplasma*. Or, cette espèce est l'espèce-

type du genre *Eperythrozoon*, et sa place dans la nomenclature a été validée avant celle des mycoplasmes. Ainsi, selon les règles 15, 17, 44 et 51b du Code International de Nomenclature des Bactéries, toutes les espèces du genre *Mycoplasma* devraient être renommées sous le genre *Eperythrozoon*. Mais pour des raisons pratiques (énormément d'espèces de *Mycoplasma*), il a été décidé que l'espèce *Eperythrozoon coccoides* ne soit pas transférée au sein du genre *Mycoplasma*. Ce genre de situation est prévu dans l'annexe 8 : « dans le cas où le strict respect des règles de nomenclature entraînerait une confusion ou ne résulterait pas en une stabilité nomenclaturale, des exceptions aux règles pourraient être demandées à la commission judiciaire de l'ICSP ».

De plus, les changements de nomenclature ayant été validés pour les autres hémoplasmes sont encore contestés. Plusieurs arguments sont avancés :

- la petite taille des séquences sur lesquelles ont été réalisées les analyses phylogénétiques : la séquence des gènes codant pour l'ARNr 16S n'est qu'un moyen d'identification rapide d'une bactérie, mais ne constitue pas la preuve d'une nécessité du changement de la taxonomie
- le pourcentage d'homologie n'est que de 77,3% entre *Mycoplasma wenyonii* et *Mycoplasma fastidiosum*, et de 76% entre *Mycoplasma wenyonii* et les mycoplasmes du groupe *pneumoniae* (étude de Neimark et Kocan). De même, il n'y a que 80,2% d'homologie entre *Eperythrozoon coccoides* et *Mycoplasma fastidiosum*
- il est difficile d'envisager que le génotype soit très proche entre hémoplasmes et mycoplasmes, lorsqu'on constate les nombreuses différences entre ces deux groupes : différence d'habitat, de mode de transmission (même si celui-ci n'est pas connu chez tous les hémoplasmes qui appartenaient avant au genre *Eperythrozoon*), de la culture *in vitro*.

Pour ces raisons, Uilenberg, Thiaucourt et Jongejan publient en 2004 et en 2006 deux articles dans lesquels ils contestent l'intégration des espèces appartenant aux genres *Haemobartonella* et *Eperythrozoon* dans le genre *Mycoplasma*. Ils sont d'accord pour que les genres *Haemobartonella* et *Eperythrozoon* sortent de l'ordre des *Rickettsiales* étant donné qu'il a été prouvé qu'ils sont plus proches des mycoplasmes. Mais selon eux, les études phylogénétiques ne permettent pas de valider ces changements de taxonomie ; de plus, ils précisent qu'il ne faut pas compter que sur le génotype : il faut s'intéresser aussi au phénotype, pour prendre en compte l'expression de la partie du génome qui n'a pas été étudiée (c'est ce que permet la taxonomie polyphasique).

Ils considèrent que les genres *Haemobartonella* et *Eperythrozoon* sont synonymes, et qu'ils devraient être classés dans la famille des *Mycoplasmataceae* (ordre des *Mycoplasmatales*, classe des *Mollicutes*), mais en restant un genre distinct de *Mycoplasma* [Uilenberg et al, 2004] et [Uilenberg et al, 2006].

C. Situation plus précise des hémoplasmes au sein du genre *Mycoplasma*

Le genre *Mycoplasma* regroupe plus de 110 espèces bactériennes (120 espèces en 2006, dont plus de 25 isolées chez bovins, ovins et caprins [Citti, 2006]), aussi bien pathogènes que commensales, au niveau des muqueuses des animaux vertébrés, mais également chez les insectes et les plantes [Neimark et al, 2004].

Il faut donc être capable de situer plus précisément les hémoplasmes au sein de ce genre.

1. *Mycoplasma*, un genre très diversifié contenant de très nombreuses espèces

Tout d'abord, il faut différencier les termes « mycoplasmes » et « espèce appartenant au genre *Mycoplasma* ».

On appelle « mycoplasme » toute espèce faisant partie de la classe des *Mollicutes*, qui comporte huit genres : *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Mesoplasma* et *Entomoplasma* [Messick, 2004] (tableau II).

Avant les années 60, on prenait les mycoplasmes pour des virus, car ces organismes parviennent à traverser des filtres bactériens avec des pores de 0,45 µm de diamètre. On a ensuite imaginé qu'il s'agissait de formes bactériennes L, c'est-à-dire dépourvues de paroi de façon transitoire.

Aujourd'hui, les mycoplasmes sont considérés comme des organismes simples ; leur faible pourcentage en cytosine et guanine les rapproche des genres *Clostridium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*. Des études phylogénétiques basées sur l'étude du gène codant pour l'ARNr 16S permettent d'émettre l'hypothèse d'un ancêtre commun aux *Mollicutes* et à certaines bactéries à

Gram+ (du genre *Clostridium*) ; à partir de cet ancêtre commun, les mycoplasmes auraient évolué de façon « régressive » avec une perte de matériel génétique [Quinn et Markey, 2003].

La majorité des espèces de mycoplasmes se trouve à l'intérieur de la famille des *Mycoplasmataceae*, qui est l'unique famille composant l'ordre des *Mycoplasmatales* [Citti, 2006].

Tableau II : taxonomie des *Mollicutes* et hôtes, d'après [Citti, 2006]

	Famille	Genre	Hôtes
<i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	- <i>Mycoplasma</i> - <i>Ureaplasma</i>	Homme Animaux
<i>Entomoplasmatales</i>	- <i>Entomoplasmataceae</i> - <i>Spiroplasmataceae</i>	- <i>Entomoplasma</i> - <i>Mesoplasma</i> - <i>Spiroplasma</i>	Insectes Plantes
<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i>	Homme, Animaux, Insectes, Plantes
<i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	- <i>Anaeroplasma</i> - <i>Asteroplasma</i>	Ruminants (dans le rumen)

Certaines caractéristiques des mycoplasmes sont retrouvées chez les hémoplasmes :

- isolement et identification difficiles [Citti, 2006],
- très petite taille (les mycoplasmes sont les plus petits organismes parmi les procaryotes à vie libre, c'est-à-dire capables de s'auto-reproduire en milieu acellulaire),
- absence de paroi bactérienne, liée à une incapacité à synthétiser les peptidoglycanes ; mais ils sont entourés d'une membrane cellulaire flexible, composée de trois couches ; ils ne prennent donc pas la coloration de Gram,
- très pléomorphes,
- la plupart des espèces sont spécifiques d'un hôte donné,
- pas de reproduction dans le milieu extérieur,
- sensibilité à la chaleur, à la dessiccation, aux détergents et désinfectants.

Avant, pour l'identification des espèces de mycoplasmes, on se basait sur l'identité de l'hôte, la morphologie des colonies, la nécessité d'apporter du cholestérol et la réactivité biochimique.

Mais depuis quelques années on dispose de tests basés sur la reconnaissance d'anticorps spécifiques, et on est capable d'identifier de façon de plus en plus fiable les espèces de mycoplasmes ; il existe également des tests d'inhibition de croissance, des tests d'immunofluorescence et des tests d'agglutination rapide [Quinn et Markey, 2003].

2. Arbre phylogénétique actuel

Au sein des hémoplasmes, on peut distinguer deux clusters (figure 5) :

- le cluster haemosuis , composé des espèces *Mycoplasma wenyonii*, *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma ovis*, « *Candidatus Mycoplasma haemominutum* », « *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* », « *Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis* » et « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* »
- le cluster haemofelis , avec les espèces *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemocanis* et *Mycoplasma haemomuris*

Ce qui les distingue, c'est une délétion d'environ 10 pb au niveau du gène codant pour l'ARNr 16S, dans un segment qui correspond aux positions 453-481 dans la séquence du gène de l'ARNr 16S chez *Escherichia coli*. Cette délétion est présente pour le cluster haemofelis et absente pour le cluster haemosuis [Messick et al, 2002] [Euzéby, 2005].

Là encore, on notera que cette phylogénie n'est basée que sur l'étude d'un seul gène.

Lors d'une étude réalisée en 2002, les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S ont été comparées entre les espèces *Mycoplasma ovis*, *Mycoplasma wenyonii*, « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* », *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemomuris*, *Mycoplasma suis*, « *Candidatus Mycoplasma haemoparvum* », « *Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis* », « *Candidatus Mycoplasma haemominutum* », *Mycoplasma fastidiosum* et *Mycoplasma cavipharyngis*. Les résultats indiquent que toutes ces espèces d'hémoplasmes sont phylogénétiquement apparentées au groupe de *Mycoplasma pneumoniae* [Messick et al, 2002].

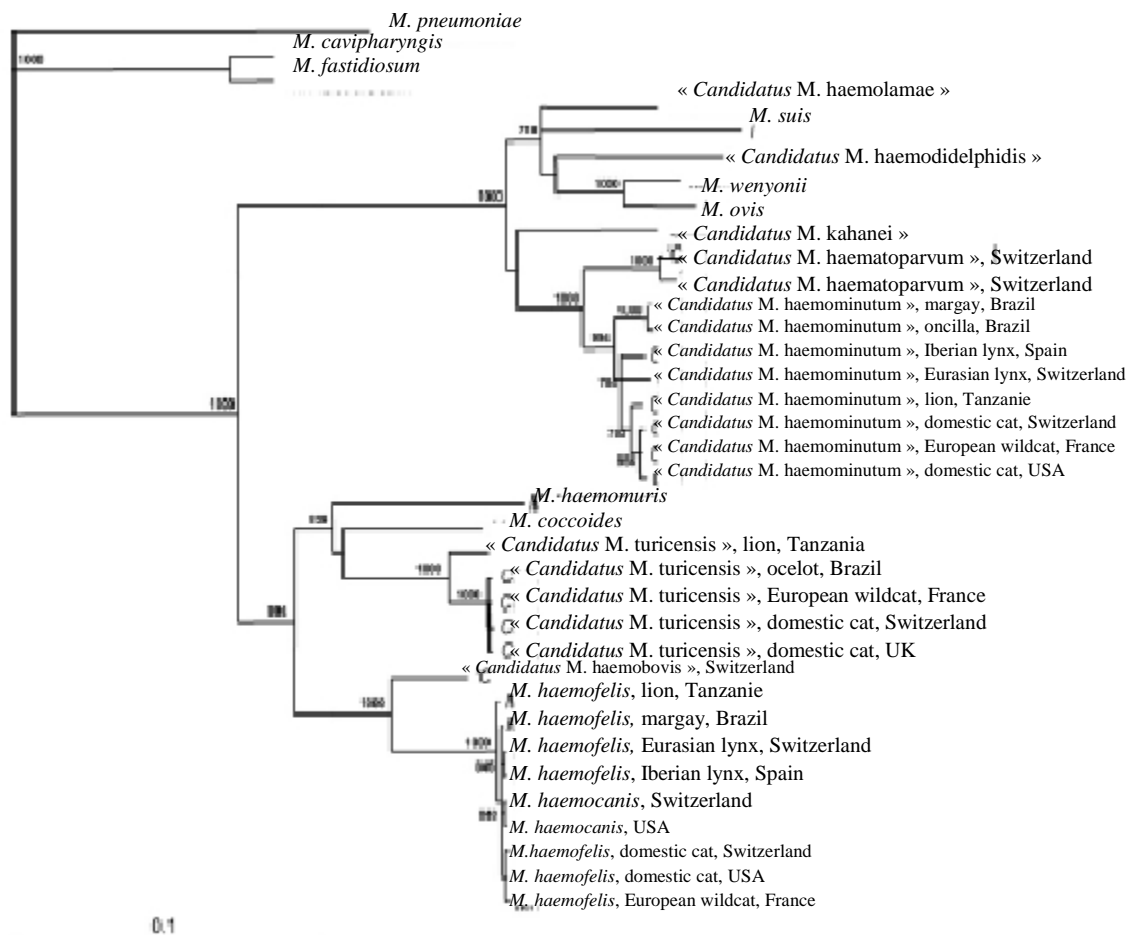


Figure 5 : arbre montrant les relations phylogénétiques entre les différentes espèces d'hémoplasmes, ainsi qu'entre les hémoplasmes et le genre *Mycoplasma*, établi suite à l'étude du gène codant pour l'ARNr 16S ; d'après [Willi et al, 2007]

D. Identification de nouvelles espèces d'hémoplasmes

1. « *Candidatus Mycoplasma haemotarandirangiferis* », l'hémoplasme du renne

La découverte de cette espèce a été le résultat d'une étude effectuée en 2002 et 2003 aux Etats-Unis [Stoffregen et al, 2006]. Parmi un troupeau de 19 rennes (*Rangifer tarandus*), 10 animaux présentaient des signes cliniques tels que léthargie, émaciation, tachypnée, pâleur des muqueuses, temps de remplissage capillaire augmenté, oedèmes. L'anémie était modérée à sévère, et la réalisation de frottis sanguins a permis de mettre en évidence une morphologie très

altérée des hématies, avec à leur surface des structures ressemblant à des organismes, amphophiles à basophiles.

Ces structures possédaient différentes formes : des points isolés, ou bien en chaînes, en clusters, des bacilles isolés, en chaînes, des anneaux isolés, en chaînes, en clusters ; cela ressemblait beaucoup aux descriptions qui sont faites des hémoplasmes.

L'étude avait pour objectif de déterminer si ces structures observées à la surface des érythrocytes étaient des organismes, des altérations de la surface de l'hématie ou encore des artefacts.

Plusieurs PCR sur sang total et sur sérum ont été effectuées, et elles ont donné un résultat :

- négatif avec des amorces non-spécifiques (ciblant de l'ARNr16S de procaryote), ou les amorces amplifiant une portion du gène codant pour l'ARNr 16S du groupe *Ehrlichia/Anaplasma/Cowdria* et les amorces spécifiques de *M.suis*
- positif avec les amorces spécifiques de *M.haemofelis/M.haemocanis* pour 4 des animaux testés
- positif chez 9 animaux par nested PCR utilisant les amorces spécifiques de *M.haemofelis/M.haemocanis*, puis des amorces spécifiques du germe trouvé chez le renne.

L'analyse phylogénétique des produits obtenus par nested PCR montre que deux espèces au moins auraient pu infecter le renne. La plupart des séquences sont proches de *Mycoplasma wenyonii* et *Mycoplasma ovis*, mais pour un animal de l'étude la séquence était plus proche de celles de *Mycoplasma haemocanis* et *Mycoplasma haemofelis*. L'hypothèse de l'existence d'au moins 2 sous-groupes a donc été émise.

Le nom proposé pour cette espèce est « *Candidatus Mycoplasma haemotarandirangiferis* » [Stoffregen et al, 2006].

2. « *Candidatus Mycoplasma haemobos* »

Cette espèce a été mise en évidence au cours de l'année 2008, au Japon. On a prélevé du sang chez 78 bovins, et on a réalisé une PCR suivie d'un séquençage, ce qui a permis de mettre en évidence une infection par *Mycoplasma wenyonii* chez 17 d'entre eux, et une infection par une espèce jusque là non identifiée pour 13 animaux ; une infection par les 2 espèces a été observée pour 4 bovins.

En comparant la séquence génétique de cette nouvelle espèce à celles appartenant aux hémoplasmes déjà connus, on s'est rendu compte que les espèces qui possèdent le plus d'homologie avec ce germe sont *Mycoplasma haemocanis* et *Mycoplasma haemofelis*.

Pour l'instant, la pathogénicité de cet hémoplasme n'a pas encore été explorée [Tagawa et al, 2008].

II. Etude bactériologique des hémoplasmes des ruminants

Les hémoplasmes ne sont pas cultivables, que ce soit sur milieu inerte (même sur un milieu adapté aux autres mycoplasmes), sur culture cellulaire, ou encore sur œuf embryonné [Euzeby, 2005].

Etant donné qu'on ne peut obtenir ces organismes qu'à partir d'un animal infecté, et qu'on ne peut pas les faire se multiplier *in vitro*, jusqu'à présent peu d'études ont été réalisées ; actuellement on ne dispose que de quelques éléments concernant leur génome et les bases de leur pouvoir pathogène. En revanche, leur morphologie et leur localisation ont été largement décrites, surtout pour l'espèce *Mycoplasma ovis*. Dans cette partie, nous présenterons les caractéristiques de *Mycoplasma ovis*, en précisant, lorsqu'elles existent, les particularités relatives aux autres espèces d'hémoplasmes chez les ruminants.

A. Morphologie (en microscopie optique)

1. Colorations utilisables

La coloration de May-Grünwald-Giemsa (ou coloration de Giemsa) est la plus fréquemment décrite. Les hémoplasmes colorés apparaissent en bleu à bleu-violet, se démarquant ainsi de l'hématie qui est moins colorée (figure 6) [Scott et Woldehiwet, 1993]. Le protocole de cette coloration est présenté en annexe 1.

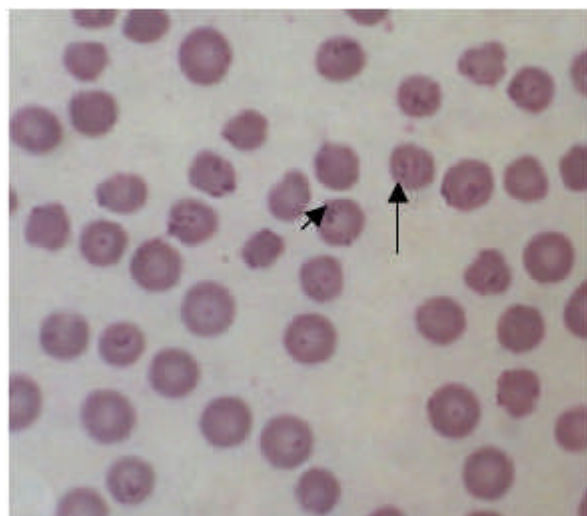


Figure 6 : observation au microscope optique d'hématies infectées par *Mycoplasma ovis* ; d'après [Hawkey et Dennett, 1989]

On peut aussi utiliser la coloration à l'acridine orange, suivie d'une observation au microscope optique sous lumière UV ; les hémoplasmes forment alors des taches orange verdâtre à la surface des hématies (figure 7) [Scott et Woldehiwet, 1993].

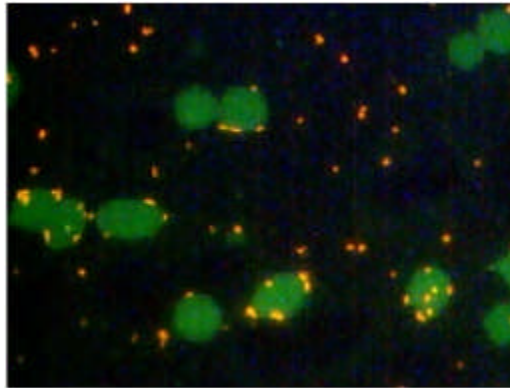


Figure 7 : coloration de *Mycoplasma suis* à l'acridine orange ; d'après [Hoelzle, 2008]

La coloration de Giemsa est aussi utilisable pour l'identification de *Mycoplasma ovis* ; selon certains auteurs, elle serait la plus adaptée pour observer les hémoplasmes car elle les colore en rouge carmin, alors que l'érythrocyte apparaît rosé [Gretillat et Gevrey, 1983].

2. Forme

Ce sont des organismes très polymorphes : on peut les observer sous forme de coques (parfois ovoïdes), de bacilles ou bâtonnets, de disques, d'anneaux fermés ou semi-fermés, de virgules. Des descriptions de *Mycoplasma ovis* en forme de raquette de tennis ou d'haltère ont également été effectuées [Glenn Songer et Post, 2005] [Scott et Woldehiwet, 1993].

Lorsqu'ils ont au préalable été séparés des érythrocytes, les hémoplasmes ovins peuvent être ronds ou ovales [Lang et al, 1986].

Au microscope à contraste de phase, les hémoplasmes apparaissent sous la forme de sphères sombres.

[Scott et Woldehiwet, 1993]

Au début, certains auteurs affirmaient avoir vu des formes en triangle ou en tige ; mais on ne peut être sûr qu'il s'agissait bien de la bactérie, car elle est difficile à différencier des artéfacts de coloration et de séchage [Scott, 2003].

3. Taille des organismes

Ce sont des organismes de petite taille :

- les coques mesurent entre 0,1 et 2 μm de diamètre [Euzeby, 2005]. Pour Glenn Songer et Post [2005], ce serait plutôt 0,3 à 0,7 μm ; pour Kreier et Gothe [1976], on trouve 0,5 à 1 μm ; dans Kreier et Ristic [1963] 0,3 à 0,4 μm , et pour Mc Kee et al [1973] 0,3 à 0,4 μm .
- les bacilles mesurent 0,2 à 0,5 μm sur 0,9 à 1,5 μm [Euzeby, 2005].

Lang et al. [1986], après avoir réalisé la séparation entre *Mycoplasma ovis* et les hématies, ont mesuré la taille de l'hémoplasme ovin et ont obtenu 1 μm de diamètre. Par comparaison, chez les bovins, les hématies mesurent entre 4,5 et 5 μm de diamètre. [Doxey, 1977]. Chez les ovins, le diamètre moyen d'un érythrocyte est généralement compris entre 4 et 5 μm . [Greenwood, 1977].

B. Structure (en microscopie électronique)

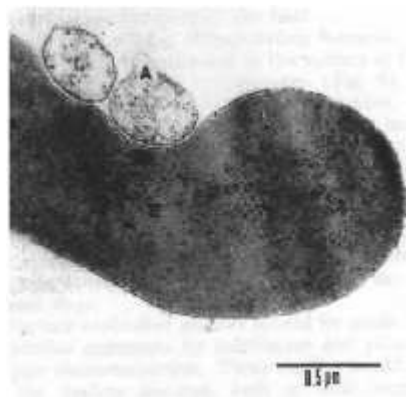


Figure 8 : observation au microscope électronique à transmission d'une hématie infectée par *Mycoplasma ovis* ; d'après [Mc Kee et al, 1973]

L'observation au microscope électronique permet tout d'abord de confirmer l'absence de paroi, comme on peut le voir sur la figure 8 [Mc Kee et al, 1973].

■ **Au microscope électronique à transmission**, dans la membrane qui entoure la bactérie on peut différencier trois couches [Mc Kee et al, 1973].

On n'observe pas de noyau ni d'organites intra-cytoplasmiques, mais on voit des amas de matériel opaque aux électrons, qui ressemblent à des ribosomes, ainsi qu'une substance transparente aux électrons qui contient de fins filaments [Scott et Woldehiwet, 1993] (figure 9)

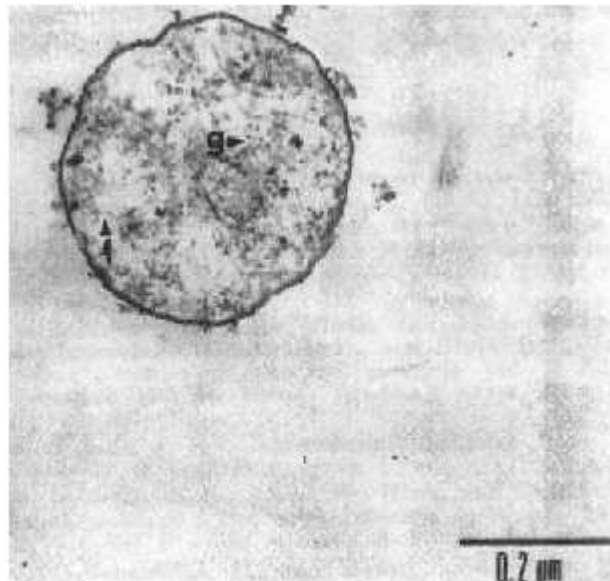


Figure 9 : observation au microscope électronique à transmission d'une forme en coque de *Mycoplasma ovis*, détachée d'une hématie ; d'après [Mc Kee et al, 1973]

La flèche f indique un filament, et la flèche g du matériel granuleux

■ **Au microscope électronique à balayage :**

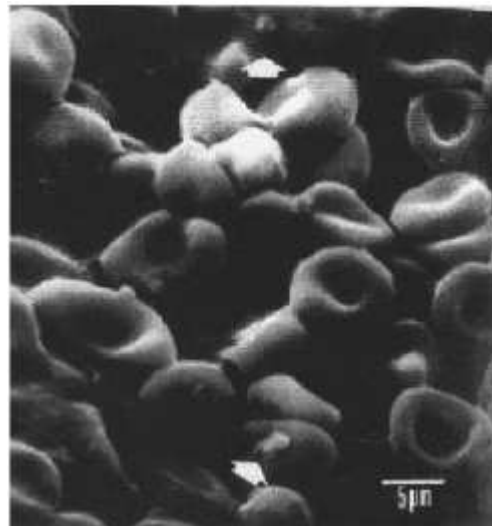
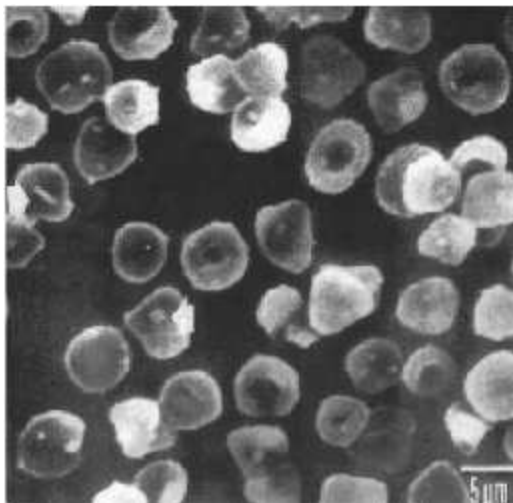


Figure 10 : observation au microscope électronique à balayage d'hématies infectées par *Mycoplasma ovis* ; d'après [Mc Kee et al, 1973] et [Neimark et al, 2004]

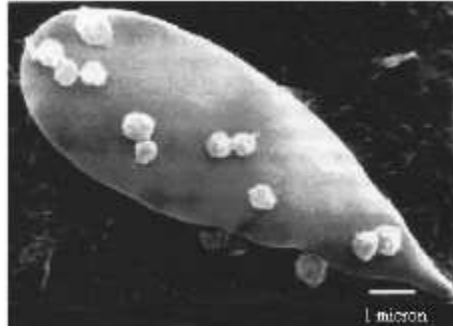


Figure 11 : vue au microscope électronique à balayage de « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* » ; d'après [Reagan et al, 1990]

Les hémoplasmes forment des petites sphères, semblant parfois irrégulières et qui n'ont pas toutes la même taille (figures 10 et 11). On constate que les plus petites coques sont accolées aux plus grandes ; en fait cela correspond à l'image d'une bactérie qui est en train de se reproduire par fission binaire [Scott et Woldehiwet, 1993].

De la même façon, *Mycoplasma ovis* et *Mycoplasma wenyonii* forment parfois des agrégats qui peuvent être plus ou moins compacts, et dont le contour est sinueux [Gretillat et Gevrey, 1983].

■ **Au microscope électronique à contraste de phase** *Mycoplasma wenyonii* apparaît sous forme d'organismes oblongs ou circulaires, aplatis, qui contiennent 1 ou 2 éléments en relief dans leur cytoplasme (figure 12) [Kreier et Ristic, 1963].

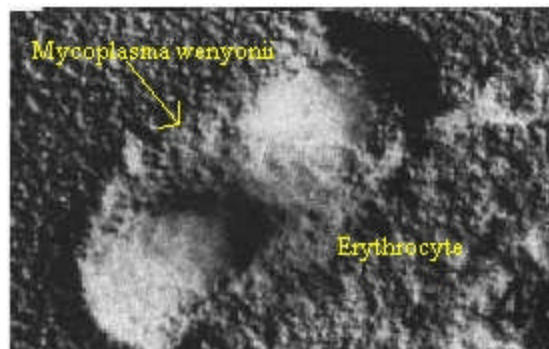


Figure 12 : observation au microscope électronique à contraste de phase d'une forme en bacille de *Mycoplasma wenyonii* contenant 2 éléments en relief, à la surface d'une hématie (objectif x12500) ; d'après [Kreier et Ristic, 1963]

C. Position et répartition au niveau des hématies

On peut trouver les hémoplasmes à la surface de l'hématie, c'est ce qu'on appelle une position épiérythrocytaire [Euzeby, 2005]. Mais on peut aussi en trouver à l'état libre dans le plasma, et c'est souvent le cas pour *Mycoplasma wenyonii* [Smith et al, 1990].

Lorsque l'hémoplasme est situé à la périphérie du globule rouge, parfois on observe une dépression de la membrane de l'hématie à l'endroit où se trouve l'hémoplasme [Scott et Woldehiwet, 1993].

En observant *Mycoplasma ovis* au microscope électronique à transmission :

- parfois les membranes de l'hémoplasme et de l'érythrocyte ne sont pas en contact, et aucune structure reliant les deux n'est observée,
- parfois la bactérie est étroitement accolée à la surface du globule rouge (figure 13),



Figure 13 : observation au microscope électronique à transmission d'un *Mycoplasma ovis* étroitement accolé à la membrane érythrocytaire (flèche noire) ; d'après [Mc Kee et al, 1973]

- parfois on voit l'hémoplasme tellement enveloppé dans la membrane érythrocytaire qu'on se demande s'il ne s'agit pas d'une endocytose [Gulland et al, 1987b].

Le nombre de bactéries autour d'une hématie est variable : pour *Mycoplasma wenyonii* parfois on n'a qu'un hémoplasme, alors que dans certains cas toute la surface de l'hématie est recouverte (figure 14), ce qui peut représenter 20 à 60 hémoplasmes (qui se superposent parfois). Mais dans la plupart des cas, on a des agrégats de 3 à 12 bactéries [Neitz, 1940].

Les hémoplasmes peuvent être isolés ou en chaînes [Glenn Songer et Post, 2005]. On peut noter que selon le degré de bactériémie, la proportion des différentes formes varie. Ainsi, lorsqu'un animal est légèrement ou modérément infecté, on verra plutôt des coques isolées ; en revanche, si la bactériémie est sévère, on pourra voir des amas irréguliers et des chaînes [Scott et Woldehiwet, 1993].

On parle de bactériémie légère si 29% ou moins des hématies sont infectées ; la bactériémie sera dite modérée si on a entre 30 et 59% des hématies qui portent des hémoplasmes à leur surface. Au-delà, on qualifiera la bactériémie de sévère [Gulland et al, 1987b].

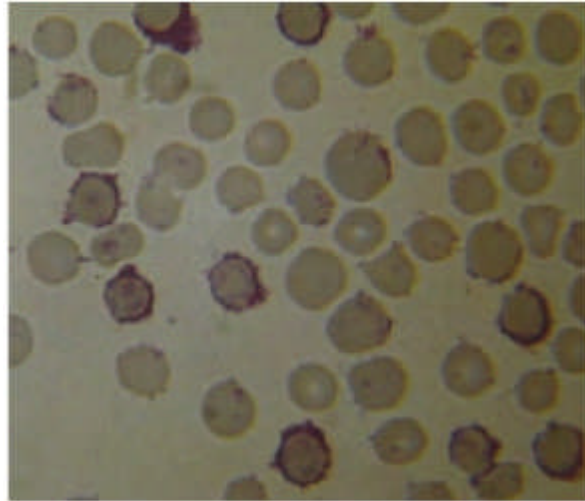


Figure 14 : observation au microscope optique d'hématies infectées par *Mycoplasma wenyonii* ; d'après [Hawkey et Dennett, 1989]

On notera le nombre important d'hémoplasmes autour d'un même érythrocyte.

Il faut noter que l'aspect des hémoplasmes varie selon l'intensité de la bactériémie :

- plus il y a de bactéries dans le sang, plus on observe de formes libres dans le plasma et d'amas irréguliers, et moins on voit de sphères et de bâtonnets,
- lorsqu'on a une bactériémie modérée ou sévère, on observe plutôt des formes en chaîne [Gulland et al, 1987b].

Enfin, la proportion d'érythrocytes infectés et le nombre moyen de *Mycoplasma ovis* autour d'un érythrocyte varie selon la zone du frottis que l'on est en train d'observer [Gretillat et Gevrey, 1983].

D. Génome

Le génome des hémoplasmes a été peu étudié jusqu'à présent ; on sait uniquement que le matériel génétique se trouve sous forme d'ADN simple brin circulaire et qu'il contient un très faible nombre de bases : 745 kpb pour *Mycoplasma suis*, 1245 kpb pour *Mycoplasma haemofelis* [Messick, 2004].

La petite taille du génome est une caractéristique que l'on retrouve chez les mycoplasmes en général. En effet, chez les mycoplasmes le génome contient entre 580 (pour *Mycoplasma genitalium*) et 1358 kpb (*Mycoplasma penetrans*). Cela représente environ le quart de la taille du génome d'*Escherichia coli* [Citti, 2006].

Ces organismes auraient évolué à partir de bactéries Gram+ en perdant une partie de l'information génétique, ce qui expliquerait leur incapacité à synthétiser une paroi et à réaliser certaines chaînes métaboliques. En revanche, les gènes responsables de la réplication, de la transcription et de la traduction ont été conservés [Messick, 2004].

On ne sait pas encore si les hémoplasmes sont capables d'échanger certains gènes par conjugaison entre deux souches d'une même espèce, ou entre espèces compatibles partageant une niche commune (ce phénomène est décrit chez d'autres mycoplasmes). Chez les mycoplasmes, cela facilite l'apparition de souches plus pathogènes, plus virulentes, la colonisation d'un nouvel hôte, ou encore une antibiorésistance. Cela aurait également pour conséquence une difficulté pour identifier les espèces de mycoplasmes (surtout pour ceux touchant les petits ruminants) ; si on découvrait qu'il existe de tels échanges génétiques pour les hémoplasmes (bien que ces organismes semblent présenter une spécificité d'hôte), cela pourrait de la même façon rendre plus difficile l'identification des espèces [Citti, 2006].

E. Multiplication et mode de vie

La multiplication s'effectue par fission binaire, à la surface des érythrocytes ; pour certains auteurs, il s'agirait plutôt d'un bourgeonnement [Scott, 2003].

Comme les autres mycoplasmes, les hémoplasmes sont rarement libres dans le milieu extérieur ; lorsqu'on les observe, ils sont associés à une cellule-hôte. L'explication de ce phénomène réside dans le fait que la capacité de stockage de leur génome étant réduite au strict minimum, ces bactéries « parasitent » les cellules car elles ont besoin de leur apport en nutriments [Citti, 2006].

F. Sensibilité-Résistance

Ces critères sont à relier directement avec l'absence de paroi bactérienne :

- les hémoplasmes sont résistants aux antibiotiques qui agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne, comme les bêta-lactamines,
- les hémoplasmes sont sensibles à la lyse par choc osmotique, ou par des solvants organiques, des détergents et des antiseptiques courants [Citti, 2006].

G. Pouvoir pathogène

Etant donnée l'apparente simplicité de ces organismes, il est légitime de se demander par quels mécanismes ils parviennent à « parasiter » leurs cellules-« hôtes », ainsi qu'à se maintenir et se multiplier dans un organisme animal protégé par son système immunitaire [Citti, 2006].

Actuellement, même si on n'a pas pu réellement les mettre en évidence, des modifications de la membrane érythrocytaire font suspecter la présence de facteurs d'adhésion.

1. Facteurs d'adhésion

On sait que certains mycoplasmes sont pourvus d'un appendice, dédié à l'adhésion à leur cellule-hôte. Celui-ci est composé d'adhésines et de protéines accessoires et porte des organites en forme de pointe. Concernant les hémoplasmes, on n'a pas encore pu mettre en évidence l'existence de tels appendices, mais certains auteurs suspectent que ces organismes possèdent des gènes proches de ceux codant pour ces appendices ; en parallèle de l'évolution de ces bactéries, leurs gènes auraient pu acquérir la capacité de parasiter la surface externe des hématies [Messick, 2004].

a) arguments en faveur de l'existence de facteurs d'adhésion

Lorsqu'on observe au microscope électronique une hématie infectée, on constate que sa surface est modifiée. En effet, certains auteurs ont pu mettre en évidence une indentation de la membrane plasmique de l'hématie, à l'endroit où s'étaient fixé des hémoplasmes (figure 15) ; cela a été décrit en 1965 par Tanaka et ses collaborateurs, en 1985 par Adams et ses

collaborateurs, et en 1997 par Neimark et Kocan d'une part, et par Rikihisa et son équipe d'autre part [Neimark et al, 2001].



Figure 15 : observation au microscope électronique à transmission d'indentations de la membrane d'un érythrocyte infecté par *Mycoplasma ovis* ; d'après [Mc Kee et al, 1973]

D'autres, comme Peter et ses collaborateurs en 1974, puis Zachary et Basgal en 1985, ont même réussi à observer de fines fibrilles reliant la bactérie à l'érythrocyte (figure 16) [Neimark et al, 2001].



Figure 16 : observation au microscope électronique à transmission de fines fibrilles entre *Mycoplasma ovis* et une hématie ; d'après [Neimark et al, 2004]

Glenn Songer et Post [2005] parlent plutôt de dépression ou de repliement pour qualifier la forme que prend la membrane de l'hématie à l'endroit où l'hémoplasme est présent.

Par ailleurs, Gulland et son équipe ont observé des protrusions à la surface des hématies de mouton infectés par *Mycoplasma ovis* (figure 17). Ces protrusions ne contiennent pas

d'inclusions, ce sont de simples déformations de la membrane. Les auteurs considèrent ces altérations de la membrane érythrocytaire comme une trace de la fixation de l'hémoplasme.



Figure 17 : protrusions membranaires d'une hématie infectée par *Mycoplasma ovis*, observées au microscope électronique à balayage ; d'après [Gulland et al, 1987b]

Les 3 protrusions se trouvent en périphérie ; au centre de l'image on observe 4 hémoplasmes.

Ces protrusions peuvent être observées, mais de façon beaucoup plus rare, chez des ovins qui ne sont pas infectés par *Mycoplasma ovis* ; ces déformations sont retrouvées lors de la phase précoce de la lyse naturelle des hématies, selon Gruenberg et ses collaborateurs.

Pour Gulland, la localisation de ces protrusions correspondrait aux sites où les hémoplasmes étaient présents [Gulland et al, 1987b].

Selon Kreier et Gothe [1976], au microscope électronique à transmission, on peut observer une substance transparente aux électrons (figure 18) entre l'hémoplasme et le globule rouge (la membrane de ce dernier restant apparemment intacte).

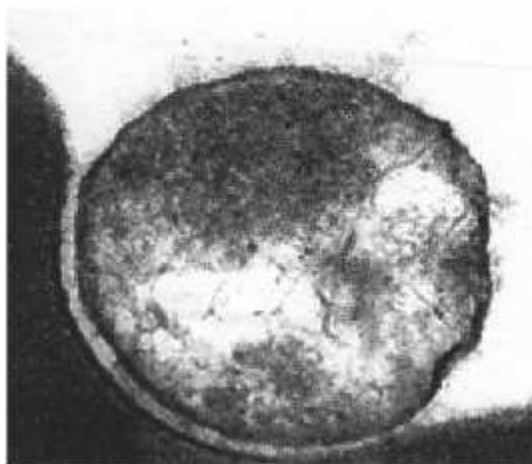


Figure 18 : mise en évidence au microscope électronique d'une substance transparente aux électrons entre *Mycoplasma haemofelis* et la membrane de l'érythrocyte ; d'après [Messick, 2004]

b) identification de gènes codant pour des adhésines

On suspecte l'existence de gènes codant pour des adhésines chez les espèces *Mycoplasma suis* et *Mycoplasma haemofelis* [Hoelzle, 2008] : en séquençant le génome de *Mycoplasma haemofelis*, on a trouvé une séquence très proche de celle du gène MgPa, codant pour une adhésine chez *Mycoplasma genitalium* [Messick, 2004]. Mais rien n'a été prouvé concernant les hémoplasmes qui infectent les ruminants.

2. Altération de la membrane érythrocytaire

On a la preuve, du moins concernant *Mycoplasma wenyonii*, que la membrane de l'hématie est altérée, grâce à une expérience avec des lectines.

Principe : Si l'on met en présence des globules rouges provenant d'un bovin sain avec des lectines issues du germe de blé, du ricin, du soja et de l'arachide, on obtient une hémagglutination.

Des hématies dont la membrane plasmique est altérée demandent une concentration moindre en lectines pour s'agglutiner. En effet, soit les sites récepteurs des lectines ne sont plus protégés par l'acide sialique, soit la structure des récepteurs est modifiée. Ce phénomène peut être mis en évidence notamment lorsqu'on traite des hématies à la neuraminidase, une enzyme qui altère leur membrane : on constate que les hématies nécessitent une concentration plus faible en lectines pour s'agglutiner.

L'hématagglutination des érythrocytes provenant de bovins infectés par *Mycoplasma wenyonii* nécessite une plus petite concentration de lectines de soja et d'arachide que des hématies de bovins sains. Il y a donc sans doute un phénomène d'altération de la membrane érythrocytaire lors d'une infection à hémoplasmes chez les bovins [Goff et al, 1986].

Selon Smith *et al.* [1990], *Mycoplasma wenyonii* n'entraînerait pas de façon directe la destruction des hématies ; pour affirmer cela, ils se basent sur le fait qu'au microscope électronique on n'observe pas d'altération visible de la membrane là où est fixé l'hémoplasme, et qu'il n'y a pas non plus de sphérocytose décrite.

H. Pouvoir antigénique

Mycoplasma ovis est fortement antigénique [Scott, 2003]. La réponse anticorps est rapide et durable. Il existe des réactions sérologiques croisées entre les espèces d'hémoplasmes, mais également entre les hémoplasmes et d'autres bactéries à tropisme sanguin.

1. Cinétique de la réponse anticorps

Les anticorps dirigés contre *Mycoplasma ovis* sont détectables 7 jours après l'infection par immunofluorescence indirecte [Brun-Hansen et al, 1997a]. Ces anticorps persistent probablement durant des années, puisqu'on a réussi à obtenir une réaction positive à l'IFI chez un ovin qui avait été infecté expérimentalement dix ans et demi plus tôt [Daddow, 1981]. Donc une sérologie positive serait un bon reflet de l'infection à *M. ovis*, mais n'indique pas forcément une infection récente [Brun-Hansen et al, 1997a].

La production d'anticorps atteint son maximum vers 5-6 semaines après l'infection, puis elle diminue. Chez des chèvres, on a pu détecter des anticorps anti-*Mycoplasma ovis* au moins 15 mois post-inoculation, grâce à la méthode d'immunofluorescence indirecte [Scott et Woldehiwet, 1993].

Les anticorps anti-*Mycoplasma ovis* qui fixent le complément persistent au maximum 6 mois, lors d'une infection naturelle [Mason et al, 1989a].

2. Réactions croisées entre les différentes espèces d'hémoplasmes

Lorsqu'on met en présence *Mycoplasma ovis* avec des anticorps anti-*Mycoplasma wenyonii* marqués avec une molécule fluorescente, la réaction est aussi marquée que lorsqu'il s'agit d'anticorps anti-*Mycoplasma ovis*. La réciproque est également observée. On peut donc dire qu'il existe des réactions sérologiques croisées entre les hémoplasmes bovin et ovin [Kreier et Ristic, 1963].

D'autres chercheurs n'ont pas mis en évidence de réaction croisée en utilisant un test d'hémagglutination passive. Ils précisent que dans leur étude ils se sont assurés que les animaux n'étaient pas infectés par *Anaplasma marginale* (veaux placés à l'abri des arthropodes peu après

leur naissance, et suivi par des frottis sanguins), contrairement à celle de Kreier et Ristic [Finerty et al, 1969].

On n'a pas mis en évidence de réaction sérologique croisée entre *Mycoplasma wenyonii* et « *Eperythrozoon tuomii* » [Scott et Woldehiwet, 1993].

3. Réactions croisées avec d'autres bactéries à tropisme sanguin

Réactions croisées entre *Mycoplasma wenyonii* et *Babesia bovis* :

L'hémoplasme bovin est considéré comme un « contaminant » dans le diagnostic sérologique (par immunofluorescence indirecte) de la babésiose bovine [Jorgensen et Waldron, 1994].

Réactions croisées entre les hémoplasmes et les anaplasmes :

En 1963, une étude de Kreier et Ristic montre qu'il existe des réactions croisées entre les hémoplasmes et certains anaplasmes ; ceci a été mis en évidence par un test de fixation du complément. (tableau III)

Tableau III : Réactions sérologiques croisées entre les hémoplasmes et les anaplasmes, d'après [Kreier et Ristic, 1963]

		ANTICORPS				
		<i>M.ovis</i>	<i>M.wenyonii</i>	<i>A.ovis</i>	<i>A.marginale</i>	<i>T.cervi</i>
ANTIGENES	<i>Mycoplasma ovis</i>	++++	++++	+	+	-
	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	++++	++++	+	+	-
	<i>Anaplasma ovis</i>	+	+	++++	++++	-
	<i>Anaplasma marginale</i>	+	+	++++	++++	-
	<i>Theileria cervi</i>	-	-	-	-	++++

Si on met en présence des anticorps anti-*M.ovis* ou anti-*M.wenyonii* avec des antigènes d'*A. ovis* ou d'*A.marginale*, on obtient une réaction positive (objectivée par la fluorescence des

anticorps marqués), mais la réaction est beaucoup moins intense que si on utilise les antigènes des hémoplasmes.

De même, les anticorps des espèces d'anaplasmes testées réagissent positivement en présence des antigènes de *M.ovis* et *M.wenyonii*, mais la réaction est moins marquée qu'avec les antigènes d'*A.ovis* et *A.marginale*.

Ces réactions croisées étant de faible intensité, les auteurs avancent que la relation antigénique est faible entre ces organismes.

Ils ont également effectué le test de fixation du complément destiné à dépister l'anaplasmose (utilisant *Anaplasma* comme antigène), de façon répétée au cours de l'infection :

- chez 2 moutons infectés par *Mycoplasma ovis* : réponse positive pour les 2 animaux,
- chez 3 veaux infectés par *Mycoplasma wenyonii* : pour l'un d'entre eux, on a observé une réponse positive (pour les 2 autres, on a eu des résultats négatifs ou douteux).

Ces résultats semblent confirmer ceux qui ont été obtenus avec la technique d'immunofluorescence ; cela pourrait justifier l'existence de faux positifs lors du dépistage de l'anaplasmose par fixation du complément.

Cependant, il faut rester prudent dans l'interprétation car étant donné la mise en évidence, parfois difficile, des hémoplasmes et la clinique souvent silencieuse, on ne peut pas exclure que les échantillons initiaux contenant l'antigène d'*Anaplasma* ne soient pas contaminés par un hémoplasme [Kreier et Ristic, 1963].

I. Pouvoir immunogène

1. Mise en évidence

Daddow en 1977 (puis ensuite Gulland et coll. en 1987) a montré que chez certains moutons infectés par *Mycoplasma ovis* il y avait une production d'anticorps importante (titre élevé), permettant l'élimination rapide de l'hémoplasme (avec pour conséquence une anémie sévère). Mais d'autres moutons ont une réaction anticorps peu marquée, avec une bactériémie qui dure et des épisodes d'anémie (peu importante) récurrents, tous les 2 à 4 mois [Kabay et al, 1991].

2. Transfert des anticorps de la mère au jeune

Selon Scott [2003], si un agneau naît d'une brebis ayant été infectée dans le passé par l'hémoplasme mais ayant réussi à l'éliminer, cet agneau sera protégé de façon passive grâce à l'ingestion du colostrum. Mais si la mère est porteuse chronique, cela signifie que son immunité est mauvaise, et donc on peut voir apparaître une bactériémie chez le jeune.

Toutefois, Daddow [1982] a réussi à mettre en évidence une protection des agneaux Mérinos issus de brebis porteuses chroniques de *Mycoplasma ovis* :

- 12 agneaux nés de mères porteuses chroniques et allaités par celles-ci n'ont pas été infectés par *Mycoplasma ovis* suite à une inoculation de sang infecté (même après avoir été splénectomisés), mais par la suite 7 d'entre eux ont présenté une bactériémie lorsqu'on les a infectés expérimentalement.

- 3 agneaux issus de brebis porteuses chroniques mais ayant été séparés de leur mère dès la naissance et nourris avec du colostrum, puis du lait, provenant de brebis non infectées ont déclaré une bactériémie 7 à 9 jours suite à l'inoculation de sang infecté par *Mycoplasma ovis*.

- enfin, chez 5 agneaux nés de brebis non infectées on a mis en évidence une bactériémie dès 4 à 7 jours après l'inoculation [Daddow, 1982].

Cela a pu être confirmé en 2003 : en inoculant 10ml de sang hépariné riche en *Mycoplasma ovis* à des agneaux nés de brebis porteuses chroniques, soit les agneaux guérissent définitivement, soit l'infection se déclare après le sevrage. Pour certains, cette phase clinique se résout en 5 à 20 jours après le sevrage [Scott, 2003].

Chez les agneaux non infectés nés de mères capables de produire suffisamment d'anticorps anti-*M.ovis*, et buvant le lait de la mère, les titres en anticorps anti-*M.ovis* deviennent nuls au bout de 3 semaines [Nicholls et Veale, 1986a].

J. Pathogénie

L'infection par les hémoplasmes entraîne une anémie périphérique par hémolyse, mais tous les auteurs ne s'accordent pas quant à la localisation de cette hémolyse. En effet, pour certains (par exemple Sheriff) elle serait extravasculaire, car les moutons infectés par *Mycoplasma ovis* répondent positivement au test de Coombs, présentent des microsphérocytes et

dans la plupart des cas ne montrent pas d'hémoglobinurie. Alors que d'autres auteurs (comme Overäs et Sutton), s'appuyant sur le fait qu'on trouve des dépôts d'hémosidérine dans les tubules du rein, et des corps de Heinz dans les hématies (preuve d'une dénaturation de l'hémoglobine), et que, cliniquement, on observe un ictère et une hémoglobinurie, pensent plutôt que l'hémolyse est intravasculaire [Scott et Woldehiwet, 1993] [Montes et al, 1994].

Parfois, *Mycoplasma ovis* peut entraîner une anémie centrale à un stade précoce de l'infection : en effet, l'hémoplasme ovin est capable d'infecter les réticulocytes ainsi que les érythrocytes de la moelle osseuse et des centres hématopoïétiques [Ichijos-Hosokawa, 1982] (in [Marie, 1986])

1. Diminution de la quantité de glutathion intraérythrocytaire

Le glutathion est nécessaire pour préserver la structure et la fonction des hématies. Lors d'une infection par un hémoplasme, la quantité de glutathion diminue à l'intérieur de l'hématie, ce qui favorise la dénaturation moléculaire au niveau de la membrane érythrocytaire, et donc la lyse érythrocytaire [Scott et Woldehiwet, 1993].

2. Réactions immunes

L'animal infecté par un hémoplasme va fabriquer des anticorps protecteurs ; selon la qualité de cette immunité, l'animal sera guéri et immunisé à vie, ou bien porteur chronique et sujet à des rechutes.

a) argument : les réponses à l'infection varient selon les individus

En 1987, Gulland, Doxey et Scott ont publié une étude portant sur la capacité d'hôtes splénectomisés à éliminer *Mycoplasma ovis*. Tous les animaux de l'étude étaient sains, mais issus de troupeaux contenant des animaux infectés en phase de bactériémie ; ils ont été infectés expérimentalement, par inoculation de sang infecté par *Mycoplasma ovis*. Pour évaluer leur statut infectieux, on a effectué des frottis sanguins colorés au Giemsa jusqu'à ce qu'on ne puisse plus déceler d'hémoplasmes par cette méthode. On a également mesuré l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, et on a effectué la numération sanguine.

Pour le premier lot, composé de 19 animaux (17 moutons et 2 chèvres), seulement 8 des moutons ont révélé une bactériémie ; parmi ces animaux, 6 individus ont réussi à contrôler leur infection jusqu'à supprimer la bactériémie en moins de 90j.

Dans un deuxième lot, composé de 9 ovins tous issus du 1^{er} lot (2 chez qui on n'avait pas observé de bactériémie, et 7 autres après leur phase de bactériémie), une immunodépression a été induite par l'injection de béta-méthasone à une dose de 1mg/kg, pendant 5 jours. Cela a permis de mettre en évidence une nouvelle bactériémie chez 3 des 7 animaux qui avaient déjà connu une première phase de bactériémie.

Ces résultats prouvent que pour une même source d'agent pathogène (car les animaux ont été inoculés avec du sang provenant d'un même individu), la réponse de l'hôte est variable. Pour expliquer les bactériémies prolongées chez certains des animaux, les auteurs avancent l'hypothèse d'une mauvaise immunité de l'hôte, ou d'une atteinte du système immunitaire due à l'hémoplasme (ce dernier point a été observé avec *M.suis*).

Enfin, même chez les animaux ayant réussi à juguler l'infection, un stress (induit ici par l'injection de corticoïdes), peut entraîner une résurgence de l'infection [Gulland et al, 1987a].

Si on immunise de façon passive un individu en injectant un sérum hyperimmun, on observe une bactériémie moins marquée chez cet animal que chez ceux qui n'ont pas reçu l'injection [Scott et Woldehiwet, 1993].

Lors d'une infection par *Mycoplasma ovis*, après le pic de production d'anticorps, on peut observer 2 situations :

- chez les animaux sans infection intercurrente et nourris correctement : élimination de l'hémoplasme, et immunisation à vie, avec transmission des anticorps aux agneaux pour les femelles gestantes,
- sinon, la bactériémie persiste, augmente et devient incontrôlable. Parfois on peut assister à une apparente disparition de l'hémoplasme sur les frottis sanguins, mais dans les 2 à 3 jours suivants on observe à nouveau leur présence, avec jusqu'à 40% des hématies concernées [Scott, 2003].

b) le rôle de la rate

En 1989, Hung et Lloyd ont observé une activité phagocytaire très élevée sur des coupes de rate provenant d'un agneau infecté expérimentalement (figure 19), 19 jours après l'inoculation. Ils ont observé une érythrophagocytose dans les cellules réticulées de la rate, et

également des pseudopodes provenant de ces cellules réticulées, entourant les hémoplasmes, qui donc pourraient éliminer les bactéries de la surface érythrocytaire sans pour autant altérer l'hématie [Hung et Lloyd, 1989].

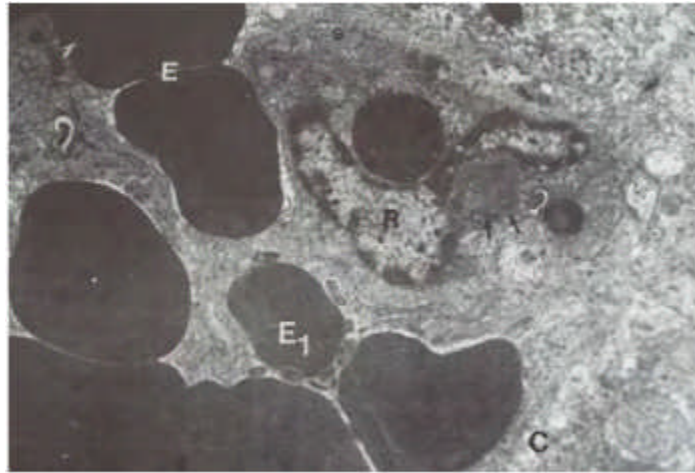


Figure 19 : observation d'une coupe de rate expérimentalement ; d'après [Hung et Lloyd, 1989] provenant d'un ovin infecté

E : hématies saines
E1 : hématies infectées
R : cellule réticulée

s : sinus
c : parenchyme

2. Hémostase extra-vasculaire

Ce sont les cellules endothéliales des capillaires sanguins dans la rate et les nœuds lymphatiques, ainsi que les macrophages, qui éliminent les hémoplasmes de la surface érythrocytaire. Puis les globules rouges débarrassés de leurs bactéries retournent dans la circulation générale. Mais certaines hématies saines peuvent être phagocytées dans la rate et les nœuds lymphatiques par le biais d'agglutinines froides, d'immunoglobulines M, qui se fixent sur certaines molécules de la surface érythrocytaire.

La membrane érythrocytaire peut aussi être altérée, soit par une action directe de l'hémoplasme sur la membrane, soit indirectement par le complexe antigénique membranaire bactérie/globule rouge : le globule rouge est alors fragilisé et détruit car l'eau entre par osmolarité [Kabay et al, 1991] [Whithear et Browning, 2004] [Glenn Songer et Post, 2005].

Dans les années 70, on a supposé que l'anémie lors d'hémoplasmose possédait une composante auto-immune, puisque chez les animaux infectés, on avait retrouvé des hématies et des débris d'hématies à l'intérieur des phagocytes. La membrane érythrocytaire étant altérée par

Mycoplasma wenyonii, on a supposé que des antigènes inconnus devenaient exposés au système immunitaire, et pouvaient entraîner la synthèse d'auto-anticorps [Kreier et Gothe, 1976].

Par la suite, de rares auteurs ont émis à nouveau cette hypothèse de l'existence de réactions auto-immunes :

- selon Smith et al. [1990], l'hémoplasme bovin se fixerait sur les cellules endothéliales, ce qui les altérerait et entraînerait une vascularite auto-immune. Mais la vascularite pourrait aussi être causée par les complexes immuns et l'activation du complément suite à la destruction érythrocytaire,
- selon Messick [2004], il existerait un phénomène d'Arthus, puisqu'on avait mis en évidence une formation d'immuns-complexes entre *Mycoplasma wenyonii* et des IgG, chez un taureau infecté et présentant un œdème scrotal. Ces dépôts d'immuns-complexes provoqueraient une activation du complément, et donc une thrombose d'où apparition d'une vascularite et d'œdèmes [Montes et al, 1994].

3. Cinétique de l'infection

La période d'incubation dure en général 1 à 4 semaines pour *Mycoplasma ovis* et 3 semaines en moyenne pour *Mycoplasma wenyonii*. Elle est d'autant plus longue que la dose infectante est faible [Scott, 2003] [Scott et Woldehiwet, 1993].

Dans les conditions expérimentales, cette durée a été estimée entre 2 et 11 jours (en moyenne 4 à 5 jours) pour *Mycoplasma ovis* [Overas, 1969].

L'hémoplasme entre d'abord dans les cellules de la moelle osseuse, où il se multiplie et envahit secondairement la circulation sanguine. La multiplication se poursuit à la surface des hématies ; pendant 5 à 10 jours, la bactériémie est massive. Les érythrocytes infectés (et également certains qui ne le sont pas) sont phagocytés par les cellules de la zone réticulée dans la rate, ainsi que par les cellules endothéliales des nœuds lymphatiques et des sinusoides hépatiques [Scott et Woldehiwet, 1993] [Radostits et al, 2007].

Lors d'une infection naturelle à *Mycoplasma ovis*, Overäs [1969] a estimé que la bactériémie pouvait durer 6 à 96 jours, et le plus fréquemment entre 32 et 70 jours. Dans les conditions expérimentales, la durée moyenne de la bactériémie est de 100 jours, les valeurs extrêmes observées étant 10 et 607 jours.

Le pic de bactériémie est atteint en 3 à 4 semaines lors d'une infection à *Mycoplasma ovis*; on peut observer jusqu'à 100% des hématies infectées (maximum 12 jours après la première mise en évidence d'une bactériémie en microscopie), et ce même dans le cas d'une infection subclinique [Overäs, 1969].

Chez les brebis porteuses asymptomatiques, donc dotées d'un système immunitaire efficace, on peut observer un phénomène de bactériémie auto-stérilisante : on observe un pic de bactériémie entre 10 et 20j après l'infection (avec parfois 100% des hématies qui sont infectées), puis elle diminue lentement jusqu'à devenir invisible [Scott, 2003].

III. Aspects cliniques et paracliniques

L'expression clinique peut aller d'un retard de croissance à la mort par anémie sévère, conséquence d'une hémolyse aiguë.

Dans la plupart des cas, la clinique est silencieuse lors d'une hémoplasmose, et les animaux peuvent rester porteurs pendant des années. Parfois, notamment chez les agneaux, on peut assister à des épisodes aigus, et ce sont ces épisodes qui vont révéler la présence de l'infection latente dans l'élevage.

Chez les ruminants, les hémoplasmes peuvent entraîner une anémie intravasculaire qui dure entre 5 jours et 2 semaines, et qui est parfois accompagnée d'hémoglobinurie.

Si les animaux survivent à un épisode aigu, leurs symptômes disparaissent en 1 à 3 mois, mais ils restent porteurs et ne sont donc pas à l'abri d'une réémergence de la bactériémie.

Il faut noter que les animaux infectés par un hémoplasme sont davantage sujets à développer des pathologies intercurrentes, ce qui vient compliquer le tableau clinique.

A. Tableau clinique

1. Chez les ovins

La période d'incubation est difficile à évaluer lors d'une infection naturelle, puisqu'on ne peut pas connaître le moment de l'infection, et qu'il existe des variations individuelles liées à l'âge, l'alimentation, le parasitisme, l'immunité, les infections concomitantes... De plus, un animal infecté peut devenir d'emblée porteur chronique [Messick, 2004].

Mycoplasma ovis envahit de façon massive le sang, les centres hématopoïétiques, les centres lymphopoïétiques et le système réticulo-endothélial. Suite à un stress ou une dépression du système immunitaire, on observera un tableau clinique protéiforme, car compliqué par d'autres pathologies [Gretillat et Bernard, 1987].

On distingue généralement trois formes cliniques.

a) la forme subaiguë

C'est la forme la plus fréquente. Elle concerne généralement les adultes, en bonne condition physique.

Le premier symptôme observé est l'**hyperthermie**, qui peut être intermittente et fluctuante ; ensuite, l'**anémie** apparaît [Overäs, 1969].

L'anémie constitue le symptôme le plus important de l'infection à *Mycoplasma ovis* ; elle peut être plus ou moins sévère mais, lorsqu'elle est isolée, elle ne constitue pas un motif d'appel pour l'éleveur. A long terme, cette anémie peut conduire à un retard de croissance, ou une perte de poids [Brun-Hansen et al, 1997b].

Cette anémie survient classiquement entre 5 et 8 jours après le moment où on commence à observer l'hémoplasme au microscope ; elle peut durer un mois, voire plus.

A l'hyperthermie et l'anémie peut se rajouter un syndrome fébrile (abattement, diminution de l'appétit, altération de l'état général, tachypnée).

Chez certains animaux on n'a pas d'ictère clinique, mais le sérum est plus jaunâtre que chez les individus sains [Gretillat et Gevrey, 1983]. Selon Overäs [1987], on rencontrerait une hémoglobinurie lors de l'infection par *Mycoplasma ovis* : sur 79 ovins infectés, que ce soit naturellement ou expérimentalement, on a retrouvé de l'hémoglobine dans l'urine de 23 individus, et pour 18 d'entre eux l'urine était foncée.

Le taux de mortalité reste faible [Gretillat et Gevrey, 1983].

b) la forme aiguë à suraiguë

Cette forme touche surtout les agneaux ; on l'appelle parfois « syndrome anémie-asthénie de l'agneau » [Gretillat et Gevrey, 1983]. Mais elle a également été décrite chez des brebis gestantes.

Cette forme clinique apparaît après un stress chez un animal porteur [Neitz et al, 1934].

b1. chez les agneaux

Elle provoque une **fièvre intermittente** (de l'ordre de 40-41°C [Gretillat et Gevrey, 1983]), un **abattement** avec **anorexie**, et une **anémie sévère accompagnée ou non d'ictère** [Neitz et al, 1934].

Quelques jours plus tard, des **symptômes respiratoires** apparaissent : dyspnée, polypnée. Ils sont dus à la stase sanguine qui entraîne une congestion pulmonaire, et ils peuvent aboutir à des crises de dyspnée avec anoxie, qui alternent avec des phases d'abattement intense. Il arrive que l'animal traverse des phases de rétablissement apparent [Gretillat et Gevrey, 1983] [Gretillat et Bernard, 1987] [Scott, 2003].

Les **nœuds lymphatiques poplités et axillaires** sont de **taille augmentée**, sans qu'on puisse mettre en évidence d'induration ou de douleur à la palpation. Selon certains auteurs, chez les agneaux atteints par cette forme, on observerait une forte réaction de tous les organes lymphopoiétiques, y compris le thymus et les amygdales. [Gretillat et Gevrey, 1983]

Parfois on peut observer une **diarrhée** avec une **polyurie** , qui aboutit généralement à la déshydratation de l'animal et à une fonte musculaire.

On peut aussi observer des troubles locomoteurs de type **ataxie** (on parle de train arrière « chevillé »), ainsi qu'une **tachycardie** , une **amygdalite** , une **trachéite** [Scott, 2003].

La croissance est fortement ralentie, et même parfois stoppée ; l'animal perd du poids, devient une non-valeur économique, et devient plus sensible aux infections et aux carences nutritionnelles [Scott et Woldehiwet, 1993].

Les animaux meurent en hypothermie [Gretillat et Gevrey, 1983]. Le **taux de mortalité** est élevé, **entre 2 et 6%**, et supérieur à celui des moutons adultes [Scott et Woldehiwet, 1993] [Scott, 2003].

Lorsque les agneaux qui meurent sont âgés de quelques semaines, on peut voir en plus de l'anémie des complications pulmonaires et hépatiques [Gretillat et Bernard, 1987].

Il faut noter que les symptômes sont plus intenses chez les agneaux qui n'ont jamais été exposés à l'infection [Kabay et al, 1991].

b2. chez les brebis gestantes

On observe des avortements, des mises-bas difficiles, avec des parts languissants, une mauvaise dilatation du col de l'utérus. De plus, l'infection à *Mycoplasma ovis* favorise les

troubles de la période du péri-partum, comme la toxémie de gestation par exemple [Gretillat et Gevrey, 1983].

c) la forme chronique

Les animaux infectés ont un état général altéré, des muqueuses pâles, ils peuvent présenter un amaigrissement pouvant aller jusqu'à la cachexie. Parfois, à ces signes s'ajoutent un œdème sous-glossien, une hyperthermie (39,5-40°C), une apathie, de la diarrhée [Neitz et al, 1934].

Dans certains cas, l'animal est apathique et anémié au début puis, quelques semaines plus tard, il présente un prurit intense au niveau des lombes et des flancs, suivi d'une chute de la laine; dans ces zones, la laine est coupée au ras de l'épiderme, qui est ischémié.

Parfois on observe une boiterie intermittente avec adénopathies poplitées et scapulaires [Gretillat et Gevrey, 1983].

Chez les brebis, on peut rencontrer de l'infertilité, par un retard ou un non-retour en chaleurs, ou une mortalité embryonnaire précoce; ces brebis peuvent aussi avorter tardivement [Gretillat et Bernard, 1987].

Les brebis porteuses sont souvent asymptomatiques; parfois, leur toison est fragile, déchirée, enduite de suint jaune. Celles qui mettent bas des agneaux morts-nés à terme meurent souvent de toxémie quelques jours après [Scott, 2003].

L'intensité des symptômes dépend de l'efficacité du système immunitaire de l'hôte; il arrive qu'un animal meure d'anémie sévère [Nicholls et Veale, 1986b], mais il est rare qu'une infection à *Mycoplasma ovis* entraîne à elle seule la mort d'un animal [Scott et Woldehiwet, 1993].

En revanche l'intensité des symptômes ne semble pas liée à l'intensité de la bactériémie [Gretillat et Gevrey, 1983].

Souvent, après la disparition de la première phase de bactériémie, le mouton reste porteur chronique et on peut voir apparaître de nouveaux accès de bactériémie. [Scott et Woldehiwet, 1993]

Les rechutes sont fréquentes, puisqu'elles concernent 65% des cas d'infections naturelles, et 56% des infections expérimentales; on peut observer jusqu'à 5 rechutes successives, et il se passe en général 3 à 8 semaines entre la disparition de la bactériémie et la

première rechute. On constate que les bactériémies secondaires durent plus longtemps que la bactériémie primaire. L'âge de l'animal ne semble pas avoir d'influence sur ce phénomène [Overäs, 1969].

Suite à un stress, une infection intercurrente, ou encore un traitement à base de corticoïdes (comme la bétaméthasone pendant 5j [Gulland et al, 1987a]) on peut voir réapparaître l'hémoplasme autour des hématies (sur les frottis), avec parfois une forme clinique discrète ou subaiguë, avec hyperthermie irrégulière, anémie et ictère modérés [Scott, 2003] [Scott et Woldehiwet, 1993].

La durée de cette phase de portage serait assez longue. La plus longue période de portage chronique a été observée chez un mouton infecté de façon expérimentale, et a duré dix ans et demi. Cela avait été mis en évidence en inoculant du sang de cet animal à des ovins réceptifs ; ces animaux se trouvaient dans des étables à l'abri des insectes, mais il n'est pas exclu qu'ils aient pu être infectés par un vecteur ou par les aiguilles servant aux injections [Daddow, 1981].

2. Chez les bovins

Chez les bovins, l'infection à *Mycoplasma wenyonii* serait fréquente mais entraînerait une clinique silencieuse dans la plupart des cas [Montes et al, 1994].

Le tableau clinique des bovins est encore moins marqué que chez le mouton : en général on n'observe qu'une **légère anémie**, plus marquée si les animaux sont soumis à des facteurs de stress, splénectomisés ou s'ils sont atteints de pathologies intercurrentes graves [Poole et al, 1976] [Smith et al, 1990].

L'existence d'une anémie est contestée par certains auteurs: en effet, selon eux, on observerait une myosite et un hémogramme blanc modifié, mais pas d'anémie ni de thrombopénie [Montes et al, 1994].

De même, la mortalité chez les animaux atteints par l'infection seule à *Mycoplasma wenyonii* est encore plus rare que chez les moutons atteints d'hémoplasmosse ovine [Scott et Woldehiwet, 1993].

Chez les animaux atteints on peut observer : anémie, ictère, syndrome fébrile transitoire, dépression, lymphadénopathie, diarrhée, raideur musculaire, œdème de la partie distale des membres postérieurs, lymphadénopathie précururale, toux sèche, perte de poids, infertilité [Smith et al, 1990] [Nash et Bobade, 1993].

Chez les taurillons entre 12 et 24 mois, au printemps et en été, on peut observer de l'hyperthermie, une congestion et un œdème au niveau des membres postérieurs et du scrotum, ainsi qu'une boiterie des postérieurs. En général ces symptômes durent entre 2 et 5 jours, puis rétrocedent même en l'absence de traitement.

Suite à l'infection, il est possible que la qualité du sperme soit altérée, pendant une durée variable ; cela est vraisemblablement dû à un œdème du scrotum qui induit une mauvaise thermorégulation du testicule et donc affecte la spermatogénèse. Dans un cas clinique publié en 1994 et portant sur un taureau Charolais âgé de 16 mois infecté par *Mycoplasma wenyonii* (le diagnostic a été établi à partir de l'observation de frottis sanguins), on a mis en évidence un pourcentage augmenté de spermatozoïdes présentant des anomalies primaires, deux jours après l'apparition des signes cliniques (œdème scrotal et des membres postérieurs, hyperthermie marquée). Quatre jours plus tard, on a à nouveau prélevé le taureau et on a constaté que la phase spermatique était absente. Deux mois plus tard, alors que l'œdème scrotal avait totalement régressé, il n'y avait toujours pas de phase spermatique [Montes et al, 1994].

L'année suivante, une autre publication a fait état d'observations similaires chez 5 taureaux croisés Angus et Aberdeen, entre 9 et 10 mois, au pâturage. Ces animaux présentaient un syndrome fébrile, une tachypnée, des râles pulmonaires, et un œdème du scrotum et des membres postérieurs. L'infection par *Mycoplasma wenyonii* a cette fois aussi été confirmée par l'observation de frottis sanguins. Le spermogramme de ces taurillons montrait des anomalies : motilité entre 0 et 40% et morphologie normale pour seulement 14 à 47% des spermatozoïdes. Six mois plus tard, un nouveau spermogramme était réalisé, alors que l'œdème scrotal était totalement résorbé. Pour 4 des animaux, la motilité était comprise entre 70 et 90%, avec plus de 90% des spermatozoïdes normaux.

On aurait donc tendance à dire que la fertilité n'est affectée par *Mycoplasma wenyonii* que dans le court terme. Encore que dans cette étude la baisse de fertilité soit discutable, étant donné le jeune âge des animaux [Welles et al, 1995b].

De plus, le lien entre ces oedèmes et l'infection par *Mycoplasma wenyonii* reste encore à établir, puisque rien dans la pathogénie ne semble justifier la formation d'oedèmes.

Chez les veaux splénectomisés, l'hémoplasiose bovine provoque un syndrome fébrile avec légère dépression. Quelques cas d'anémie hémolytique régressant rapidement ont été décrits.

[Smith et al, 1990]

Contrairement à ce qui se passe chez les ovins, l'hémoplasmosse bovine n'entraîne jamais d'ictère [Montes et al, 1994]. Selon certains auteurs, on pourrait observer de façon occasionnelle chez les bovins atteints une anémie accompagnée d'ictère, mais ce ne serait pas typique de cette infection [Vandervoort et al, 2001].

3. Chez le lama et l'alpaga

On observe une anémie, qui peut être plus ou moins marquée, qui a tendance à être arégénérative.

On peut observer des signes cliniques chez les animaux stressés, immunodéprimés, débilités mais également chez des individus qui semblent sains [Tornquist et al, 2002].

Chez une femelle lama âgée de 3 ans et demi et atteinte du syndrome d'immunodépression du jeune lama, on a pu observer les symptômes suivants : perte de poids, faiblesse, pâleur des muqueuses, émaciation et diarrhée. Mais en plus de l'infection par « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* », cet animal était parasité (par des trichures, des trichostrongles et des coccidies) [Barrington et al, 1997].

En 2006 a été publié un cas clinique concernant un jeune lama de 4 jours, chez qui on a confirmé l'infection par l'observation de « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* » sur les frottis et par un résultat à la PCR. Les signes cliniques observés étaient : anorexie, faiblesse, congestion des muqueuses et de la peau, tachycardie, tachypnée, pétéchies sur la face externe du pavillon auriculaire, puis diarrhée aqueuse [Almy et al, 2006].

B. Conséquences de l'infection sur la production

Les agneaux qui survivent à leur épisode clinique présentent en général par la suite un retard de croissance ; selon certains auteurs, le poids qu'ils atteignent à l'âge adulte n'est que la moitié de celui des moutons de leur race [Gretillat et Gevrey, 1983].

La chute de croissance survient après le sevrage ou au moment du sevrage (qui entraîne un stress) : la croissance paraît normale jusqu'à ce que l'animal atteigne l'âge de 2 à 3 mois, puis le retard de croissance devient de plus en plus évident [Scott et Woldehiwet, 1993].

En 1969, Harbutt avait tenté d'estimer ce retard de croissance chez les agneaux. Il a utilisé 4 groupes d'agneaux infectés de façon naturelle (mise en évidence entre 4 et 6 semaines d'âge de l'infection grâce à des frottis sanguins colorés au Giemsa).

Les agneaux ont pris entre 1,36 et 2,27 kg par semaine pendant le pic de bactériémie et juste après, ce qui correspond à un GMQ normal. En revanche, pour l'ensemble des groupes d'agneaux de l'étude, le taux de croissance a diminué de 50% (par rapport aux valeurs usuelles) après l'âge de 4 mois ou le sevrage [Harbutt, 1969]. De telles séquelles ont valu à cette maladie le nom de « maladie des agneaux nains » [Gretillat et Bernard, 1987].

Nicholls et ses collaborateurs [1989] ont montré que chez des agneaux entre 10 et 21 semaines d'âge, nourris à volonté, non parasités et avec un niveau de stress minimal, on n'observe pas de différence significative entre animaux sains et infectés expérimentalement, en ce qui concerne l'appétit, la quantité de nourriture ingérée et le GMQ. Ils ont toutefois remarqué chez certains individus infectés par *Mycoplasma ovis* une diminution de l'appétit se traduisant par une perte de poids.

Ces agneaux atteignent leur maturité sexuelle plus tard que les autres. Une intolérance à l'effort est également décrite [Scott et Woldehiwet, 1993].

Une diminution de la production de laine a été constatée par Daddow en 1979, avec une diminution du diamètre des fibres, leur longueur n'étant pas modifiée. Cela constitue une conséquence indirecte de l'infection [Daddow, 1979c].

Enfin, dans les années 80 on pensait que l'infection à *Mycoplasma ovis* pouvait se entraîner chez les agneaux des membres tordus (on parlait d'« agneaux de l'éponge », dans la région du Parthenay) [Gretillat et Bernard, 1987]. Mais au vu des connaissances actuelles concernant la pathogénie de *Mycoplasma ovis*, on ne peut pas expliquer le lien entre l'infection et ces anomalies des membres.

Chez la vache, on peut avoir une congestion mammaire, ce qui explique la diminution de la production de lait [Vandervoort et al, 2001].

Cette diminution de la production laitière a été estimée à 12%, pour la brebis [Marie, 1986].

C. Hématologie

La modification des paramètres hématologiques est d'autant plus importante que la bactériémie est marquée [Gretillat et Gevrey, 1983].

1. Observation des frottis sanguins

Ils permettent de mettre en évidence la présence des hémoplasmes à la surface des hématies, ou libres dans le plasma [Scott et Woldehiwet, 1993].

L'observation des lames doit être effectuée assez rapidement : pour *Mycoplasma ovis*, il convient de ne pas dépasser 7 heures entre la réalisation du frottis et sa lecture [Overäs, 1969].

On peut aussi observer une réticulocytose, une polychromatophilie et une anisocytose, et de nombreuses hématies nucléées, ce qui indique que l'anémie est régénérative [Kreier et Gothe, 1976].

Sur les frottis sanguins provenant de moutons infectés par *Mycoplasma ovis*, on peut observer une hypochromie, une anisochromie, et la présence d'érythroblastes et de corps de Howell-Jolly [Gretillat et Gevrey, 1983]. Les cellules immatures contiennent des inclusions basophiles : signes d'une érythropoïèse active. On peut voir des phénomènes d'hémagglutination spontanée ainsi que de nombreuses hématies lysées [Scott et Woldehiwet, 1993].

2. Hémogramme

a) hémogramme rouge

Lors d'une expérience menée en 1963, Kreier et Ristic ont suivi l'évolution des paramètres de l'hémogramme rouge au cours du temps chez un veau et un mouton, infectés respectivement par *Mycoplasma wenyonii* et *Mycoplasma ovis*.

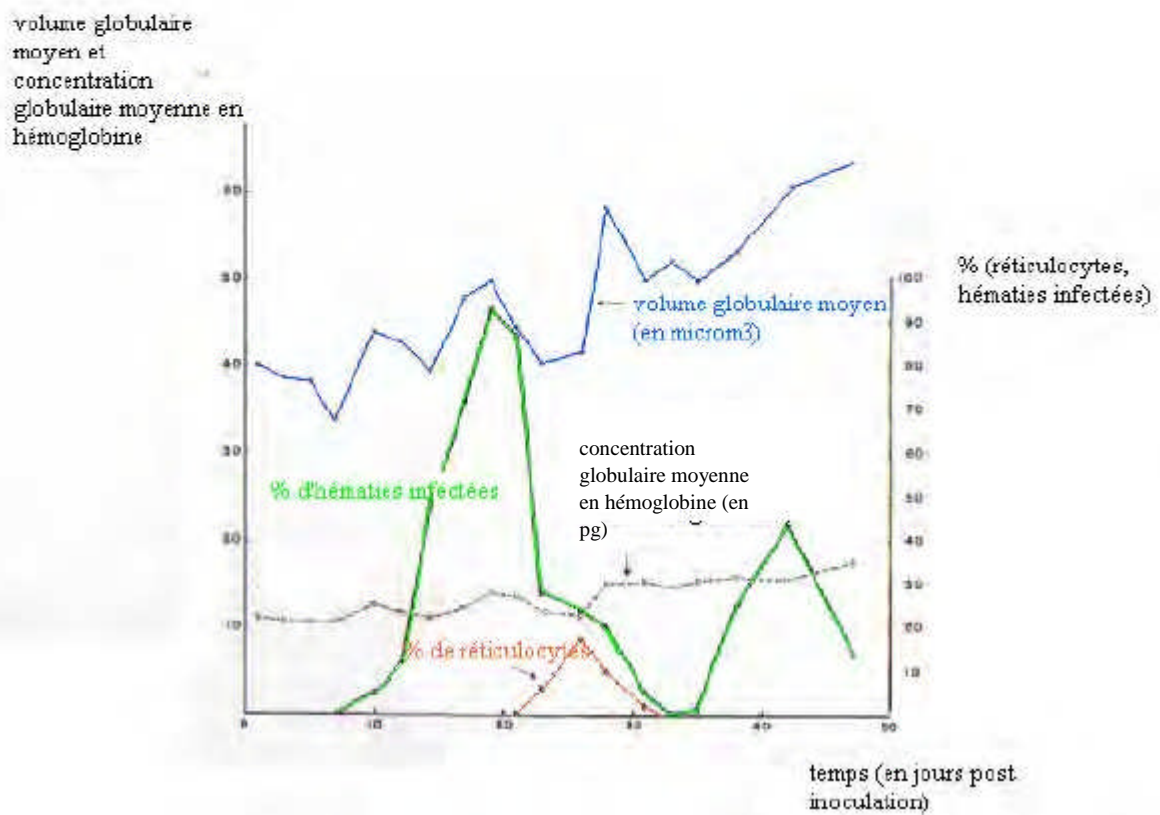
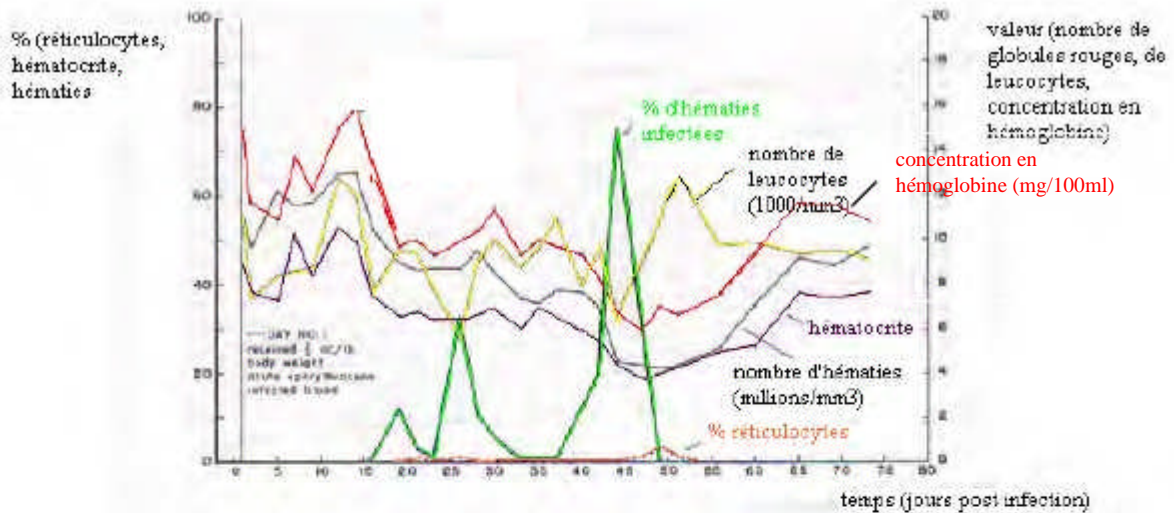



Figure 20 : évolution des paramètres hématologiques au cours du temps chez le mouton infecté par *Mycoplasma ovis* ; d'après [Kreier et Ristic, 1963]

Chez le mouton, ils ont observé une anémie macrocytaire normochrome ; le taux de réticulocytes étant de 17%, on peut dire qu'il s'agit d'une anémie régénérative (si l'animal est atteint par une autre infection concomitante, l'anémie peut devenir arégénérative [Reagan et al, 1990]) : il y a destruction des globules rouges, sans dépression de la moelle osseuse [Kreier et Ristic, 1963]. (figure 20).

Les valeurs usuelles de l'hémogramme des bovins sont présentées en annexe 2, et celles des ovins se trouvent en annexe 3.

Tableau IV : évolution des paramètres hématologiques au cours du temps chez un veau infecté par *Mycoplasma wenyonii* ; d'après [Kreier et Ristic, 1963]

	% de GR infectés	Hématocrite (%)	Nb de GR (M/mm ³)	[Hb] (Gm/100cm ³)	Volume globulaire moyen (μm ³)	Teneur moyenne des GR en Hb (μμg)
0	0	57	14,55	13,7	39,2	9,42
3	1	48	13,35	13,3	36,0	9,96
5	20	55	14,11	13,5	39,0	9,57
7	80	54	14,00	12,9	38,6	9,21
10	50	47	12,08	12,0	38,9	9,93
12	2	44	12,93	12,5	34,0	9,67
14	0	45	12,50	12,4	36,0	9,92
20	0	45	12,35	12,6	36,4	10,20
22	0	51	12,97	13,8	39,3	10,63
25	0	50	13,95	13,6	35,8	9,75
27	0	48	13,38	13,4	35,9	10,01

Chez le veau, ils ont remarqué une diminution (avec des fluctuations) de l'hématocrite pendant toute la période où les hémoplasmes étaient observables dans le sang. La valeur minimale (44%) a été observée à J12 alors qu'avant l'infection l'hématocrite avait été estimé à 57%, cela représente une diminution de 13%. (tableau IV)

Ils n'ont pas constaté de variation significative du volume corpusculaire moyen ni de la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine.

Les auteurs ont conclu à l'existence d'une anémie modérée, normocytaire et normochrome ; cela signifie qu'on est en présence d'une destruction (légère) des hématies dans la circulation périphérique [Kreier et Ristic, 1963].

Lors d'une hémoplasmose, on observe une diminution du nombre de globules rouges, pouvant descendre à 1,5 millions par mm³, ainsi qu'une thrombopénie [Gretillat et Bernard, 1987] [Kreier et Gothe, 1976].

On observe également une diminution de la concentration en hémoglobine (=anémie), qui se traduit cliniquement une semaine après l'infection par l'hémoplasme, en général. Cette anémie peut être normochrome et macrocytaire, ou bien hypochrome [Scott et Woldehiwet, 1993].

De plus, l'hématocrite est diminué [Scott, 2003].

La diminution de la numération rouge, de la concentration en hémoglobine et de l'hématocrite conduisent à des valeurs minimales en général 5 semaines après l'infection, puis on assiste à un retour dans les valeurs usuelles dans les 4 semaines suivantes [Scott, 2003].

Chez les animaux infectés chroniques, on observe parfois une anémie arégénérative normochrome, mais ceci est non-spécifique puisque cela se produit dans de nombreuses pathologies chroniques [Vandervoort et al, 2001].

b) hémogramme blanc

On peut mettre en évidence une leucopénie [Gretillat et Bernard, 1987]. Selon certains auteurs, il n'y a pas de modification de la lignée blanche [Scott et Woldehiwet, 1993]; pour d'autres, au contraire on a une leucocytose [Kreier et Gothe, 1976].

Chez des moutons infectés par *Mycoplasma ovis*, on pourrait observer, dans les premiers jours suivant l'infection, une neutrophilie, qui serait ensuite suivie d'une monocytose.

Dans certains cas, on aurait une réduction de la lymphopoïèse jusqu'à une leucopénie, qui précède la mort [Gretillat et Gevrey, 1983].

En ce qui concerne « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* », en 1990 lors d'une étude effectuée sur 4 lamas infectés naturellement (et dont les résultats ont été comparés avec 34 lamas sains), on a remarqué une neutropénie et une monocytose chez deux des individus atteints [Reagan et al, 1990].

3. Temps de coagulation

Le temps de prothrombine est augmenté [Scott et Woldehiwet, 1993].

D. Conséquences biochimiques de l'infection

1. Modification des paramètres acido-basiques sanguins

Les vaches infectées par *Mycoplasma wenyonii* présentent parfois une respiration abdominale, sans qu'on puisse mettre en évidence de lésions pulmonaires lors de l'autopsie : l'hypothèse d'une interaction avec le métabolisme de l'O₂ et du CO₂ a donc été émise. Pour la vérifier, une étude a été menée en 1970, sur 13 génisses Holstein splénectomisées et infectées expérimentalement (9 souches de *Mycoplasma wenyonii* ont été testées).

La bactériémie a été évaluée, de façon subjective : une même personne a été chargée de lire les frottis et de donner un grade de bactériémie, compris entre 0 et 10. On a également mesuré le pH, la pression partielle en CO₂, l'excès de base, la concentration en HCO₃⁻, le CO₂ total, la pression partielle en O₂, le pourcentage de saturation de l'hémoglobine, et la concentration en acides lactique et pyruvique. L'acide pyruvique intra-érythrocytaire a également été mesuré.

■ **pH** : lorsque la bactériémie dépasse le grade 5, le pH diminue dans 80% des cas (sauf pour une des souches de *Mycoplasma wenyonii*). La valeur minimale de 6,92 a été observée lors d'une bactériémie de grade 7.

■ **Concentrations en acide lactique et en acide pyruvique** : les concentrations de ces deux acides augmentent proportionnellement au grade de bactériémie. Pour deux des génisses avec une légère augmentation de la concentration en acides lactique et pyruvique, le pH sanguin n'était pas diminué : il est possible que les acides aient pu être tamponnés.

■ **pO₂ et % de saturation de l'hémoglobine** : ils sont restés dans les valeurs usuelles, on ne peut donc pas dire qu'il y ait une hypoxie.

Pour comprendre l'origine de la diminution du pH sanguin, des comptages de globules rouges ont été effectués ainsi que la mesure de l'hématocrite et de la concentration en hémoglobine. Chez la plupart des animaux de l'étude, on a constaté que ces trois paramètres étaient diminués ; chez 4 des génisses, ils étaient augmentés mais étant donné l'aspect « collant » du sang, cela était certainement dû à une déshydratation.

On observe une diminution du pH sanguin ainsi qu'une augmentation de la concentration en acide lactique et en acide pyruvique. On sait que lors d'anémie marquée, l'hypoxie tissulaire est à l'origine d'une production d'acide lactique. Mais dans le cas de l'infection par *Mycoplasma wenyonii*, l'anémie n'est pas assez marquée pour expliquer à elle seule cette augmentation de la lactatémie. Il est probable qu'aux effets de l'anémie s'ajoute un phénomène annexe, comme :

- une production d'acide lactique par l'hémoplasme lui-même,
- une production accrue d'acide lactique dans l'hématie, induite par l'hémoplasme, puis diffusion de cet acide lactique à l'extérieur de l'hématie, donc dans le sang ; cela expliquerait pourquoi la concentration en acide lactique est constante à l'intérieur de l'hématie,
- l'existence d'un facteur histotoxique qui empêcherait les tissus d'utiliser l'O₂ libéré par les hématies ; cela aurait les mêmes effets qu'une hypoxie, à savoir favoriser le métabolisme anaérobie, et donc la production d'acide lactique [Zwart et al, 1970].

Sutton [1977] a également réussi à prouver une production d'acide lactique chez des agneaux splénectomisés et infectés expérimentalement par *Mycoplasma ovis*.

2. Le piège de l'hypoglycémie

En comparant la glycémie d'ovins sains avec celle d'ovins infectés expérimentalement, Sutton [1977] a mis en évidence une diminution significative de la glycémie chez les individus infectés par rapport aux sains. Il a également réalisé des frottis afin de mettre en évidence une relation entre le nombre de bactéries par hématie et la valeur de la glycémie. (figure 21)

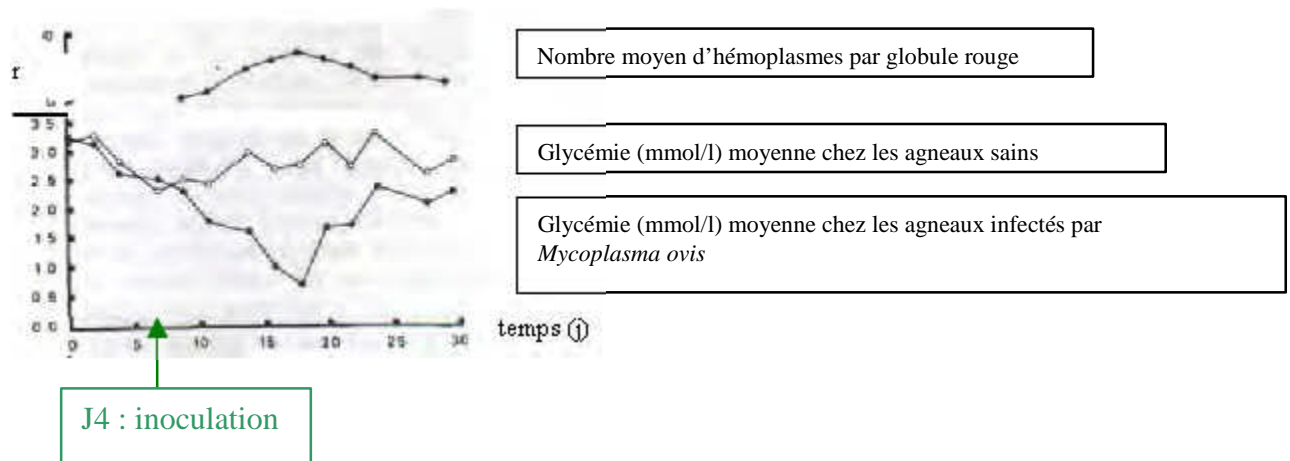


Figure 21 : évolution de la glycémie moyenne au cours d'une infection expérimentale par *Mycoplasma ovis* chez 7 agneaux ; d'après [Sutton, 1977]

En 1972, Love et McEwen ont observé l'existence d'une hypoglycémie lors des phases de bactériémie, chez un veau splénectomisé et infecté par *Mycoplasma wenyonii* de façon naturelle [Love et McEwen, 1972]. (figure 22)

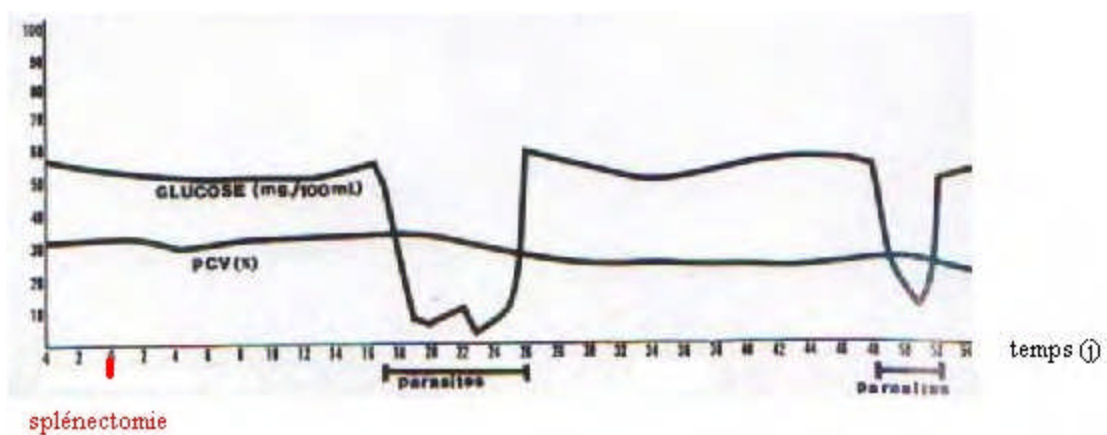


Figure 22 : évolution au cours du temps de la glycémie et de l'hématocrite chez un veau splénectomisé infecté par *Mycoplasma wenyonii*, d'après [Love et McEwen, 1972]

PCV (packed cell volume) : hématocrite

Pour expliquer l'origine de cette hypoglycémie, ils ont mesuré la consommation de glucose par des globules rouges infectés par *Mycoplasma ovis* et par des globules rouges sains. Ils ont trouvé que les érythrocytes infectés consomment $1,75 \mu\text{mol}$ de glucose par ml de cellules par heure, alors que les érythrocytes sains en consomment $0,65 \mu\text{mol}$.

Afin d'évaluer quantitativement les différentes voies métaboliques, ils ont utilisé du glucose [1-¹⁴C] et du glucose [6-¹⁴C], ce qui leur a permis de conclure que 99,4% du glucose consommé était utilisé dans la glycolyse, et que les 0,6% restants partaient vers la voie des pentoses monophosphates.

Cette mise en évidence de la consommation de glucose *in vitro* a été suivie d'expériences *in vivo* : la glycémie a été mesurée chez 8 veaux splénectomisés, âgés de 12 semaines, avant l'infection et au pic de bactériémie, et on a pu observer une nette diminution puisque celle-ci, d'une valeur de 50,5mg/dl au départ, a chuté à 4mg/dl [Love et al, 1977].

Burkhard et Garry [2004] ont continué à étudier ce phénomène, car la mise en évidence d'une hypoglycémie chez un agneau de 35 jours infecté par *Mycoplasma ovis* leur a semblé incohérente avec l'état général de l'animal, qui était conservé. La glycémie sérique avait été mesurée 2 fois et avait donné un résultat de 4 mg/dl avec un analyseur, puis ils ont utilisé un glucomètre au chevet de l'animal pour mesurer la glycémie du sang total, qui a été estimée à 74mg/dl.

Selon eux, ces résultats proviendraient d'une consommation de glucose par l'hémoplasme dans l'échantillon sanguin, entre la prise de sang et la mesure de la glycémie.

Pour confirmer cette hypothèse, ils ont effectué une série d'expériences :

- Tout d'abord, ils ont cherché une relation entre le délai séparant le prélèvement de la mesure et la chute de la glycémie, en comparant les résultats obtenus chez un mouton infecté par *Mycoplasma ovis* et chez un mouton sain (figure 23).

Chez l'animal sain, le temps séparant le prélèvement sanguin de la mesure de la glycémie n'a pas une grande influence sur la valeur de la glycémie. Alors que chez le mouton infecté, plus on attend pour faire la mesure, plus le résultat obtenu est bas.

On remarque que si l'on effectue la mesure immédiatement après le prélèvement, la glycémie d'un animal infecté est tout de même inférieure à celle d'un animal sain.

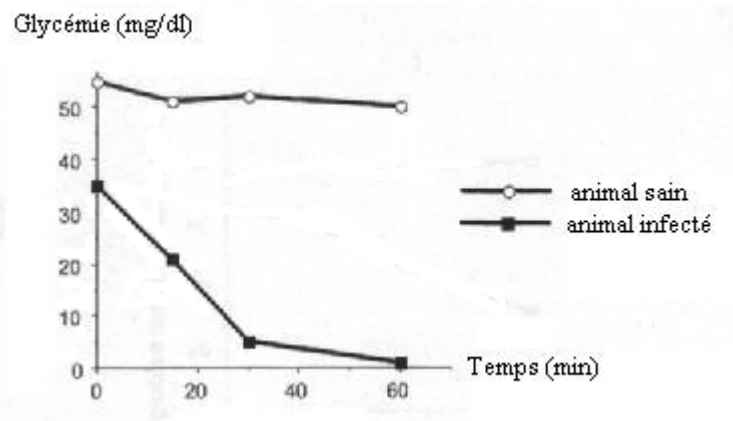


Figure 23 : influence du délai entre le prélèvement et la mesure de la glycémie plasmatique dans les prélèvements de sang hépariné chez un individu infecté par *Mycoplasma ovis* (un jour après le début du traitement à l'oxytétracycline) et chez un individu sain ; d'après [Burkhard et Garry, 2004]

- Ensuite, ils ont cherché à établir une relation entre l'intensité de la bactériémie et la diminution de la concentration en glucose. (figure 24).

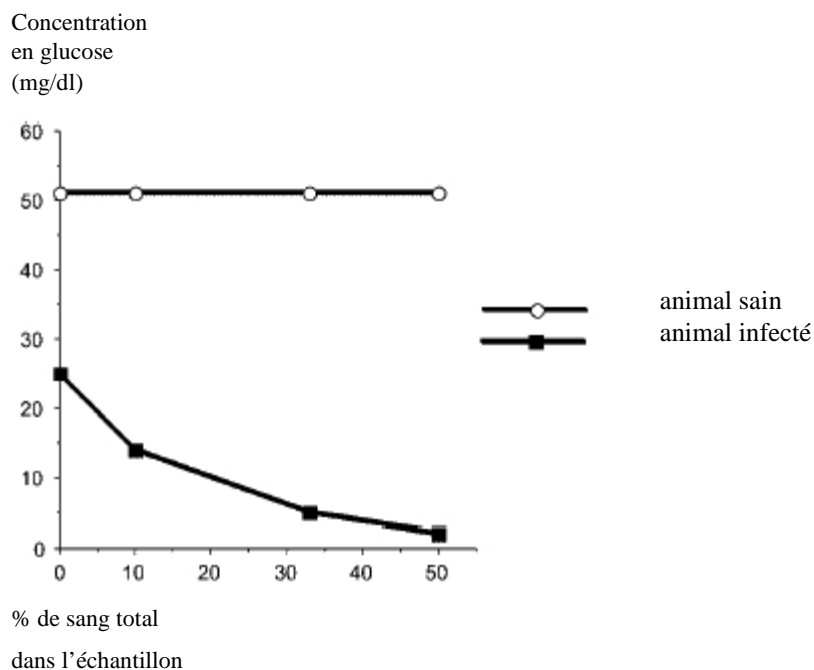


Figure 24 : influence du degré de bactériémie sur la valeur de la glycémie plasmatique ; d'après [Burkhard et Garry, 2004]

Pour cela ils ont prélevé du sang d'un agneau infecté par *Mycoplasma ovis*, qu'ils ont mélangé avec du plasma provenant de cet animal, selon différentes dilutions.

Cela a permis de faire varier artificiellement le degré de la bactériémie. Cette expérience a aussi été réalisée chez un animal sain, afin de comparer les résultats à un témoin négatif ; le sang de l'animal sain a subi les mêmes facteurs de dilution que l'animal infecté. Le sang de l'animal sain était donc toujours plus concentré en hématies que celui de l'animal atteint, puisque l'anémie de ce dernier n'a pas été prise en compte. (figure 24).

- Enfin, ils ont étudié l'évolution de la consommation du glucose *in vitro* au cours du traitement antibiotique :

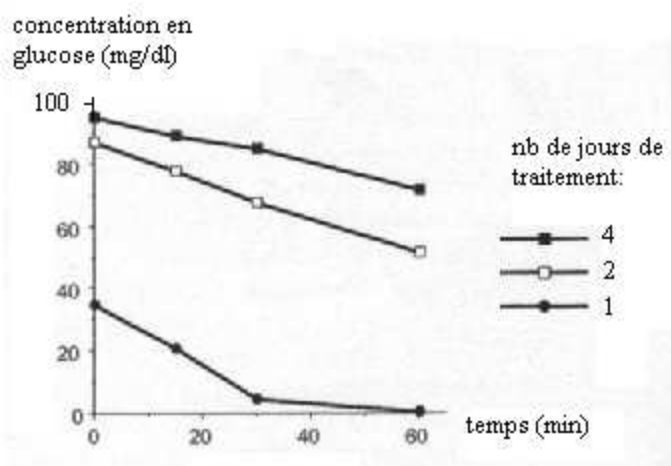


Figure 25 : évolution au cours du temps de la concentration en glucose d'un sérum équin (0,93mg/dl de glucose) incubé avec le sang total d'un mouton infecté par *Mycoplasma ovis* : comparaison des résultats obtenus selon le nombre de jours de traitement à l'oxytétracycline (à court terme) ; d'après [Burkhard et Garry, 2004]

La consommation du glucose sanguin dans les prélèvements peut encore être mise en évidence à 2 et 4 jours de traitement (mise en évidence à partir de 15 minutes), mais la valeur de la glycémie de départ augmente, et la diminution est moins franche (figure 25).

Au bilan, les expériences de Burkhard et Garry montrent que l'hypoglycémie qui avait été observée est un artéfact partiel, car elle est due à une consommation *in vitro* (dans les prélèvements) du glucose par les hémoplasmes. Mais il existe aussi, dans une moindre mesure, une consommation de glucose *in vivo* : en effet on peut observer que la glycémie plasmatique mesurée immédiatement après le prélèvement chez un animal infecté, est inférieure à la valeur obtenue chez ce même animal lorsqu'il est traité [Burkhard, Garry, 2004].

E. Lésions observées au cours de l'autopsie

On observe des signes macroscopiques d'anémie plus ou moins sévère, parfois accompagnés d'ictère (cutané, pulmonaire, hépatique et rénal). On peut également constater la présence d'ascite, plus importante chez l'agneau en général que chez l'ovine adulte [Scott, 2003].

Chez les moutons adultes, on observe parfois une augmentation de la taille des nœuds lymphatiques supra-scapulaires et poplités. La rate peut être hypertrophiée, et de consistance diminuée. La splénomégalie, comme l'hépatomégalie, semble proportionnelle à l'intensité de la bactériémie [Glenn Songer et Post, 2005].

Chez les agneaux, on peut observer, en plus des lésions observées chez les adultes:

- des lésions musculaires : décoloration due à la lyse des muscles,
- des lésions de congestion : hépatique, pulmonaire, mésentérique (congestion passive au niveau du mésentère),
- des épanchements : ascite, épanchement péricardique,
- des nœuds lymphatiques mésentériques qui sont hypertrophiés, et parfois hémorragiques,
- une paroi cardiaque flasque, des pétéchies sur l'endocarde,
- une amygdalite, du mucus dans le larynx [Overäs, 1969].

A la section, les corpuscules de Malpighi sont congestionnés (avec augmentation de taille). On peut aussi observer un œdème des tissus de la base du cou [Scott et Woldehiwet, 1993].

Chez un jeune lama infecté in utero, on a constaté également une forte congestion des muqueuses, et un œdème pulmonaire [Almy, 2006].

Si après la mort de l'animal, on veut effectuer des prélèvements pour observer *Mycoplasma ovis*, il est préférable de prélever dans le système réticulo-endothélial et dans les centres hématopoïétiques et lymphopoïétiques. En effet, le sang périphérique en vue de réaliser un frottis constitue un mauvais prélèvement [Gretillat, Gevrey, 1983]

F. Histopathologie

Dans les tissus, le germe lui-même est difficile à mettre en évidence [Scott et Woldehiwet, 1993]. Toutefois en 1983, chez un agneau, puis en 1987 chez un mouton adulte, Gretillat a réussi à observer sur un myélogramme un envahissement de la moelle osseuse par *Mycoplasma ovis*, ainsi que des signes de réduction de la fonction médullaire [Gretillat et Gevrey, 1983] [Gretillat et Bernard, 1987].

Sur des frottis par apposition réalisé chez des agneaux, on peut observer des images de phagocytose de l'hémoplasme par des macrophages dans les tissus pulmonaire et splénique [Gretillat et Gevrey, 1983].

Chez un jeune lama infecté in utero, on a prélevé la paroi du 1^{er} compartiment stomacal (dont la muqueuse était ulcérée, et couverte de fibrine) : on a trouvé de nombreuses cellules inflammatoires qui infiltraient la musculature [Almy et al, 2006].

On peut aussi observer un envahissement des nœuds lymphatiques, et parfois du thymus, par les hémoplasmes [Gretillat et Gevrey, 1983].

Chez des ovins infectés par *Mycoplasma ovis*, la présence de dépôts d'hémosidérine dans les phagocytes de la pulpe rouge de la rate constitue la principale caractéristique histopathologique, et est observable quelques jours après le pic de bactériémie. Les dépôts d'hémosidérine peuvent également se trouver dans le cytoplasme des cellules des tubules contournés proximaux du cortex rénal (figures 26 et 27) et au niveau du foie, dans les cellules parenchymateuses et les cellules de Küpffer.



Figure 26 : dépôts d'hémosidérine sur une coupe de rein chez un ovин infecté expérimentalement par *Mycoplasma ovis* (coloration avec le bleu de Prusse et le rouge neutre) ; d'après [Foggie et Nisbet, 1964]

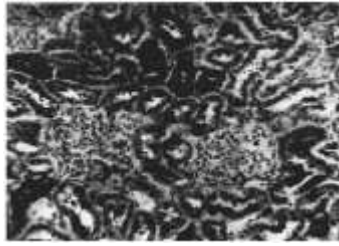


Figure 27 : dépôts d'hémosidérine dans les tubules contournés proximaux du rein, chez un ovin infecté expérimentalement par *Mycoplasma ovis* (coloration avec le bleu de Prusse et le rouge neutre) ; d'après [Foggie et Nisbet, 1964]

On peut parfois rencontrer une augmentation de la taille des corpuscules de Malpighi (rate), par hyperplasie lymphoïde [Scott et Woldehiwet, 1993] [Scott, 2003].

G. Pronostic

Pour l'infection à *Mycoplasma ovis*, le pronostic médical est plutôt bon, étant donné le faible taux de mortalité. En revanche, le pronostic économique est sombre, car l'animal atteint devient une non-valeur économique (retard de croissance des agneaux, avortements chez les brebis). De plus, il y a toujours un risque de transmission à d'autres individus du troupeau. La réforme des animaux infectés est donc conseillée.

Concernant *Mycoplasma wenyonii*, le pronostic pour les animaux atteints est encore plus favorable que pour *Mycoplasma ovis* [Messick, 2004].

IV. Epidémiologie descriptive

Concernant l'infection à *Mycoplasma ovis*, les taux de morbidité et de mortalité sont faibles [Scott et Woldehiwet, 1993]. La maladie est surtout observée en été et en automne [Radostits et al, 2007]

A. Répartition géographique

Mycoplasma ovis et *Mycoplasma wenyonii* sont présents sur tous les continents, même si en Asie on les rencontre moins. L'hémoplasmose ovine est enzootique dans toutes les régions du Monde où les troupeaux ovins et caprins sont concentrés de façon importante, sauf en Amérique du Sud. *Mycoplasma ovis* est surtout prévalent en Australie chez le mouton. En Australie, en Nouvelle Zélande et en Afrique australe, *Mycoplasma ovis* entraîne des pertes économiques importantes ; en Afrique et en Australie, le taux de prévalence sérologique se situe entre 36 et 51% mais la prévalence du germe lui-même est estimée à moins de 3% [Scott, 2003] [Scott et Woldehiwet, 1993].

En Australie, l'hémoplasmose ovine a été mise en évidence dans plusieurs Etats : des enquêtes sérologiques ont prouvé l'existence de l'infection dans le Queensland, le Victoria et la Tasmanie [Kabay et al, 1991].

Chez les agneaux, une prévalence moyenne de 10% (de 9 à 13%) a été observée, avec une augmentation sur la période de l'étude : on avait 9% en novembre 1980, et 13% en mars 1982. Pour les ovins adultes, c'est la tendance inverse : la prévalence a diminué entre le début et la fin de l'étude. Pour cette catégorie d'animaux, la prévalence moyenne était de 51% en moyenne (48 à 54%).

Parmi les élevages proposant des agneaux sevrés à la vente, 24% des exploitations étaient infectées, sans qu'on puisse mettre en évidence de symptômes sur les animaux [Nicholls et Veale, 1986a].

En France, *Mycoplasma ovis* a été mis en évidence en 1984 dans l'Aveyron, le Lot et les Deux-Sèvres [Gretillat et Bernard, 1987].

On a assisté à des enzooties locales dans les départements des Hautes-Alpes, du Tarn, de l'Aveyron, des Deux-Sèvres, et en Touraine.

Peu de cas ont été rapportés en France [Gretillat, 1985].

En 2005, l'hémoplasmose ovine était présente partout sauf en Amérique du Sud. En Europe, elle est présente en Grande-Bretagne, Irlande, Allemagne, France, Scandinavie, Russie, et Hongrie [Scott, 2003].

B. Hôtes

1. Hôtes de *Mycoplasma ovis*

Les hôtes naturels de *Mycoplasma ovis* sont le mouton et la chèvre, même si chez la chèvre la prévalence est bien moins importante [Scott, 2003].

a) le mouton

Il s'agit de l'hôte naturel principal de *Mycoplasma ovis*. Les individus de race Mérinos ou croisés Mérinos semblent plus sensibles [Kabay et al, 1991].

On constate que plus l'animal est âgé, et moins on a de chances d'observer des signes cliniques [Scott, 2003].

b) la chèvre

b1. mise en évidence de l'infection de la chèvre par *Mycoplasma ovis*

Chez la chèvre, des cas de mortalités associés à *Mycoplasma ovis* ont été décrits en Iran et dans les pays voisins, par Rafyi et Maghami en 1966 [Mason et al, 1989a]. En 1970, *Mycoplasma ovis* a été décrit chez des moutons et des chèvres, en Afrique du Sud et au Pakistan [Daddow, 1979a].

Daddow [1979b] a réussi à mettre en évidence un titre faible en anticorps anti-*Mycoplasma ovis* chez une chèvre, grâce à un test de fixation du complément utilisant comme antigène *Mycoplasma ovis*. La réponse au test était positive et le titre anticorps obtenu était faible. En inoculant du sang de cette chèvre à un mouton splénectomisé qui n'avait jamais été exposé à l'infection, Daddow a observé après 11 jours des organismes ressemblant à *Mycoplasma ovis*, qui ont persisté pendant 18 jours.

Cependant la chèvre reste un hôte rare pour *Mycoplasma ovis*, comme l'indique une étude sérologique, publiée en 1991, menée sur 1224 moutons et 600 chèvres. On a mis en évidence des anticorps anti-*Mycoplasma ovis* chez 44,9 % des moutons (550 individus) et 0,17 % des chèvres (1 individu) [Mason et Statham, 1991b].

b2. cinétique de l'infection et de la réponse anticorps

La durée de la période d'incubation est la même chez le mouton et la chèvre [Daddow, 1979a].

Chez la chèvre, la bactériémie est beaucoup moins intense que chez les ovins, et elle dure moins longtemps, même si les observations diffèrent selon les auteurs :

- bactériémie de 3 à 4 jours pour Donatien et Lestoquard [1935],
- pour Daddow en 1979 : 3 à 4 semaines lors d'une première expérience ([Daddow, 1979a]) puis 11 jours [Daddow, 1979b], toutes 2 lors d'une infection expérimentale.

Mais on remarque que, si la durée de la bactériémie varie, lorsqu'une étude donnée est effectuée à la fois chez le mouton et la chèvre, la durée de la bactériémie du mouton est toujours supérieure [Daddow, 1979a] [Mason et al, 1989a] [Mason et al, 1989b] [Mason et Statham, 1991b] [Scott, 2003].

De plus, chez la chèvre il est fréquent d'observer une phase d'éclipse suivant la première bactériémie qui peut durer plusieurs semaines ; à l'issue de cette phase, une deuxième bactériémie est observée, qui dure aussi longtemps que la première [Donatien et Lestoquard, 1935], même si elles sont toujours moins marquées et plus courtes que celles observées chez les ovins [Daddow, 1979a].

Les chèvres peuvent rester porteuses chroniques de l'infection à *Mycoplasma ovis*. En effet, lors d'une étude, on a inoculé à 6 agneaux splénectomisés du sang provenant de 6 chèvres elles-mêmes infectées expérimentalement 18 mois plus tôt, et 3 de ces agneaux ont montré une bactériémie ainsi qu'une séroconversion 21 à 22 jours après l'inoculation. Chez les chèvres, on n'observait plus d'hémoplasmes sur les frottis au moment où le sang a été prélevé pour l'inoculation des agneaux [Mason et al, 1989b].

En utilisant un test de fixation du complément, des anticorps dirigés contre *Mycoplasma ovis* ont pu être mis en évidence dans le sérum de 2 moutons et de 2 chèvres. On a remarqué que

chez la chèvre, les anticorps ont été détectés plus tard que chez le mouton, avec un titre plus faible et qui persiste moins longtemps [Daddow, 1979a].

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte (selon la technique décrite par Nicholls et Veale en 1986), en inoculant 6 caprins on a pu mettre en évidence une séroconversion en moins de 14 jours. Le titre maximal observé était de 5120. A J27, tous les titres étaient compris entre 160 et 1280 ; à J90, ils étaient tous entre 80 et 160. Ensuite et jusqu'à la fin de l'étude, pour 3 des animaux les titres sont restés entre 20 et 160, et pour les 3 autres animaux ils variaient entre moins de 20 (ils étaient donc non détectables) et 60 [Mason et al, 1989b].

Souvent, le statut sérologique des chèvres est difficile à évaluer car les anticorps fixant le complément ne sont détectables qu'environ une semaine après avoir atteint leur titre maximal [Mason et al, 1989a].

Sur les frottis colorés au Giemsa, chez la chèvre les hémoplasmes sont observés autant en anneaux qu'en coques, alors que chez le mouton on observe surtout des formes annulaires. De plus, chez les moutons les hémoplasmes sont plus gros. Daddow a alors émis l'hypothèse qu'il pourrait exister un hémoplasme caprin, capable d'infecter de façon naturelle la chèvre et le mouton [Daddow, 1979b].

c) la vache

Expérimentalement, l'infection n'est pas possible chez les bovins, sauf chez le veau splénectomisé [Scott, 2003].

Selon certains auteurs, les veaux splénectomisés ne seraient pas sensibles à *Mycoplasma ovis* [Smith et al, 1990].

En fait la vache n'est pas infectée, mais elle pourrait héberger *Mycoplasma ovis*, sur une courte période [Hoyte, 1971].

d) les autres espèces

Le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) serait également un hôte naturel de *Mycoplasma ovis*. Cela a été observé chez des individus vivant à l'état sauvage au Texas.

Expérimentalement, on peut infecter le blesbok (*Damaliscus albifrons*), l'élan du Cap (*Taurotragus oryx*), et le daim (*Dama virginiana*). On a recherché également à transmettre

expérimentalement *Mycoplasma ovis* au chien, au cochon d'inde et au lapin, en vain [Scott, 2003].

2. Hôtes de *Mycoplasma wenyonii*

La vache est l'hôte naturel principal de *Mycoplasma wenyonii*. Ce sont plutôt les jeunes animaux qui développent la forme clinique [Scott et Woldehiwet, 1993].

Mycoplasma wenyonii n'est pas transmis expérimentalement au mouton, à la chèvre, et au daim (*Dama virginiana*) [Scott et Woldehiwet, 1993] [Mc Laughlin et al, 1991].

Le mouton n'est pas infecté mais il se pourrait qu'il puisse héberger l'hémoplasme sur une courte période [Hoyte, 1971].

3. Hôtes de « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* »

L'hôte naturel est le lama.

En 1991, une étude a été réalisée pour déterminer si cet hémoplasme pouvait se transmettre au porc, au mouton et au chat, suite à une inoculation de sang infecté. Pour aucun de ces animaux on n'a vu d'hémoplasmes sur les frottis, réalisés entre J4 et J28 post-inoculation ; on n'a pas noté non plus d'anémie ni de signes cliniques. De façon occasionnelle, on a relevé des augmentations transitoires de la température rectale, mais celles-ci n'étaient pas associées à des anomalies de l'hémogramme. A J28, on a recherché des anticorps anti-« *Candidatus Mycoplasma haemolamae* » mais le résultat était négatif pour tous les animaux récepteurs.

Il semble donc que le porc (même splénectomisé), le mouton et le chat (même splénectomisé) ne puissent pas être des hôtes de « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* » [Mc Laughlin et al, 1991].

4. Hôtes de « *Candidatus Mycoplasma haemobos* » et « *Candidatus Mycoplasma haemotarandirangiferis* »

Ces deux espèces ayant été découvertes récemment, pour l'instant on ne sait pas s'il existe d'autres espèces hôtes que celles chez qui on les a mises en évidence. Actuellement on peut

affirmer que le bovin semble être sensible à « *Candidatus Mycoplasma haemobos* » [Tagawa et al, 2008], et que le renne est un hôte de « *Candidatus Mycoplasma haemotarandirangiferis* » [Stoffregen et al, 2006].

V. Epidémiologie analytique

A. Sources

Les animaux en phase de bactériémie primaire constituent une source importante dans la contamination des agneaux par *Mycoplasma ovis* [Kabay et al, 1991]. Mais les animaux porteurs chroniques peuvent aussi présenter un danger ; en effet, on peut voir apparaître des phases de bactériémies secondaires [Scott et Woldehiwet, 1993].

B. Modalités de la transmission

Les hémoplasmes se trouvent dans le compartiment sanguin et sont incapables de survivre dans le milieu extérieur : très tôt on a donc cherché à mettre en évidence une transmission par les arthropodes hématophages. D'autres modes de transmission ont été étudiés chez les hémoplasmes des ovins et des bovins : transmission iatrogène, transplacentaire, et par voie orale. Concernant « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* », de nombreuses incertitudes persistent encore quant à sa transmission.

1. Transmission par les arthropodes hématophages

C'est le principal mode de transmission de *Mycoplasma ovis* et *Mycoplasma wenyonii*.

a) vecteurs de *Mycoplasma ovis*

➡ Mouches : *Stomoxys calcitrans* (en zone tempérée)

Son rôle dans la transmission de *Mycoplasma ovis* est controversé. Overäs [1969] a mis en évidence la transmission de l'hémoplasme ovin par l'injection sous-cutanée d'une suspension saline de *Stomoxys calcitrans* (qui s'étaient nourries sur un mouton fortement infecté) à un individu sensible. En revanche il n'a pas pu mettre en évidence sa transmission en conditions

naturelles même avec une mise en présence de *Stomoxys calcitrans* infectées avec 3 moutons sensibles, pendant 3 mois 1/2.

De plus, Overäs a montré que *Mycoplasma ovis* était capable de survivre « un certain temps » dans l'organisme de *Stomoxys calcitrans*.

➡ ***Melophagus ovinus*** (en zone tempérée) : son rôle dans la transmission de l'hémoplasme ovin est pour l'instant supposé et non prouvé ; comme pour *Stomoxys calcitrans*, Overäs [1969] a montré que l'hémoplasme ovin était capable de persister chez le mélophage.

➡ **Moustiques :**

- *Aedes camptorhynchus* (zones tropicales et subtropicales) : mise en évidence expérimentale de la transmission mécanique, par Howard en 1975 [Daddow, 1980],

- *Anopheles annulipes* (zones tropicales et subtropicales) [Mason et Statham, 1991a],

- *Culex annulirostris* (zones tropicales et subtropicales)

En 1980, une étude pour préciser le rôle vecteur du moustique *Culex annulirostris* a été publiée. Elle a été menée sur 7 agneaux Mérinos élevés en bergerie (à l'abri des vecteurs) depuis leur sevrage. Leur statut a été évalué grâce à la réalisation de frottis sanguins, ainsi qu'un test sérologique pour dépister les infections latentes. Cinq d'entre eux se sont révélés sains.

On a effectué 2 expériences, à 11 mois d'intervalle : les agneaux sensibles étaient exposés aux piqûres de *Culex* au crépuscule, puis ils retournaient en bergerie, à l'écart des insectes et des moutons porteurs chroniques.

En parallèle, des pièges à insectes ont été disposés, et les moustiques capturés ont été identifiés puis conservés à 4°C. Des frottis colorés au Giemsa ont été réalisés pour déterminer si les agneaux sensibles s'infectaient.

Dans la 1^e expérience, 2 agneaux (1 sain et 1 infecté) étaient placés dans 2 cages grillagées (qui laissent donc entrer les moustiques), sans contact possible entre les deux individus.

On a relevé sur les animaux la présence de moustiques en train de piquer, ainsi que des signes d'énervement des animaux. Parmi les moustiques prélevés on n'a trouvé que des représentants de l'espèce *Culex annulirostris*. On a remarqué que les mouvements de tête et les piétinements des ovins interrompaient le repas des moustiques, et certains d'entre eux étaient allés piquer l'autre agneau.

Sur les frottis, on a détecté la présence de *Mycoplasma ovis* chez l'agneau qui était sain initialement, 22 jours après le début de l'expérience.

On a conservé certains moustiques et on en a fait un broyat, qui a été inoculé à un autre agneau sensible ; 22 jours plus tard, on a mis en évidence *Mycoplasma ovis* grâce aux frottis chez l'agneau récepteur.

Pour la 2^e expérience, on a placé à nouveau 2 agneaux dans 2 cages grillagées, et on a capturé les moustiques (comme pour la 1^e expérience, uniquement des *Culex*). Chez l'agneau sain, on a observé, sur les frottis colorés au Giemsa, *Mycoplasma ovis* 16j après début de l'expérience.

Ensuite, on a enfermé 23 moustiques, capturés après avoir piqué l'agneau infecté, dans un petit bocal fixé sur l'oreille d'un agneau sain, dont la peau a été rasée. Les quatre membres de l'agneau étaient attachés, donc il ne pouvait pas manifester de signes d'irritation. Six jours plus tard, on a pu mettre en évidence une bactériémie chez cet agneau récepteur. Il faut noter que les 2 repas sanguins des moustiques (un sur l'animal infecté, l'autre sur l'animal naïf) ont eu lieu à une dizaine de minutes d'intervalle (10 min entre la capture et la mise dans la cage). On peut dire que *Culex annulirostris* est un vecteur mécanique de *Mycoplasma ovis*, puisqu'en si peu de temps il ne peut pas y avoir de transformation de l'hémoplasme à l'intérieur de l'organisme de l'arthropode [Daddow, 1980].

➡ **Tiques :**

- *Haemaphysalis plumbeum* (zones tropicales et subtropicales),
- *Rhipicephalus bursa* (zones tropicales et subtropicales) [Mason et Statham, 1991a].

Le rôle des tiques semble mineur ; en effet, certaines formes cliniques sont plutôt rencontrées en hiver et au moment des agnelages, ce qui ne correspond pas vraiment aux périodes d'activités des tiques [Kabay et al, 1991]

➡ **Poux : *Linognathus ovis***

Selon une étude effectuée par Daddow et Hall en 1976, il ne semble pas que *Damalinia ovis* puisse être vecteur. En effet, des ovins sensibles en présence de poux ayant piqué des animaux infectés n'ont pas montré de bactériémie. Les mêmes résultats ont été obtenus en inoculant ces poux broyés dans une solution saline [Daddow, 1980].

Selon Overäs, le fait que *Mycoplasma ovis* soit capable de survivre un certain temps dans l'organisme du mélophage et de *Stomoxys calcitrans* ne prouve pas que ces espèces soient des vecteurs [Daddow, 1980].

Il est établi qu'un animal peut être infecté suite à l'inoculation d'un seul érythrocyte portant l'hémoplasme. Or, un moustique transmet 1 à 2 hématies, alors que *Stomoxys calcitrans* en inocule environ 400 [Mason et Statham, 1991a].

On peut donc dire que, si le rôle de vecteur passif de *Stomoxys calcitrans* est confirmé, celui-ci constituerait un vecteur bien plus efficace que les moustiques, même si rien n'a pu être prouvé pour l'instant [Scott et Woldehiwet, 1993].

b) vecteurs de *Mycoplasma wenyonii*

- ➡ **Mouches** : *Stomoxys*
- ➡ **Tabanidés**
- ➡ **Tiques** : *Dermacentor andersonii*
- ➡ **Poux**

Concernant *Mycoplasma wenyonii*, actuellement rien n'a été prouvé quant aux espèces d'arthropodes pouvant jouer un rôle de vecteur mécanique.
[Smith et al, 1990] [Hofmann-Lehmann et al, 2004] [Glenn Songer et Post, 2005]

2. Transmission iatrogène

Mycoplasma ovis peut être transmis d'un animal à l'autre par le biais d'instruments contaminés par le sang, par exemple lors de castration, caudectomie, vaccinations, prises de sang, tonte, pose de boucles auriculaires [Scott, 2003] [Brun-Hansen et al, 1997b]...

Expérimentalement, suite à l'injection intraveineuse de sang infecté à des animaux sains, la durée de la phase d'incubation préclinique a été estimée à une semaine [Scott, 2003].

3. Transmission verticale

Un mode de transmission transplacentaire est suspecté : en 1983 Gevrey et Gretillat avaient mis en évidence *Mycoplasma ovis* à partir de frottis sanguins chez 3 agneaux âgés de 2

jours et nés de 2 brebis porteuses de l'hémoplasme ovin. Il faut noter que les animaux étaient nés en février, donc il n'y avait pas de moustiques [Gretillat et Gevrey, 1983].

Quelques années plus tard, en 1990, Stuen a mis en évidence une infection marquée à *Mycoplasma ovis* chez un agneau d'une semaine, alors que les frottis de son frère jumeau étaient normaux : il s'est alors posé la question d'une transmission transplacentaire, même si le fait que l'un des jumeaux soit sain est plus en faveur d'une infection pendant la naissance ou très peu de temps après [Brun-Hansen et al, 1997b].

L'existence d'une telle transmission est controversée : pour Gretillat et Gevrey (1983), elle serait fréquente, alors que pour Overäs (1969) elle serait impossible [Brun-Hansen et al, 1997b].

Cette transmission verticale pourrait contribuer au maintien de l'infection dans le troupeau [Scott et Woldehiwet, 1993] : l'agneau naît porteur, et la baisse d'immunité consécutive au stress du sevrage peut conduire à un épisode d'hémoplasmosse aiguë [Brun-Hansen et al, 1997b].

Chez le lama, un tel mode de transmission est également suspecté : Almy et al. [2006] rapportent le cas d'un jeune lama âgé de 4 jours chez qui on a observé de nombreux hémoplasmes en réalisant un frottis. Une PCR a été effectuée sur le jeune et la mère, et le résultat était positif pour les deux individus, alors qu'on n'observait pas d'hémoplasme sur les frottis sanguins de la mère. Pour les auteurs, une transmission in utero de l'infection semble assez probable, même s'ils ne peuvent pas exclure une contamination par le lait, ni une inoculation au moment de la naissance.

En 1996 avait également été publié un article rapportant la mise en évidence d'organismes ressemblant à des hémoplasmes à la surface des hématies chez un jeune lama le lendemain de sa naissance ; mais celui-ci ne présentait aucun signe clinique de la maladie, et à part une légère lymphopénie et une élévation de la concentration plasmatique en fibrinogène, la numération-formule ne présentait pas d'anomalies. Cette observation incite à penser que l'infection s'est faite par contamination transplacentaire, car le délai entre l'inoculation par voie intraveineuse et l'observation des hémoplasmes est normalement supérieur à 1j [Fisher et Zinkl, 1996].

4. Transmission orale

L'hypothèse d'une transmission orale a été avancée concernant *Mycoplasma wenyonii* [Mc Auliffe et al, 2006].

Overäs [1969] a fait avaler à des agneaux 30ml de sang citraté ou hépariné, provenant d'un animal infecté par *Mycoplasma ovis*. Chez 5 agneaux, il a mis en évidence une bactériémie marquée, mais sans signes sévères d'anémie. La durée de la phase d'incubation était de 21 à 33 jours (plus longue que lors d'une inoculation intraveineuse).

C. Dose infectante

Selon Sutton et Jolly (1973), du sang de mouton infecté dilué à 10^{-6} permettrait encore la contamination d'un mouton sain (par transmission parentérale) [Mason et Statham, 1991b].

Une étude a été réalisée en 1991, dans le but de déterminer si un lien pouvait être établi entre le niveau de bactériémie et l'efficacité de la transmission, chez le mouton infecté par *Mycoplasma ovis*.

Sur cinq brebis porteuses de l'hémoplasme on a effectué des prélèvements sanguins, puis on a estimé le nombre total d'hématies ; les valeurs obtenues étaient toutes comprises entre $12,1 \cdot 10^9$ et $14,3 \cdot 10^9$ hématies par ml. On a effectué plusieurs échantillons, en diluant le sang de 10 en 10, jusqu'à 10^{-9} (la dilution est effectuée avec du sang de mouton sain). Ce sang a été inoculé à des agneaux sains.

Ensuite, à partir des agneaux récepteurs on a prélevé du sang en vue de réaliser des frottis pour la mise en évidence d'une bactériémie, et pour effectuer un test sérologique. Ces prélèvements ont été effectués tous les 2 à 3 jours, à partir de J14 ou J20 post-inoculation, et jusqu'à J37.

Pour les agneaux inoculés avec du sang infecté par *Mycoplasma ovis*, il semble que plus l'inoculat est dilué, plus l'infection est observée tardivement, à la fois sur les frottis et en sérologie. (tableau V)

Tableau V : délais d'apparition de l'infection à *Mycoplasma ovis* en fonction de la dilution du sang d'un donneur infecté

	Délai entre l'inoculation et la 1 ^{er} mise en évidence d'une bactériémie (en jours)	Délai entre l'inoculation et le résultat sérologique positif (en jours)
Sang infecté dilué à 10 ⁻⁷	15	21
Sang infecté dilué à 10 ⁻⁸	21 (2 animaux)	21 et 29
Sang infecté dilué à 10 ⁻⁹	25 (2 animaux) et 21	29 (3 animaux)
Sang infecté dilué à 10 ⁻¹⁰	25 (3 animaux)	29 (3 animaux)

On considère qu'un moustique est capable d'inoculer 10⁻¹⁰ ml de sang (soit 1 à 2 érythrocytes si le moustique a piqué un mouton possédant 14.10⁹ globules rouges par ml) et une mouche (*Stomoxys calcitrans*) 30.10⁻⁹ ml (soit 400 érythrocytes). Par conséquent, si la source de *Mycoplasma ovis* est un mouton fortement infecté, la transmission par les moustiques peut s'effectuer même si la population d'insectes est faible. En revanche, si la source est un mouton avec une faible bactériémie, la transmission aux individus naïfs ne pourra se faire que suite à de nombreuses piqûres de moustiques (pour qu'il y ait au moins 1 globule rouge infecté) [Mason et Statham, 1991a].

D. Facteurs favorisants

1. Age et stade physiologique

Pour l'infection à *Mycoplasma ovis*, toutes les classes d'âges sont réceptives mais la prévalence de la forme clinique est plus importante chez les agneaux et les brebis en fin de gestation. L'âge n'influence pas la sensibilité à l'infection, mais plus l'individu est âgé, et plus son système immunitaire est capable de juguler l'infection [Scott, 2003].

2. Baisse d'immunité

Chez les agneaux dont l'apport de colostrum a été limité (naissances multiples, orphelins), on observe une plus grande sensibilité à l'infection [Gretillat et Bernard, 1987]. Le stress, par le biais d'une immunodépression, est également un facteur favorisant ; chez les

agneaux, il peut avoir plusieurs origines : sevrage, malnutrition, mort ou disparition de la mère [Scott et al, 2003].

3. Splénectomie

La splénectomie raccourcit la phase d'incubation chez le mouton : elle passe de 4-21 jours à 2 jours. De plus, l'expression clinique est plus franche chez les moutons splénectomisés, et les phases de rémission sont moins visibles [Donatien et Lestoquard, 1935].

4. Existence d'infections intercurrentes

Si l'on inocule du sang contenant *Anaplasma ovis* à un mouton infecté chronique par *Mycoplasma ovis*, on assiste à une réactivation de l'infection par l'hémoplasme [Donatien et Lestoquard, 1935].

Lorsqu'un animal est infecté à la fois par *Mycoplasma wenyonii* et *Anaplasma marginale*, l'une des deux bactéries hémotropes prédomine ; si l'on inocule du sang prélevé sur cet animal à un veau splénectomisé, c'est l'espèce qui prédomine qui entraînera en premier des signes cliniques.

Si c'est *Mycoplasma wenyonii* qui prédomine, et si le veau récepteur survit à son épisode clinique, l'anaplasmose ne se déclare qu'une fois qu'on n'observe quasiment plus d'hémoplasmes dans le sang. Si l'animal survit à son anaplasmose, on observe ensuite une résurgence de l'hémoplasme à la surface des érythrocytes ; lorsque le nombre d'hémoplasmes diminue, on assiste à un nouvel épisode d'anaplasmose, et ainsi de suite... En général, cela ne s'arrête que lorsque le veau a acquis une immunité contre les deux bactéries. Il arrive que certains veaux restent infectés par les deux espèces et, dans ce cas, le pourcentage d'érythrocytes infectés par *Anaplasma marginale* ne dépasse pas 30% ; cependant l'anémie est aussi intense que chez les individus infectés uniquement par l'anaplasmose avec 80% des hématies infectées [Foote et al, 1957].

E. Hypothèses pouvant justifier les différences observées entre l'infection chez la chèvre et le mouton

Pour expliquer que la prévalence chez la chèvre soit bien inférieure à celle observée chez le mouton, on peut émettre plusieurs hypothèses :

- le fait que les insectes piqueurs infestent plus volontiers le mouton que la chèvre,
- la bactériémie qui est moins marquée chez les chèvres,
- la nécessité d'une dose infectante plus importante pour contaminer la chèvre,
- une moindre sensibilité des chèvres pour l'hémoplasme [Mason et Statham, 1991b].

VI. Diagnostic de l'infection par les hémoplasmes

A. Diagnostic épidémiologique-clinique

1. Tableau clinique

Etant donné que les animaux infectés montrent en général peu de symptômes, la suspicion se fera rarement à partir de l'observation des signes cliniques. De plus, les lésions observables à l'autopsie sont très peu spécifiques [Scott et Woldehiwet, 1993].

Bien souvent, c'est la découverte d'un cas aigu qui révélera l'infection latente d'autres animaux dans l'exploitation. Classiquement, ces cas sont observés suite à une immunodépression (situation de stress, comme le sevrage des agneaux, une maladie concomitante, la fin de gestation, un traitement aux corticoïdes).

Chez les ovins, l'hypothèse d'une infection à *Mycoplasma ovis* sera avancée lors d'anémie avec ou sans ictère, accompagnée d'une hyperthermie intermittente (sauf pour la forme chronique), d'abattement, de symptômes respiratoires, d'un œdème de l'auge, d'une chute de la toison et de boiterie. Chez les agneaux on pourra observer en plus une réaction des centres lymphopoiétiques (nœuds lymphatiques, amygdales, thymus), une diarrhée et un retard de croissance.

Si dans un élevage on est confronté à une incidence élevée de retards de croissance, pouvant être accompagnée d'un taux de mortalité important chez les agneaux, il faut penser à l'hypothèse d'une infection par un hémoplasme [Scott, 2003].

Chez les bovins, les symptômes qui peuvent faire penser à une infection par *Mycoplasma wenyonii* sont : un gonflement articulaire, une boiterie, un œdème scrotal ou mammaire, de l'infertilité [Vandervoort et al, 2001].

Dans les pays où les conditions d'élevage sont précaires, on peut trouver des données épidémiologiques et cliniques plus nettes, mais il faut être conscient que bien souvent les animaux sont atteints de pathologies latentes ou concomitantes (c'est le cas par exemple des helminthoses). Donc les symptômes observés sont rarement associés à la présence seule de l'hémoplasme [Scott, 2003].

Mais il arrive également qu'on rencontre des formes cliniques sur des moutons d'apparence saine, et recevant une alimentation adaptée [Scott et Woldehiwet, 1993].

Pour dépister les brebis porteuses chroniques, on peut leur injecter des corticoïdes (la bétaméthasone par exemple, qui est un bon immunosuppresseur), dans l'espoir d'obtenir une bactériémie visible sur les frottis et/ou des signes cliniques [Scott, 2003].

2. Modifications de l'hémogramme

Lors d'une infection à *Mycoplasma ovis*, on peut observer une anisocytose, une anisochromie, la présence d'érythroblastes, de corps de Howell-Jolly.

On peut observer une neutrophilie importante les premiers jours de l'infection, puis une monocytose. Dans certains cas, il y a une lymphopoièse, qui aboutit à une leucopénie précédant la mort [Gretillat, 1985].

Les valeurs usuelles de l'hémogramme des bovins sont présentées en annexe 2, celles des ovins en annexe 3, et celle du lama et de l'alpaga en annexe 4.

3. Diagnostic nécropsique

Les agneaux peuvent être chétifs, montrer des signes d'anémie (muqueuses pâles,...), parfois d'ictère, une rate et des nœuds lymphatiques hypertrophiés, des dépôts d'hémosidérine dans les tubes contournés proximaux du rein [Scott et al, 2003].

D'après Neitz, aucun signe clinique ne peut être considéré comme étant caractéristique ; le diagnostic clinique ne peut être que provisoire et devra être confirmé par des méthodes expérimentales (comme la mise en évidence de l'hémoplasme sur frottis) [Scott et al, 2003].

De plus, il est indispensable de recourir aux méthodes expérimentales pour dépister les individus porteurs au sein d'un troupeau.

4. Prélèvement sanguin puis inoculation à un animal sain, splénectomisé

C'est une méthode qui est citée ici pour mémoire ; elle était utilisée pour dépister les porteurs chroniques (par exemple, pour les brebis dont les agneaux présentaient un retard de croissance) [Scott et al, 2003].

B. Diagnostic expérimental

Etant donné la pauvreté de leur bagage enzymatique, on ne peut pas utiliser les tests « biochimiques » (de type catalase, coagulase...) pour identifier les hémoplasmes. De plus, bien souvent l'isolement des hémoplasmes à partir d'un échantillon est difficile, car sur les milieux riches, les contaminants (bactéries commensales ou pathogènes, ainsi que les champignons), poussent beaucoup plus vite que les hémoplasmes [Citti, 2006].

1. Diagnostic expérimental direct

a) observation au microscope optique

a1. réalisation des frottis sanguins

Il est préférable de prélever du sang périphérique (par exemple, à l'oreille), de procéder à l'étalement, et de sécher immédiatement la lame. On évitera le prélèvement sanguin à la seringue, car on risque de détacher les hémoplasmes des érythrocytes, ce qui a été décrit pour *Mycoplasma ovis* [Gretillat et Gevrey, 1983].

On ne se contentera pas d'un seul échantillon ; il est préférable de réaliser plusieurs frottis, afin d'augmenter ses chances d'observer des hémoplasmes [Neimark et al, 2004].

a2. coloration au Giemsa

Les hémoplasmes colorés prennent une teinte variant entre le rouge pâle et le rouge-violet, en fonction du pH du tampon. La couleur varie selon les lames, mais sur un même

échantillon on remarque que *Mycoplasma ovis* a toujours une teinte très proche de celle du noyau des leucocytes, même si elle est toujours quelque peu moins intense, [Kreier et Gothe, 1976].

Il faut noter que *Mycoplasma ovis* prend mieux la coloration de Giemsa que *Mycoplasma wenyonii*. En effet, l'hémoplasme bovin apparaît sous la forme d'anneaux très fins, alors que pour l'hémoplasme ovin on observe des coques ou des bâtonnets entièrement colorés [Kreier et Ristic, 1963].

Pour bien faire la différence entre anaplasmes et hémoplasmes, il faut retenir que les anaplasmes ont une couleur plus foncée, ce qui se voit plus facilement si l'on peut observer les deux espèces côte à côte sur une même lame [Donatien et Lestoquard, 1935].

a3. coloration à l'acridine orange, puis observation sous lumière UV

On considère que cette méthode est plus sensible que la coloration au Giemsa, elle est donc préconisée lorsque moins de 30% des hématies sont infectées. Avec cette coloration, l'hémoplasme devient orange brillant. [Kreier et Gothe, 1976] [Brun-Hansen et al, 1997b] [Glenn Songer et Post, 2005].

a4. les limites de l'observation au microscope optique dans le diagnostic

Il faut veiller à ne pas confondre les hémoplasmes avec des artéfacts de coloration, des fragments cellulaires [Gulland et al, 1987b], des corps de Heinz, de Howell-Jolly, de Pappenheimer, des inclusions basophiles.

De plus, cette méthode est peu sensible car la bactériémie est transitoire, et concomitante des signes cliniques [Glenn Songer et Post, 2005].

Les frottis doivent être réalisés rapidement après le prélèvement, le niveau de bactériémie est très variable d'un individu à l'autre, la bactérie est petite et difficile à voir au microscope optique [Vandervoort et al, 2001].

b) test de Coombs (modifié par Sheriff)

La modification de Sheriff consiste à utiliser un sérum de lapin contenant des globulines anti-mouton. Ainsi, lorsque ce sérum est mis en présence d'hématies nettoyées provenant d'un animal infecté par *Mycoplasma ovis*, on a une hémagglutination [Scott et al, 2003].

En présence du sérum dilué au 1/10^e, les hématies infectées par *Mycoplasma ovis* s'agglutinent alors que si elles sont saines il ne se passe rien ; on considère donc que la réponse à ce test est positive lorsqu'on a une réaction d'hémagglutination à une dilution du sérum d'au moins 1/10^e. [Scott, 2003] [Sheriff et Geering, 1969]

Il faut noter que la réponse est positive uniquement lors de la première phase de bactériémie, et pas au cours des suivantes [Scott et al, 2003].

Parfois on peut observer une agglutination spontanée des hématies ovines nettoyées (à 37°C) chez des animaux en incubation ou au début de la phase de bactériémie, mais cela est rare.

En 1969, la fiabilité de ce test a été évaluée, grâce à 3 séries de tests effectuées sur de jeunes ovins :

- une avec des animaux infectés de façon expérimentale,
- une avec des animaux infectés naturellement ; ces animaux ont été choisis parmi des troupeaux pour lesquels on avait identifié l'hémoplasme ovin (pathologie se manifestant tous les ans),
- la dernière était un dépistage de l'infection sur des troupeaux touchés par des retards de croissance (conditions de terrain) : 42 troupeaux, 1072 individus prélevés.

Chez tous ces animaux, on a réalisé des frottis sanguins colorés au Giemsa, et on a effectué le test de Coombs, avec plusieurs dilutions du sérum contenant les antiglobulines : 1/10, 1/20, 1/40. Pour obtenir des témoins négatifs, on a mélangé le sérum à une solution saline. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI pour les animaux infectés de façon expérimentale, et dans le tableau VII pour ceux qui ont été infectés naturellement.

● Animaux infectés expérimentalement :

Tableau VI : résultats obtenus au test de Coombs modifié par Sheriff, en fonction du statut infecté/non infecté, et des différentes phases de l'infection (d'après [Sheriff et Geering, 1969])

	1 ^{ère} phase de bactériémie				2 ^e et 3 ^e phase de bactériémie			
	Nb d'animaux	Nb de tests	Résultats +	Résultats -	Nb d'animaux de tests	Nb de tests	Résultats +	Résultats -
Non infectés								
Sensibles (*)	27	71	3 (4%)	68 (96%)				
Non sensibles (*)	6	60	3 (5%)	57 (95%)				
Sensibilité non évaluée	53	273	30 (11%)	243 (89%)				
Infectés lors de l'étude (ou récemment infectés)								
Animaux en incubation	15	29	1 (3%)	28 (97%)				
15 premiers jours de bactériémie	42	106	78 (74%)	28 (26%)				
Fin de la bactériémie	21	35	28 (80%)	7 (20%)	13	16	10 (62%)	6 (38%)
15 premiers jours après la bactériémie	39	74	44 (59%)	30 (41% ^o)	6	9	5 (55%)	4 (45%)
2-6 semaines après la bactériémie	30	81	31 (38%)	50 (62%)	6	7	1 (16%)	6 (84%)
>6 semaines après la bactériémie	20	56	16 (28%)	40 (72%)	3	8	1 (13%)	7 (87%)

(*) La sensibilité des animaux a été évaluée a posteriori.

Les réponses positives au test ne sont obtenues en moyenne qu'entre J7 et J14 post-infection, donc à un moment où les hémoplasmes sont déjà visibles sur les frottis. De plus, la plupart des moutons ayant présenté peu avant une infection active à *Mycoplasma ovis* ont eu une réponse positive à ce test. On a eu des résultats négatifs en cas d'absence d'hémoplasme, pendant l'incubation, en début de bactériémie, et lors de portage latent.

- Animaux infectés de façon naturelle :

Tableau VII : mise en évidence de l'hémoplasme ovin par observation de frottis et par le test de Coombs modifié, pour 2 troupeaux infectés naturellement (d'après [Sheriff et Geering, 1969])

	Troupeau A		Troupeau B	
	Présence de Réponse <i>M. ovis</i> sur les positive au test frottis		Présence de Réponse <i>M. ovis</i> sur les positive au test frottis	
Août	0	0	0	0
Septembre	2 (15%)	3 (23%)	0	3 (11%)
12 octobre	7 (12%)	13 (23%)		
18 octobre			0	5 (15%)
30 octobre	2 (4%)	11 (19%)		
14 novembre	15 (26%)	15 (26%)		
15 novembre			1 (3%)	4 (11%)
27 novembre	8 (14%)	24 (41%)		
11 décembre	4 (7%)	4 (7%)		
20 décembre			1 (3%)	2 (6%)
1 ^{er} janvier			0	0
3 janvier	6 (11%)	1 (2%)		
17 janvier	2 (4%)	1 (2%)		
15 février	2 (4%)	7 (14%)		
12 mars	0	18 (32%)		
10 avril	2 (4%)	17 (29%)		
5 mai	0	5 (15%)		
6 juin	0	4 (8%)		

Pour le troupeau A, le taux d'infection était élevé, et les prélèvements sanguins ont été effectués fréquemment, ce qui a permis de mettre en évidence des phases de bactériémie secondaire chez certains animaux. Chaque phase de bactériémie s'accompagne d'une réponse positive au test de Coombs modifié, mais la durée de cette réponse diminue avec le numéro de bactériémie (de même que le titre).

Le troupeau B a été moins fortement infecté, donc on possède peu de données.

Ces résultats sont difficiles à interpréter, car on ne sait pas à quel moment a eu lieu l'infection. Si l'on tente de les exploiter en extrapolant les résultats de la série 1 à la série 2, on peut dire que dans les troupeaux où *Mycoplasma ovis* est absent ou inactif, on a au minimum 90% de réponses négatives au test ; pour les troupeaux qui connaissent une infection active, le pourcentage de réponses positives varie selon l'incidence, et peut dépasser 40%.

- Dépistage de *Mycoplasma ovis* au sein des troupeaux touchés par des retards de croissance :

On a observé les frottis des animaux appartenant aux troupeaux pour lesquels on avait plus de 10% des réponses positives, et on a mis en évidence une activité de l'hémoplasme.

Ce test de Coombs modifié par Sheriff détecte la présence des hémoplasmes plus tardivement que ne le permet la simple observation sur des frottis sanguins colorés au Giemsa, mais on a des réponses qui sont encore positives après la période où on peut observer *Mycoplasma ovis* en microscopie optique.

L'atout majeur de ce test est de pouvoir mettre en évidence la présence de l'hémoplasme lorsque celui-ci ne peut plus être observé sur les frottis [Sheriff et Geering, 1969].

c) PCR

Pour dépister la présence des hémoplasmes, on cherche à mettre en évidence une séquence appartenant au gène codant pour l'ARNr 16S, dont la séquence est très conservée et qui comporte des caractéristiques spécifiques pour différencier cet organisme des groupes phylogénétiquement apparentés [Vandervoort et al, 2001].

Or, ces séquences sont très proches au sein des mycoplasmes, donc le diagnostic d'espèce est parfois difficile [Mc Auliffe et al, 2006].

c1. PCR suivie d'une électrophorèse

En 2001 a été publiée une étude pour valider cette méthode : on a comparé les résultats de la PCR avec l'observation de frottis sanguins colorés au Giemsa (observation à objectif x1000). Le protocole utilisé est présenté en annexe 5.

Au préalable, on a soumis à ce test un échantillon sanguin provenant d'un animal chez lequel on a observé *Mycoplasma wenyonii* sur le frottis, afin de vérifier que le fragment amplifié est de la taille attendue. On a ensuite renouvelé le test, en diluant le prélèvement de départ au 1/10^e puis au 1/50^e, afin d'estimer sa sensibilité. On a obtenu un résultat positif pour la dilution au 1/10^e, mais négatif pour celle au 1/50^e.

Les animaux entrés dans l'étude étaient séparés en 2 groupes :

- groupe 1 = 95 bovins issus de troupeaux comprenant des animaux qui présentaient des symptômes évocateurs d'une infection par l'hémoplasme. On a observé l'hémoplasme sur les frottis de 2 animaux. Une PCR a été effectuée sur tous les animaux du groupe, et a donné un résultat positif pour ces 2 animaux, mais également pour un 3^e individu ; pour ces 3 animaux, aucune anémie n'a été mise en évidence. Une fois que les résultats de PCR étaient négatifs, on n'a plus mis en évidence chez eux d'hémoplasmes sur les frottis.

La comparaison des séquences obtenues avec celles de GenBank a confirmé qu'il s'agissait bien de *Mycoplasma wenyonii*.

- groupe 2 : 96 taureaux

On a observé l'hémoplasme bovin chez 3 taureaux, qui ont répondu positivement à la PCR (et la comparaison avec GenBank a été effectuée). De même que pour le groupe 1, on n'a pas mis en évidence d'anémie, et aucun hémoplasme n'a été observé suite à la négativation des résultats de la PCR.

A la fin de l'étude, une nouvelle PCR a été effectuée sur tous les individus du groupe 2 (sauf 4 d'entre eux qui ont été sortis de l'étude) : on a eu 2 positifs, et l'un d'entre eux appartenait au même lot que l'un des 3 taureaux positifs au cours de l'étude. Pour ces 2 animaux, les frottis étaient négatifs, il n'y avait pas d'anémie, et aucun signe clinique évocateur.

Pour expliquer le fait que pour ces 2 animaux le résultat, négatif au départ, soit devenu positif à la fin de l'étude : il pourrait s'agir d'une nouvelle infection au cours de l'étude, ou l'infection aurait pu être déjà présente au début mais pas détectée.

Bilan :

La PCR semble être une méthode diagnostique efficace : en effet, les 5 animaux chez lesquels on a observé des hémoplasmes sur leur frottis ont eu un résultat positif avec cette méthode. La PCR pourrait même être plus sensible que l'observation au microscope optique, car pour 3 animaux les résultats en PCR étaient positifs alors qu'on ne voyait pas d'hémoplasmes sur les frottis.

Certes, il faut rester conscient qu'on peut avoir des faux négatifs en PCR, notamment si le nombre d'hémoplasmes dans la circulation sanguine est insuffisant, ou si ceux-ci sont séquestrés dans certains organes (comme le foie, la rate...).

Dans cette étude, le choix d'amorces spécifique de *Mycoplasma wenyonii* (en se basant sur la séquence du gène codant pour l'ARNr16S, disponible sur GenBank) ainsi que la comparaison des séquences amplifiées avec la séquence de *Mycoplasma wenyonii* sur GenBank, ont permis de s'affranchir du risque de faux positifs, vis-à-vis des autres parasites sanguins, et également vis-à-vis des autres mycoplasmes [Vandervoort et al, 2001].

En 2006, Mc Auliffe et ses collaborateurs ont publié une étude portant sur l'intérêt d'associer la technique de la DGGE (électrophorèse en gradient de dénaturation) à la PCR dans le diagnostic des hémoplasmoses. Avant eux, d'autres auteurs avaient décrit cette technique pour le dépistage et la distinction rapides des espèces du genre *Mycoplasma*, mais son utilisation n'était pas répandue. En particulier, c'est une méthode qui est adaptée aux situations d'infection mixte, et à l'identification d'espèces nouvelles ou inhabituelles. En théorie, elle permet de détecter la mutation d'une seule base d'ADN. Mais c'est une technique complexe, qui est plutôt réalisée dans les laboratoires de recherche que dans les laboratoires de diagnostic clinique.

Cette technique utilise des amorces bactériennes universelles, donc on devrait être capable d'identifier n'importe quelle espèce pathogène du sang, telles que *Anaplasma*, *Ehrlichia*, et pourquoi pas découvrir de nouvelles espèces d'hémoplasmes...

Mc Auliffe et ses collaborateurs ont voulu voir si la DGGE permettait de reconnaître l'ADN de *Mycoplasma wenyonii* dans des prélèvements sanguins. Ils ont choisi 3 vaches provenant d'un même troupeau, avec des symptômes évocateurs d'une infection à *Mycoplasma wenyonii*, sans qu'on puisse observer l'agent pathogène sur les frottis. A partir d'un prélèvement sanguin, une PCR a été effectuée, suivie d'une DGGE pour chacune de ces 3 vaches. On a réalisé en parallèle l'expérience avec des espèces témoins de mycoplasmes bovins. (figure 28)

Pour les 3 bovins testés on obtient une bande identique (toutefois moins marquée pour la séquence test n°2), différente de celles observées sur les pistes 1 à 4 (qui correspondent aux espèces témoins de mycoplasmes bovins).

Le séquençage a été effectué et comparé avec la séquence de l'ADN codant pour l'ARNr 16S appartenant à *Mycoplasma wenyonii* : on a obtenu 99% d'homologie.

Selon les auteurs, cette méthode de PCR suivie de la DGGE devrait être effectuée chez tous les animaux présentant des symptômes évoquant l'hémoplasmosse bovine (au Royaume-Uni, il y a eu d'autres cas similaires sans qu'on ait pu en identifier l'étiologie). Il est tout à fait possible

que l'hémoplasmose bovine soit sous-estimée, vu qu'on ne dispose pas de tests diagnostiques fiables [Mc Auliffe et al., 2006].

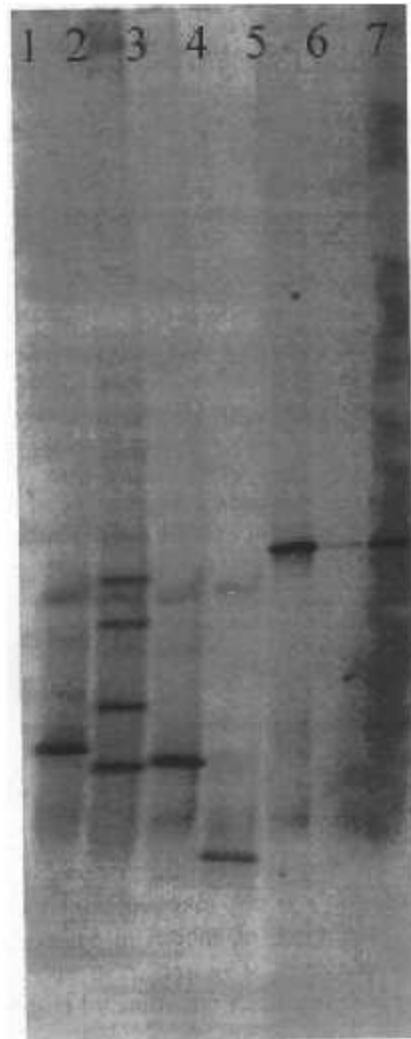


Figure 28 : résultats obtenus suite à la PCR et la DGGE par Mc Auliffe et ses collaborateurs

1 : *Mycoplasma bovis* NCTC 10131

5 : Séquence test n°1

2 : *Mycoplasma bovirhinis* NCTC 10118

6 : Séquence test n°2

3 : *Mycoplasma canis* NCTC 10146

7 : Séquence test n°3

4 : *Mycoplasma alkalescens* NCTC 10135

c2. essai d'une technique de PCR pour dépister les lamas et alpagas porteurs de

« *Candidatus Mycoplasma haemolamae* »

Les séquences utilisées pour amplifier le fragment d'ADN codant pour l'ARNr16S de « *Candidatus Mycoplasma haemolamae* » sont disponibles sur GenBank (n°AF306346) ; elles n'amplifient que le matériel génétique de cette espèce, et pas des espèces de mycoplasmes qui en

sont pourtant proches. La limite de détection par cette méthode est de 1 bactérie pour $3,8.10^9$ à $7,7.10^9$ hématies.

On a inoculé à 8 alpagas (*Lama pacos*) du sang provenant d'un alpaga infecté naturellement.

Les 8 alpagas ont développé une bactériémie détectable à la PCR au moins 2 jours avant qu'on puisse observer l'hémoplasme dans les hématies sur un frottis.

On a administré un traitement à base de tétracyclines à 4 d'entre eux, et on a observé que pour 3 individus on avait des résultats positifs à la PCR de façon intermittente, qui pour l'un d'entre eux s'accompagnait d'une intermittence quant à l'observation de l'hémoplasme sur les frottis.

Pour les 4 alpagas qui n'ont pas été traités, on a observé des résultats positifs intermittents en PCR chez 2 animaux (sans hémoplasmes visibles sur les frottis sanguins) [Tornquist et al, 2002].

2. Diagnostic experimental indirect

a) technique d'héماغglutination indirecte

Elle a été décrite pour la première fois en 1969, pour le dépistage de l'infection à *Mycoplasma wenyonii* [Finerty et al, 1969]

Pour isoler un antigène utilisable pour ce test, on a purifié des hématies portant à leur surface *Mycoplasma wenyonii*, puis on a séparé les bactéries des érythrocytes, et elles ont été inactivées grâce à des ultrasons. On a mis en présence les hémoplasmes inactivés avec des hématies ovines saines ; il suffisait ensuite d'ajouter le sérum des animaux à tester, et ensuite de lire le titre 3h, puis 12h plus tard.

Afin d'évaluer la spécificité de cette technique, on a effectué en parallèle un test d'inhibition de l'héماغglutination (kit trouvé dans le commerce) contenant des hématies de mouton. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VIII.

L'inhibition de l'héماغglutination a été effectuée sur des veaux infectés par *Anaplasma marginale*, ainsi que des canards infectés par *Plasmodium berghei* et des souris infectées par

Plasmodium lophurae. On a obtenu des résultats négatifs en effectuant l'hémagglutination sur des veaux infectés par *Anaplasma marginale*, des souris infectées par *Plasmodium lophurae* et des canards infectés par *Plasmodium berghei*. Cela prouve qu'il n'y a pas de réaction sérologique croisée entre ces différentes espèces et *Mycoplasma wenyonii*.

Tableau VIII : comparaison des titres obtenus avec l'hémagglutination et l'inhibition de l'hémagglutination, chez des bovins atteints et des bovins sains ; d'après [Finerty et al, 1969]

Titre	Sérums des bovins à tester		Sérum de bovin non infecté : hémagglutination
	Hémagglutination	Inhibition de l'hémagglutination	
8	++++	++++	-
16	++++	+++	-
32	++++	+	-
64	++++	+/-	-
128	+++	-	-
256	+	-	-
512	+/-	-	-
1024	-	-	-

Les titres obtenus avec l'inhibition de l'hémagglutination sont inférieurs à ceux qui ont été lus lors du test d'hémagglutination : cela montre que le test d'hémagglutination est spécifique.

On a ensuite cherché une relation entre la bactériémie (observée sur les frottis), la réponse au test d'hémagglutination, et la valeur de l'hématocrite. (tableau IX)

Tableau IX : recherche d'une corrélation entre le résultat obtenu au test d'hémagglutination, la valeur de l'hématocrite, et l'observation des frottis sanguins ; d'après [Finerty et al, 1969]

	Hématocrite (%)	Présence (+) ou absence (-) d'hémoplasmes sur les frottis sanguins
+	19	+
+	20	+
+	19,5	+
+	19	+/-
+	22,5	+
+	37	-
-	29,5	+
+	23,5	+
+	24	+
-	34,5	+
+	37	+
-	45	+
-	37	+
-	33	+
+	Non évalué	+

Lorsque la bactériémie augmente, le titre en anticorps augmente et l'hématocrite diminue. Cela peut s'expliquer par le fait qu'on a en même temps une anémie et une stimulation antigénique.

Pour 6 veaux de l'étude, on a eu des résultats incohérents entre l'hémagglutination et l'observation des frottis :

- pas d'hémoplasmes sur le frottis et pourtant réponse positive au test : on peut avoir déjà dépassé le pic de bactériémie

- présence d'hémoplasmes sur le frottis mais réponse sérologique négative : on est au pic de bactériémie, mais il n'y a pas encore de production d'anticorps (ou alors elle est insuffisante).

Ce test pourrait être utilisé dans le diagnostic de l'hémoplasmosse bovine [Finerty et al, 1969].

b) technique de fixation du complément

Elle a été décrite par Daddow en 1977. On obtient des titres en anticorps dès le 3^e jour suivant l'apparition des symptômes, et pendant une période de 2 à semaines. Le résultat au test de fixation du complément devient négatif au bout de 80 jours en moyenne ; cette technique ne permet donc pas de dépister les individus porteurs chroniques [Nicholls et Veale, 1986b] [Radostits et al, 2007].

c) technique d'immunofluorescence indirecte

Elle a été développée pour la première fois pour le diagnostic de l'infection par *Mycoplasma ovis*, en 1967 par Ohder, puis en 1978 par Ilemobade et Blotkamp [Nicholls et Veale, 1986a].

En 1986, Nicholls et Veale ont effectué une étude au cours de laquelle ils ont suivi l'évolution des titres en anticorps au cours d'une infection expérimentale. Ils ont utilisé des plaques sur lesquelles étaient fixées des hématies portant à leur surface *Mycoplasma ovis*. Ils ont alors ajouté le sérum des ovins à tester, puis du sérum de lapin contenant des anticorps reconnaissant les IgG de moutons et marqués grâce à une fluorescéine. (tableau X)

On a pu détecter des titres en anticorps à partir de J7 post-inoculation (en moyenne), en même temps qu'on a commencé à observer *Mycoplasma ovis* sur les frottis. Le titre en anticorps maximal a été observé en moyenne à J35, (alors que sur les frottis c'est autour de J14 que la bactériémie était maximale), lorsque la bactériémie avait chuté à une valeur de 21%. Jusqu'à J63, les animaux ont conservé un titre anticorps de 106 en moyenne, sans qu'on puisse voir d'hémoplasmes sur les frottis. Après J63, les titres IFI ont commencé à chuter.

Tableau X : évolution au cours du temps (J0=inoculation) des valeurs moyennes de la bactériémie, des titres obtenus à l'IFI de l'hématocrite et de la concentration en hémoglobine, chez 21 agneaux infectés expérimentalement par *Mycoplasma ovis* ; d'après [Nicholls et Veale, 1986b]

Résultat au test d'héماغلutation	Hématocrite (%)	Présence (+) ou absence (-) d'hémoplasmes sur les frottis sanguins
+	19	+
+	20	+
+	19,5	+

La méthode décrite ici présente un intérêt limité en début d'infection, puisqu'elle ne possède une sensibilité que très légèrement supérieure à celle de l'observation des frottis sanguins colorés au Giemsa. En revanche, elle devient particulièrement intéressante après 28 jours d'infection, puisque sur les frottis on n'observe plus *Mycoplasma ovis*, alors qu'avec la méthode IFI les titres sont maintenus au moins 56 jours (on a même pu mettre en évidence des titres anticorps chez un mouton infecté 10 ans ½ plus tôt grâce à cette méthode).

La méthode IFI décrite par Nicholls et Veale est plus sensible que celle décrite par Ilemobade et Blotkamp : en effet, ici on a mis en évidence des titres de 51 000 alors qu'en 1978 le titre maximal qui avait été détecté était de 640.

De plus, cette méthode possède l'avantage d'être rapide, à condition d'avoir préparé à l'avance les lames portant les antigènes et les sérums témoins.

La méthode IFI pourrait avoir 2 applications principales (dans le cadre des études expérimentales) :

- le suivi de l'infection : en effet cette méthode est utilisable pendant la phase de bactériémie,
- la détermination du statut infecté ou sain [Nicholls et Veale, 1986b].

d) technique ELISA

En 1987 a été publiée une étude pour déterminer si l'hémoplasme *Mycoplasma ovis* isolé pouvait être utilisé comme antigène pour le test ELISA. Cette étude avait concerné 3 ovins adultes : un sain, un infecté naturellement et le dernier infecté de façon expérimentale. L'individu sain et l'individu infecté expérimentalement, prélevé avant l'inoculation, ont servi de témoins négatifs. Des frottis ont été réalisés et observés, ainsi que la technique IFI décrite en 1986 par Nicholls et Veale, afin de comparer les résultats obtenus avec la technique ELISA.

L'antigène utilisé était l'hémoplasme ovin entier (*Mycoplasma ovis* séparé des hématies grâce à la méthode décrite par Ferrier et Nicholls en 1986).

Grâce à cette étude, on a pu déterminer que la dilution idéale de l'antigène était de 1/500, et que celle du conjugué était de 1/20 000. Pour les sérums témoins positifs, on a obtenu des titres de 1 :25 600 avec l'ELISA, alors qu'avec l'IFI on avait obtenu 1 :3 200 ; on peut donc dire que la méthode ELISA serait 8 fois plus sensible que l'IFI.

Il faudrait réaliser des études concernant un plus grand nombre d'animaux pour pouvoir évaluer la spécificité de l'ELISA, et ainsi déterminer si cette technique est vraiment fiable pour détecter les anticorps dirigés contre *Mycoplasma ovis* [Lang et al, 1987].

C. Diagnostic différentiel

L'infection par les hémoplasmes peut être confondue chez les bovins et les ovins avec **l'ehrlichiose granulocytaire**, à *Ehrlichia phagocytophila*, une maladie vectorielle, essentiellement transmise par des tiques du genre *Ixodes*. On note une hyperthermie, et une baisse d'immunité qui peut se traduire par des signes respiratoires (toux d'été), une apathie, des avortements, des mammites, de l'infertilité chez le mâle, mais jamais d'anémie. La prophylaxie et le traitement sont identiques pour l'ehrlichiose granulocytaire et les hémoplasmoses [Joncour, 2008].

Parmi les affections entraînant une anémie régénérative, on peut inclure dans le diagnostic différentiel :

- les anémies par diminution du volume total sanguin :
 - hémorragie
 - externe
 - digestive : ulcère de la caillette
 - pulmonaire : thrombose de la veine cave postérieure avec embolie pulmonaire
 - urinaire : hématurie essentielle, pyélonéphrite
 - par hypocoagulabilité : thrombopénie, déficit en facteurs de la coagulation
 - parasitisme interne très marqué : *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* (ovins), *Ostertagia ostertagi* (bovins), *Fasciola hepatica*
 - parasitisme externe : tiques et poux suceurs
- les anémies hémolytiques :
 - causes bactériennes : anaplasmose, theileriose, leptospirose, (hémoglobinurie bacillaire)
 - causes parasitaires : babésiose, trypanosomose
 - causes toxiques : intoxication chronique au cuivre (surtout chez les ovins et les veaux), intoxication par les crucifères (présence de corps de Heinz dans les hématies), les oignons, la mercuriale, ail, les phénothiazines, l'eau (plutôt chez les veaux)
 - causes auto-immunes : chez le veau de moins de 6 mois ; très rare
 - anémies à médiation immune : survient parfois chez l'agneau nourri avec du colostrum bovin
[Radostits et al, 2007]

Les affections entraînant un retard de croissance doivent également faire partie du diagnostic différentiel :

- causes alimentaires :
 - ration trop pauvre en énergie ou en protéines
 - carence en cobalt, cuivre, zinc, sodium, chlorure, potassium, sélénium, phosphore, vitamine D, calcium
 - animal dominé

- pertes de protéines et de glucides :
 - néphropathies chroniques
 - parasitisme
- malabsorption/maldigestion : diarrhée (*Ostertagia*, *Nematodirus*, *Trichostrongylus*, *Chabertia*, *Cooperia*, *Oesophagostomum*, *Fasciola hepatica*, coccidiose, sarcosporidiose, paratuberculose) [Radostits et al, 2007].

VII. Traitement des hémoplasmoses chez les ruminants

Selon certains auteurs, comme Sheriff, le traitement des animaux présentant une bactériémie serait discutable, car ces animaux peuvent être réinfectés, ou rester porteurs chroniques [Glenn Songer et Post, 2005].

A. Traitement causal

1. Antibiotiques

Les hémoplasmes possèdent une résistance naturelle vis-à-vis des bêta-lactamines : en effet, cette famille d'antibiotiques agit en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne, et les hémoplasmes sont dépourvus de paroi.

Gretillat déconseille l'usage de la streptomycine et des tétracyclines. Cependant pour de nombreux autres auteurs, l'oxytétracycline est la molécule de choix [Scott, 2003].

L'oxytétracycline, injectée par voie intramusculaire à la dose de 3mg/kg, permet une amélioration clinique chez le mouton en 24h, lorsqu'elle est administrée de façon précoce. En cas d'infection chronique, cette molécule aura peu d'effet [Radostits et al, 2007]

En tout état de cause, il n'y a pas de guérison bactériologique et l'animal peut rechuter dans les mois suivants. On pense que les hémoplasmes seraient séquestrés dans certains organes lors du traitement [Welles et al, 1995a].

Pour évaluer l'efficacité du traitement à l'oxytétracycline chez le lama, une étude a été menée en 1990. Quatre animaux infectés naturellement ont été traités avec cette molécule et ont également reçu des vitamines et du fer. On a constaté que l'hématocrite est revenu à une valeur normale en 2 à 3 semaines, pour 3 de ces 4 lamas. Malheureusement deux animaux ont dû être euthanasiés, un autre est mort 25 jours après son admission [Reagan et al, 1990].

Une autre étude a été réalisée en 2002, chez 8 alpagas infectés de façon expérimentale et dont le statut infectieux a été suivi au moyen d'une PCR. Parmi ces 8 animaux, 4 ont reçu un traitement à base de tétracyclines ; parmi les animaux traités, on a observé des résultats positifs à la PCR, de façon intermittente ; on a observé la même chose pour 2 des individus non traités.

Cela semble montrer que le traitement avec une tétracycline ne permet pas une suppression totale de la bactériémie chez les camélidés [Tornquist et al, 2002].

On sait que les macrolides sont actifs sur les mycoplasmes non hémotropes ; en revanche rien n'a été publié concernant leur activité sur les hémoplasmes.

2. Chlorpromazine

Cette phénothiazine permettrait de traiter les infections par les hémoplasmes, lorsqu'elle est injectée en intramusculaire, à une posologie de 2 à 3 mg par kg, à renouveler au bout d'une semaine [Scott, 2003].

3. Dérivés arsenicaux

Ils étaient utilisés autrefois, avant l'emploi des antibiotiques. Leur action semble incomplète, puisque Neitz affirme que le néosalvarsan entraîne une disparition de *Mycoplasma ovis* sur les frottis, mais qu'on les voit réapparaître après 16 jours ; si on utilise une dose supérieure, la disparition est plus rapide (15 minutes) mais ils réapparaissent également. L'emploi de néoarsphénamine, à la dose de 30mg/kg, a également été décrit.

Les composés antimoine-arsenic permettaient une diminution de la bactériémie, et selon certains auteurs pouvaient même permettre une guérison bactériologique s'ils étaient administrés à forte dose. Sheriff préconisait l'utilisation du « Spirotrypan Forte », et Hung conseillait d'utiliser du dipropionate d'imidocarbe ; ce dernier composé n'empêchait pas la réapparition de *Mycoplasma ovis* en 2 à 4 semaines à la surface des hématies. On utilisait également l'Antimosan (6mg/kg) [Scott et Woldehiwet, 1993] [Radostits et al, 2007].

B. Traitement adjuvant

L'administration de vitamines B6, B12 et de fer favorise l'érythropoïèse [Gretillat, 1985].

VII. Prophylaxie

Les bonnes pratiques d'élevage semblent être un élément-clé dans la prévention de *Mycoplasma ovis* [Scott et al, 2003].

A. Prophylaxie sanitaire

1. Lutte contre les vecteurs

⊕ Moustiques :

- lutte chimique : organophosphorés, carbamates (téméphos)
- lutte écologique : suppression des sites larvaires, par drainage
- lutte biologique :
 - * introduction de prédateurs naturels des moustiques : poissons, larves de diptères se nourrissant des larves de moustiques,
 - * introduction d'agents pathogènes affectant les moustiques : nématodes, champignons, protozoaires, virus, bactéries [Cachereul, 1997].

⊕ Mouches (Stomoxys), Tabanidés et poux :

Stomoxys calcitrans est une mouche piqueuse hématophage, cosmopolite et ubiquiste ; elle a une activité diurne

- dans le milieu extérieur : insecticides sur les murs des locaux : il faut un effet insecticide très fort et une rémanence importante ; il faut y ajouter la destruction des fumiers (=gîte larvaire), qui permet de limiter la population de *Stomoxys calcitrans*

- sur les animaux :

- * pulvérisation de pyréthrinoïdes de synthèse (2-3 applications de 200 à 500ml de produit, sur l'été) : perméthrine, cyperméthrine, deltaméthrine, fenvalérate, cyhalothrine,
- * aérosols : fenvalérate,
- * boucles auriculaires (bovins) : organophosphorés (tétrachlorvinphos, diazinon), pyréthrinoïdes de synthèse (perméthrine, deltaméthrine, cyperméthrine, fenvalérate, flucythrinate),

- * adhésifs insecticides à placer sur les boucles d'identification (bovins) : cyhalothrine
- * pour-on : pyréthrinoïdes (perméthrine, deltaméthrine, cyperméthrine, cyhalothrine, cyfluthrine), avermectines (ivermectine, doramectine, éprinomectine) [Franc, 1997].

⊕ **Tiques** : il existe plusieurs types de lutte (qui peuvent être utilisés conjointement)

- lutte chimique : la fréquence et le moment des traitements doit tenir compte du cycle de vie de la tique, et de la rémanence du produit utilisé. Toutes les espèces de tiques pouvant transmettre les hémoplasmes appartiennent à la famille des *Amblyommidae* (super famille des *Ixodoïdae*). Ces tiques possèdent deux stades immatures et un stade adulte [Gretillat et Gevrey, 1983]. *Rhipicephalus bursa* est exophile et possède un cycle dixène monotrope. On peut trouver cette espèce dans les prairies herbeuses, à la lisière des bois.

Les acaricides disponibles sont :

- * parmi les pyréthrinoïdes : perméthrine, deltaméthrine, cyperméthrine, fenvalérate, fluméthrine,
- * l' amitraz,
- * parmi les lactones macrocycliques : ivermectine, doramectine, éprinomectine, moxidectine, abamectine [Bourdeau, 1997].

-lutte écologique :

* rotation des pâtures : pour qu'elle ait un intérêt il faut savoir combien de temps la tique peut survivre sans repas sanguin ; il faut également tenir compte du climat : en zone tempérée, le cycle des tiques est très long donc il faudrait empêcher l'accès à un champ pendant plusieurs années (difficilement réalisable). Dans nos régions, on préférera le retrait des animaux pendant les saisons à tiques des prés connus pour héberger des tiques

* modification du biotope de la tique : modification de la végétation (en brûlant les broussailles par exemple), drainage...

* zéro pâturage : les pâtures infestées deviennent des parcelles utilisées pour la production de fourrages

- lutte biologique : introduction de prédateurs de la tique : oiseaux, certaines espèces de fourmis [Bourdeau, 1997].

2. Respect des bonnes pratiques d'élevage

Cela consiste en une ration équilibrée, supplémentée avec des minéraux (en particulier des sels de fer et de cuivre), en une minimisation des facteurs de stress (surtout au moment du sevrage), une lutte efficace contre le parasitisme...

3. Mesures d'assainissement

- abattage des animaux infectés, y compris des brebis donnant naissance à des agneaux infectés,

- les brebis qui ont donné naissance à des agneaux sains peuvent être conservées, mais il est prudent de vérifier qu'elles présentent des titres d'Ac élevés [Scott, 2003],

- pour assainir un troupeau infecté : ne pas oublier de changer d'aiguille lors des vaccinations et des prises de sang, et de changer de gant de fouille entre chaque vache [Smith et al, 1990],

- s'il y a une forte prévalence de cas cliniques dans un troupeau, il est recommandé de traiter les agneaux entre 10 et 21 jours, et de traiter les brebis au 3^e mois de gestation, afin d'éviter la transmission transplacentaire ; les antennes seront traitées au sevrage, puis à l'âge de 8 à 9 mois.

Ces mesures sont plutôt appliquées dans les grandes régions d'élevage ovin extensif, telles que l'Australie ou la Nouvelle Zélande [Loubes, 1993].

B. Prophylaxie médicale

Celle-ci demeure illusoire car les moutons atteints peuvent rechuter suite à leur guérison (jusqu'à 5 fois) : donc l'immunité spécifique contre *Mycoplasma ovis* n'est pas durable [Overäs, 1969].

Conclusion

Les hémoplasmes sont des bactéries de petite taille, avec un génome court et des capacités de biosynthèse limitées. Ce sont donc des organismes simples en apparence, mais peu d'études leurs sont consacrées car ils sont impossibles encore à cultiver. Par conséquent les connaissances les concernant sont encore limitées. Après 60 ans d'inclusion dans la famille des *Anaplasmataceae*, les nouvelles techniques de typage génétique ont entraîné leur reclassification chez les *Mycoplasmataceae*, genre *Mycoplasma*.

Cliniquement, les animaux infectés ne présentent le plus souvent pas de symptômes, et dans le cas contraire, les symptômes rencontrés sont peu marqués et peu spécifiques. Une exception est faite de l'hémoplasmose ovine qui, chez l'agneau au sevrage, peut entraîner des anémies sévères, parfois mortelles, ou transformer l'animal en non-valeur économique en provoquant un retard de croissance important.

Le stress auquel est soumis l'animal et les conditions d'élevage, telles que l'alimentation ou l'hygiène, favorisent le développement de la clinique chez l'« hôte ». Ces conditions délabrantes sont également responsables d'une large part de l'impact économique et clinique supposé des hémoplasmes, ce qui fait relativiser leur impact réel en clinique.

Par conséquent, ce sont des maladies qui sont peu recherchées actuellement en Algérie; leur prévalence n'est donc pas connue. Certes plusieurs études épidémiologiques ont été menées en Australie, mais les résultats ne peuvent pas vraiment être extrapolés étant donné les différences de mode d'élevage.

Le diagnostic clinique reste en général difficile, tout comme le diagnostic expérimental direct par observation au microscope optique. En revanche, les autres techniques de diagnostic expérimental semblent offrir des possibilités intéressantes, mais elles ne sont pas utilisées, ni développées en routine.

Bibliographie

- ADLER S., ELLENBOGEN V. (1934)
A note on two new blood parasites of cattle, *Eperythrozoon* and *Bartonella*.
J. Comp. Pathol., **47**: 119-221
- ALAGILLE D., COLOMBANI J., DAUSSET J., FINE J.M., JOSSO F. (1972)
Techniques hématologiques diverses.
In : Techniques en hématologie.
Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 15-99
- ALMY F.S., LADD S.M., SPONENBERG D.P., CRISMAN M.V., MESSICK J.B. (2006)
Mycoplasma haemolamae infection in a 4-day-old cria : support for *in utero* transmission by use of a polymerase chain reaction assay.
Can. Vet. J., **47** (3): 229-233
- BARRINGTON G.M., PARISH S.M., TYLER J.W. (1997)
Chronic weight loss in an immunodeficient adult llama.
J. Am. Vet. Med. Assoc., **211** (3) : 294-298
- BOURDEAU P. (1997)
La lutte contre les agents de gale et contre les tiques des ruminants.
Point Vét., **28** (N° spécial : Parasitologie des ruminants) : 155-166
- BRUN-HANSEN H., GRØNSTØL H., SELVEIT P.H., WALDELAND H. (1997a)
Prevalence of Antibodies to *Eperythrozoon ovis* in Norwegian Sheep.
J. Vet. Med. B, **44** : 307-308
- BRUN-HANSEN H., GRØNSTØL H., WALDELAND H., HOFF B. (1997b)
Eperythrozoon ovis Infection in a Commercial Flock of Sheep.
J. Vet. Med. B, **44** : 295-299
- BURKHARD M.J., GARRY F. (2004)
Artifactual hypoglycaemia associated with hemotropic mycoplasma infection in a lamb.
Vet. Clin. Pathol., **33** (4) : 244-248
- CACHEREUL A.I. (1997)
Les moustiques: cycle de développement, aspects anatomo-physiologiques et régulation du cycle ovarien.
Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes, 117p.
- CITTI C. (2006)
Les mycoplasmes : stratégies d'adaptation et de persistance de bactéries minimales.
Nouv. Prat. Vét. Elevages Santé, (3) : 15-21
- DADDOW K.N. (1979a)
The transmission of a sheep strain of *Eperythrozoon ovis* to goats and the development of a carrier state in the goats.
Aust. Vet. J., **53** : 605
- DADDOW K.N. (1979b)
The natural occurrence in a goat of an organism resembling *Eperythrozoon ovis*.
Aust. Vet. J., **53** : 605-606
- DADDOW K.N. (1979c)
Eperythrozoon ovis – a cause of anaemia, reduced production and decreased exercise tolerance in sheep.
Aust. Vet. J., **55** : 433-434

- DADDOW K.N. (1980)
Culex annulirostris as a vector of *Eperythrozoon ovis* infection in sheep.
Vet. Parasitol., **7** : 313-317
- DADDOW K.N. (1981)
 The duration of the carrier state of *Eperythrozoon ovis* infection in sheep.
Aust. Vet. J., **57** : 49
- DADDOW K.N. (1982)
 The protection of lambs from *Eperythrozoon* infection while suckling *Eperythrozoon ovis* carrier ewes.
Vet. Parasitol., **10** (1) : 41-45
- DONATIEN A., LESTOQUARD F. (1935)
 Existence d'*Eperythrozoon ovis* en Algérie.
Bull. Soc. Pathol. Exot., **28** : 423-426
- DOXEY D.L. (1977)
 Haematology of the ox
 In : Archer R.K., Jeffcott L.B. *Comparative Clinical Haematology*. 1st edition.
 Blackwell Scientific Publications, Oxford, 215-269
- EUZEBY J.P. (2005) (Page consultée pour la dernière fois le 29 septembre 2008)
 List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature LPSN (formerly List of Bacterial names), [en ligne]
<http://www.bacterio.cict.fr/>
- FINERTY J.F., HIDALGO R.J., DIMOPOULLOS G.T. (1969)
 A Passive Hemagglutination Procedure for the Detection of *Eperythrozoon* Infection in Calves.
Am. J. Vet. Res., **30** (1?) : 43-45
- FISHER D.J., ZINKL J.G. (1996)
 Eperythrozoonosis in a one-day-old llama.
Vet. Clin. Pathol., 1996, **25** (3) : 93-94
- FOGGIE A., NISBET D.I. (1964)
 Studies on *Eperythrozoon* infection in sheep.
J. Comp. Path., **74** : 45-61
- FOOTE L.E., LEVY H.E., TORBERT B.J., OGLESBY W.T. (1957)
 Interference Between Anaplasmosis and Eperythrozoonosis in Splenectomized Cattle.
Am. J. Vet. Res., **18** : 556-559
- FOWLER M.E. (1989)
 Hemic and Lymphatic Systems
 In : *Medicine and Surgery of South American Camelids*
 Iowa State University Press, Ames, 263-272
- FRANC M. (1997)
 La lutte chimique contre les mouches responsables de nuisances chez les bovins.
Point Vét., **28** (N°spécial : Parasitologie des ruminants) : 147-153
- GLENN SONGER J., POST K.W. (2005)
 The Genera *Mycoplasma* and *Ureaplasma*
 In : *Veterinary Microbiology. Bacterial and fungal agents of animal diseases*.
 Saunders Elsevier, St-Louis, 305-317

- GOFF W.L., JOHNSON L.W., KUTTLER K.L. (1986)
Anaplasma marginale, *Eperythrozoon wenyoni*: Lectin reactions with bovine erythrocytes.
Exp. Parasitol., **61** (1) : 103-113
- GREENWOOD B. (1977)
Haematology of the sheep and goat.
In : Archer R.K., Jeffcott L.B. Comparative Clinical Haematology. 1st edition.
Blackwell Scientific Publications, Oxford, 305-344
- GRETILLAT S. (1985)
Considérations sur l'Eperythrozoonose ovine. Son importance en France.
Bull. Acad. Vét. Fr., **69** (5) : 331-345
- GRETILLAT S., GEVREY J. (1983)
Note préliminaire sur l'anémie infectieuse des agneaux à *Eperythrozoon ovis*, (Neitz, Alexander et Du Toit, 1934) en France.
Méd. Vét., 1983, **134** (7) : 399-405
- GRETILLAT S., BERNARD J. (1987)
L'éperythrozoonose ovine – Etude clinique effectuée sur un troupeau de l'Ouest de la France.
Bull. Acad. Vét. Fr., **71** : 359-365
- GULLAND F.M., DOXEY D.L., SCOTT G.R. (1987a)
The effects of *Eperythrozoon ovis* in sheep.
Res. Vet. Sci., **43** : 85-87
- GULLAND F.M., DOXEY D.L., SCOTT G.R. (1987b)
Changing morphology of *Eperythrozoon ovis*.
Res. Vet. Sci., **43** : 88-91
- HARBUTT P. (1969)
The effect of *Eperythrozoon ovis* infection on body weight gain and haematology of lambs in Victoria.
Aust. Vet. J., **45** : 500-504
- HAWKEY C.M., DENNETT T.B. (1989)
A colour atlas of comparative veterinary haematology.
Wolfe Medical Publications, London, 192p.
- HOELZLE L.E. (2008)
Haemotropic mycoplasmas : recent advances in *Mycoplasma suis*.
Vet. Microbiol., **130** (3-4) : 215-226
- HOFMANN-LEHMANN R. et al. (2004)
Concurrent Infections with Vector-Borne Pathogens Associated with Fatal Hemolytic Anemia in Cattle Herd in Switzerland.
J. Gen. Microbiol. **42** (8) : 3775-3780
- HOYTE H. (1971)
The infectivity of *Theileria mutans*, *Eperythrozoon wenyoni* and *E. tejanodes* to sheep and of *E. ovis* to cattle.
Br. Vet. J., **127** : lv-lvii
- HUNG A.L., LLOYD S. (1989)
Role of the spleen and rosette-formation response in experimental *Eperythrozoon ovis* infection.
Vet. Parasitol., **32** (2-3) : 119-126

- ICHIJOS-HOSOKAWA S., KIM D.H., KONISHI T. (1982)
Scanning and transmission electron microscopic observations of *Eperythrozoon ovis*.
Japan. J. Vet. Sci., **44** : 127-132
in : [Marie, 1986]
- JONCOUR G. (2008)
L'ehrlichiose granulocytaire ovine en France.
Bull. Acad. Vét. Fr., **161** (2) : 131-138
- JORGENSEN W.K., WALDRON S.J. (1994)
Use of in vitro culture to isolate *Babesia bovis* from *Theileria buffeli*, *Eperythrozoon wenyoni* and *Anaplasma* spp.
Vet. Parasitol., **53** : 45-51
- KABAY M.J., RICHARDS R.B., ELLIS T.E. (1991)
A cross-sectional study to show *Eperythrozoon ovis* infection is prevalent in Western Australian sheep farms.
Aust. Vet. J., **68** (5) : 170-173
- KREIER J.P., RISTIC M. (1963)
Morphologic, Antigenic, and Pathogenic Characteristics of *Eperythrozoon ovis* and *Eperythrozoon wenyoni*.
Am. J. Vet. Res., **24** : 488-500
- KREIER J.P., GOTHE R. (1976)
Aegyptianellosis, eperythrozoonosis, grahamellosis and haemobartonellosis.
Vet. Parasitol., **2** : 83-95
- LANG F.M., FERRIER G.R., NICHOLLS T.J. (1986)
Separation of *Eperythrozoon ovis* from erythrocytes.
Vet. Rec., **119** : 359
- LANG F.M., FERRIER G.R., NICHOLLS T.J. (1987)
Detection of antibodies to *Eperythrozoon ovis* by the use of an enzyme-linked immunosorbent assay.
Res. Vet. Sci., **43** : 249-252
- LOUBES T. (1993)
Les maladies transmises par les tiques chez les ovins.
Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 221p.
- LOVE J.N., MC EWEN E.G. (1972)
Hypoglycemia Associated with *Haemobartonella*-like Infection in Splenectomized Calves.
Am. J. Vet. Res., **33**: 2087-2089
- LOVE J.N., WILSON R.P., MC EWEN E.G., WIYGUL G. (1977)
Metabolism of [¹⁴C]Glucose in *Haemobartonella*-like Infected Erythrocytes in Splenectomized Calves.
Am. J. vet. Res., **38** : 739-741
- MARIE V. (1986)
L'épérythrozoonose ovine.
Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 59p.
- MASON R.W., CORBOULD A., STATHAM P. (1989a)
A serological survey of *Eperythrozoon ovis* in goats and sheep in Tasmania.
Aust. Vet. J., **66** (4) : 122-123

- MASON R.W., CORBOULD A., STATHAM P. (1989b)
Experimental *Eperythrozoon ovis* infection in goats.
Aust. Vet. J., 1989, **66** (7) : 221-222
- MASON R.W., STATHAM P. (1991a)
The determination of the level of *Eperythrozoon ovis* parasitaemia in chronically infected sheep and its significance to the spread of infection.
Aust. Vet. J., **68** (3) : 115-116
- MASON R.W., STATHAM P. (1991b)
Susceptibility of sheep and goats to *Eperythrozoon ovis* infection.
Aust. Vet. J., **68** (3) : 116-117
- MC AULIFFE L., LAWES J., BELL S., BARLOW A., AYLING R., NICHOLAS R. (2006)
The detection of *Mycoplasma* (formerly *Eperythrozoon*) *wenyonii* by 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis.
Vet. Microbiol., **117** : 292-296
- MC KEE A.E., ZIEGLER R.F., GILES R.C. (1973)
Scanning and Transmission Electron Microscopy of *Haemobartonella canis* and *Eperythrozoon ovis*.
Am. J. Vet. Res., **34** (9) : 1196-1201
- MC LAUGHLIN B.G., EVANS C.N., MC LAUGHLIN P.S., JOHNSON L.W., SMITH A.R., ZACHARY J.F. (1990)
An Eperythrozoon-like parasite in llamas.
J. Am. Vet. Med. Assoc., **197** (1) : 1170-1175
- MC LAUGHLIN B.G., MC LAUGHLIN P.S., EVANS C.N. (1991)
An *Eperythrozoon* - like parasite of llamas: attempted transmission to swine, sheep, and cats.
J. Vet. Diagn. Invest., **3** : 352-353
- MESSICK J.B. (2004)
Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential.
Vet. Clin. Pathol., **33**(1): 2-13
- MESSICK J.B., WALKER P.J., RAPHAEL W., BERENT L., SHI X. (2002)
“*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*” sp. nov., “*Candidatus Mycoplasma haemolamae*” sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **52**: 693-698
- MONTES A.J., WOLFE D.F., WELLES E.G., TYLER J.W., TEPE E. (1994)
Infertility associated with *Eperythrozoon wenyonii* infection in a bull.
J. Am. Vet. Med. Assoc., **204** (2) : 261-263
- MOULDER J.W. (1974)
The rickettsias
In : Buchanan R.E., Gibbons N.E. Bergey’s manual of determinative bacteriology. 8th edition.
Williams & Wilkins Company, Baltimore, 882-928
- MURRAY R.G.E., STACKEBRANDT E. (1995)
Taxonomic note: Implementation of the Provisional Status *Candidatus* for Incompletely Described Procaryotes.
Int. J. Syst. Bact., **45**(1): 186-187

- NASH A.S., BOBADE P.A. (1993)
Haemobartonellosis
In : Woldehiwet Z., Ristic M. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Pergamon Press, Oxford, 89-110
- NEIMARK H., KOCAN K.M. (1997)
The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a *Mycoplasma*.
FEMS Microbiol. Lett., **156** : 287-291
- NEIMARK H., JOHANSSON K.E., RIKIHISA Y., TULLY J.G. (2001)
Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **51**: 891-899
- NEIMARK H., JOHANSSON K.E., RIKIHISA Y., TULLY J.G. (2002)
Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **52**, 683
- NEIMARK H., HOFF B., GANTER M. (2004)
Mycoplasma ovis comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **54** : 365-371
- NEIMARK H., PETERS W., ROBINSON B.L., STEWART L.B. (2005)
Phylogenetic analysis and description of *Eperythrozoon coccoides*, proposal to transfer to the genus *Mycoplasma* as *Mycoplasma coccoides* comb. nov. and Request for an Opinion.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **55** : 1385-1391
- NEITZ W.O. (1940)
Eperythrozoonosis in Cattle.
Onderstepoort J. Vet. Sci. anim. Ind., **14** (1-2) : 9-24
- NEITZ W.O., ALEXANDER R.A., DU TOIT P.J. (1934)
Eperythrozoon ovis (sp.nov.) infection in sheep.
Onderstepoort J. Vet. Sci. anim. Ind., **3**(2): 263-271
- NICHOLLS T.J., VEALE P.I. (1986a)
The prevalence of *Eperythrozoon ovis* infection in weaner and adult sheep in north eastern Victoria.
Aust. Vet. J., **63** (4) : 118-120
- NICHOLLS T.J., VEALE P.I. (1986b)
A modified immunofluorescent assay for the detection of antibody to *Eperythrozoon ovis* in sheep.
Aust. Vet. J., **63** (5) : 157-159
- NICHOLLS T.J., VEALE P.I., OVEREND D. (1989)
The effect of artificial *Eperythrozoon ovis* infection on the growth rate of stressed and non-stressed sheep.
Aust. Vet. J., **66** (6): 184-186
- OVERÄS J. (1969)
Studies of *Eperythrozoon ovis* infection in sheep.
Acta Vet. Scand., Suppl 28, 128p
- OVERÄS J. (1987)
Haemoglobinuria in *Eperythrozoon* infected sheep.
Vet. Rec., **121** : 277

- POOLE D.B.R., CUTLER R.S., KELLY W.R., COLLINS J.D. (1976)
Eperythrozoon wenyoni anaemia in cattle.
Vet. Rec., **99** : 481
- QUINN P.J., MARKEY B.K. (2003)
 Mycoplasmas
 In : Concise Review of Veterinary Microbiology
 Blackwell Publishing, Oxford, 64-65
- RADOSTITS O.M., GAY C.C., HINCHCLIFF K.W., CONSTABLE P.D., (2007a)
 Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th edition.
 Saunders Elsevier, Edinburgh, 2156p
- REAGAN W.J., GARRY F., THRALL M.A., COLGAN S., HUTCHISON J., WEISER M.G. (1990)
 The Clinicopathologic, Light, and Scanning Electron Microscopic Features of Eperythrozoonosis in Four Naturally Infected Llamas.
Vet. Pathol., **27** : 426-431
- RIKIHISA Y., KAWAHARA M., WEN H., KOCIBA G., FUERST P., KAWAMORI F., SUTO C., SHIBATA S., FUTOHASHI M. (1997)
 Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*.
J. Clin. Microbiol., **35** : 823-829.
- SCOTT G.R. (2003)
 Eperythrozoonoses porcine et ovine
 In : Lefevre P.C., Blancou J., Chermette R. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail, Europe et régions chaudes. Tome 2. Maladies bactériennes. Mycoses. Maladies parasitaires.
 Tec & Doc, Paris, 839-850
- SCOTT G.R., WOLDEHIWET Z. (1993)
 Eperythrozoonoses
 In : Woldehiwet Z., Ristic M. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Pergamon Press, Oxford, 111-129
- SHERIFF D., GEERING M.C. (1969)
 The antiglobulin (Coombs) test in *Eperythrozoon ovis* infection in sheep.
Aust. Vet. J., **45** : 505-507
- SMITH J.A., THRALL M.A., SMITH J.L., SALMAN M.D., CHING S.V., COLLINS J.K. (1990)
Eperythrozoon wenyonii infection in dairy cattle.
J. Am. Vet. Med. Assoc., **196** (8) : 1244-1250
- STOFFREGEN W.C., ALT D.P., PALMER M.V., OLSEN S.C., WATERS W.R., STASKO J.A. (2006)
 Identification of a haemomycoplasma species in anemic reindeer (*Rangifer tarandus*).
J. Wildl. Dis., **42** (2) : 249-258
- SUTTON R.H. (1977)
 The effect of *Eperythrozoon ovis* infection on the glucose level and some acid-base factors in the venous blood of sheep.
Aust. Vet. J., **53** : 478-481
- TAGAWA M., MATSUMOTO K., INOKUMA H. (2008)
 Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in a cattle in Hokkaido, Japan.
Vet. Microbiol., 2008, **132** (1-2) : 177-180

- TORNQUIST S.J., BOEDER L.J., PARKER J.E., CEBRA C.K., MESSICK J.B. (2002)
Use of a polymerase chain reaction assay to study the carrier state in infection with camelid *Mycoplasma haemolama*, formerly *Eperythrozoon spp.* infecting camelids.
American Society for Veterinary Clinical Pathology, 37th annual meeting, New Orleans, 153-154
- UILENBERG G., THIAUCOURT F., JONGEJAN F. (2004)
On molecular taxonomy: what is in a name?
Exp. Appl. Acarol., **32** : 301-312
- UILENBERG G., THIAUCOURT F., JONGEJAN F. (2006)
Mycoplasma and *Eperythrozoon* (*Mycoplasmataceae*). Comments on a recent paper.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **56** : 13-14
- VANDERVOORT J.M., BOURNE C., CARSON R.L., HEATH A.M., BOUDREAUX M.K. (2001)
Use of a polymerase chain reaction assay to detect infection with *Eperythrozoon wenyonii* in cattle.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 2001, **219** (10) : 1432-1434
- WELLES E.G., TYLER J.W., WOLFE D.F. (1995a)
Hematologic and semen quality changes in bulls with experimental eperythrozoon infection.
Theriogenology, **43** : 427-437
- WELLES E.G., TYLER J.W., WOLFE D.F., MOORE A. (1995b)
Eperythrozoon infection in young bulls with scrotal and hindlimb edema, a herd outbreak.
Theriogenology, **43** : 557-567
- WHITHEAR K.L., BROWNING G.F. (2004)
Mycoplasma
In : Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G., Thoen C.O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3rd edition.
Blackwell Publishing, Ames, 397-414
- WILLI B., BORETTI F.S., TASKER S., MELI M.L., WENGI N., REUSCH C.E., LUTZ H., HOFMANN-LEHMANN R. (2007)
From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights.
Vet. Microbiol., **125** (3-4) : 197-209
- ZWART D., SCHOTMAN A.J.H., STRAVER A.J.M. (1970)
Metabolic Changes during *Eperythrozoon* infection in Cattle.
Res. Vet. Sci., **11** : 105-111

Annexe 1

Coloration de May-Grünwald-Giemsa : protocole

- ➡ **Fixation** : verser 10 à 15 gouttes de colorant de May-Grünwald en solution, et attendre 3 minutes
- ➡ **Coloration proprement dite** :
 - Ajouter autant de gouttes d'eau tamponnée qu'on a versé de gouttes de May-Grünwald, puis homogénéiser pendant 2 à 3 minutes
 - Jeter le colorant May-Grünwald, et verser 5 gouttes de colorant de Giemsa diluées dans 10ml d'eau tamponnée (veiller à tourner la face du frottis vers le bas, sinon des précipités risquent de venir s'y déposer). Attendre 20 minutes, puis rincer la lame à l'eau distillée, et sécher à l'air.

[Alagille et al, 1972]

Annexe 2

Valeurs usuelles de l'hémogramme chez les bovins

Valeurs usuelles de l'hémogramme rouge chez le veau entre la naissance et 1 an (d'après [Doxey, 1977])

	Hématies ($10^{12}/l$)	Hématocrite (%)	[Hémoglobine] (g/dl)	VCM (fl)	TCMH (pg)	CCMH (g/dl)	% réticulocytes
Naissance	8,38	43	12,5	51,3	14,9	29,1	0,2
1 semaine	8,04	36,3	11,1	45,1	13,8	30,5	0,05
1 mois	8,06	33,7	10,4	41,8	12,9	30,8	
3 mois	8,36	33	10,9	39,4	13	33	0,02
6 mois	8,06	36,1	11,7	44,8	14,5	32,4	0
1 an	7,57	35,9	9,7	47,4	12,8	27	0
Veau de lait	Naissance	7,68	39,3	12,3	51,2	16	31,2
	3 mois	6,65	23,6	7,4	35,4	11,1	31,3
	4 mois 1/2	6,74	27	9	40	13,3	33,3

Valeurs usuelles de l'hémogramme blanc chez le veau entre la naissance et 1 an (d'après [Doxey, 1977])

	Leucocytes ($10^9/l$)	Neutrophiles ($10^9/l$)	Lymphocytes ($10^9/l$)	Monocytes ($10^9/l$)	Eosinophiles ($10^9/l$)	Basophiles ($10^9/l$)
Naissance	9,4	6,2	2,8	0,3	0,09	0
1 semaine	7,46	3,8	3,4	0,2	0,06	0
3 mois	9,3	2,5	6	0,6	0,2	0
1 an	9,9	2,5	6,5	0,65	0,25	0

Valeurs usuelles et moyennes des paramètres de l'hémogramme chez les bovins adultes (d'après [Doxey, 1977])

	Moyenne	Intervalle des valeurs usuelles
Hématies ($10^{12}/l$)	7	5-9
Hématocrite (%)	32	24-40
[Hémoglobine] (g/dl)	11	8-14
VCM (fl)	50	40-60
TCMH (pg)	14	11-17
CCMH (g/dl)	32	30-36
Leucocytes ($10^9/l$)	7	5-10
Neutrophiles ($10^9/l$)		
Lymphocytes ($10^9/l$)	4,05	1,8-7,5
Monocytes ($10^9/l$)	0,3	0,08-0,7
Eosinophiles ($10^9/l$)	0,65	0-2
Basophiles ($10^9/l$)	0	0

Annexe 3

Valeurs usuelles de l'hémogramme chez les ovins

	Moyenne	Intervalle des valeurs usuelles
Hématies ($10^{12}/l$)	12	9-15
Hématocrite (%)	33	26-42
[Hémoglobine] (g/dl)	12	8-16
VCM (fl)	32	28-40
TCMH (pg)	10	8-12
CCMH (g/dl)	33	31-38
Leucocytes ($10^9/l$)	8	4-12
Neutrophiles ($10^9/l$)	2,4	
Lymphocytes ($10^9/l$)	5	
Eosinophiles ($10^9/l$)	0,32	
Basophiles ($10^9/l$)	0,03	
Monocytes ($10^9/l$)	0,25	
Plaquettes ($10^9/l$)	450	250-750

(d'après [Greenwood, 1977])

Annexe 4

Valeurs usuelles de l'hémogramme chez le lama

	< 1 mois	2 à 6 mois	6 à 18 mois	Adultes
Hématies (10 ⁹ /ml)	9,8-14,2	10,6-17,2	10,8-15,9	9,9-17,7
Hématocrite (%)	24-36	27-43	26-41	25-46
[Hémoglobine] (g/dl)	10,1-15,4	11,6-18,2	11-17,9	11,5-19,5
VCM (fl)	21,7 -26,3	20,8-29,3	22-28,2	22-30,1
TCMH (pg)	8,9-11,2	9,4-12,3	9,3-12,3	9,8-12,7
CCMH (g/dl)	39-44,8	39,8-46	39,4-46,4	37,7-49
Leucocytes (10 ⁶ /ml)	5,4-20,1	8-23,5	8,9-24,8	7,5-20,9
Neutrophiles (10 ⁶ /ml)	1-15,7	2,8-14,6	4-14	3,1-15,3
Lymphocytes (10 ⁶ /ml)	1,2-5	1,5-9,9	1,5-7,9	0,7-4,8
Monocytes (10 ⁶ /ml)	0-1,3	0-1,2	0-1,2	0-1
Eosinophiles (10 ⁶ /ml)	0-1	0-2,2	0-6,2	0-4,5
Basophiles (10 ⁶ /ml)	0-0,1	0-0,2	0-0,3	0-0,3

[Fowler, 1989]

Annexe 5

Exemple de protocole de PCR pour la détection de *Mycoplasma wenyonii* dans un échantillon sanguin

PCR puis électrophorèse, d'après [Vandervoort et al, 2001]

➤ Milieu réactionnel :

- 50 µl d'un mélange contenant 2,5 U de Taq-polymérase, une solution de MgCl₂ à 1,5mM (tampon), et les 4 désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) chacun à une concentration de 200 µM,
+ 2 µl de MgCl₂ à 25mM
- + 4 µl d'une solution à 40mM contenant les amorces spécifiques d'un fragment de 567 pb du gène codant pour le fibrinogène γ du bovin (afin de vérifier que la PCR s'est bien déroulée, et que l'échantillon contient de l'ADN bovin)
➤ amorce sens : 5'-CCTCCGAGTGTAATCTTCTAC-3'
➤ amorce anti-sens : 5'-TGGCTTTGATGGTTGATCAGG-3'
- + 4 µl d'une solution à 40mM contenant les amorces spécifiques d'un fragment de 299 pb sur le gène codant pour l'ARNr16S de *Mycoplasma wenyonii*
➤ amorce sens : 5'-GGTGGTATGCATAACACATGC-3'
➤ amorce anti-sens : 5'-CCGTAGGAATATGGGCCATAT-3'
- + 39 µl d'eau
- + 1 µl d'ADN purifié (à tester), obtenu à partir d'un prélèvement sanguin (extrait grâce à un kit du commerce).

➤ Etapes de l'amplification de l'ADN :

- Dénaturation : par chauffage à 94°C pendant 10 minutes
- Hybridation : 30 cycles successifs
- 1 cycle = 94°C pendant 1 minute, puis 45°C pendant 1 minute, et enfin 72°C pendant 2 minutes
- Extension : 72°C pendant 7 minutes
-

➤ Electrophorèse en fin de réaction (pour vérifier que le fragment amplifié possède la taille attendue :

Le gel utilisé est un gel d'agarose à 1,5% ; après l'électrophorèse, il est coloré avec du bromure d'éthidium et observé sous lumière UV

➤ Séquençage du fragment de 299 pb, extrait du gel d'agarose ; puis comparaison avec la séquence sur GenBank