

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE HADJ LAKHDAR –BATNA-1 INSTITUT DES
SCIENCES VETERINAIRES ET DES SCIENCES
AGRONOMIQUES



THESE

Pour l'obtention du diplôme de
DOCTORAT EN SCIENCES VETERINAIRES

Option

Pathologie générale des ruminants

Présentée par : OUCHERIAH Yasmine

Thème

***ETUDES DES MYCOPLASMOSES
RESPIRATOIRES BOVINES DANS L'EST
ALGERIEN***

Membres de jury

Grade et Université

Président : AYACHI AMAR

Prof. Université Hadj Lakhdar- Batna-1

Examinatrice: AIT-AOUDHIA KHATIMA

Prof. Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire-Alger

Examineur: ELGROUD RACHID

Prof. Université Frère Mentouri – Constantine-1

Examinatrice: KHEDOUMA ASMA

MCA. Université Abbes Laghrour - Khanchla

Rapporteur: HELEILI NOUZHA

Prof. Université Hadj Lakhdar- Batna-1

Co-rapporteur: CLAIRE BECKER

MC. Université Claude Bernard – Lyon-1-France

Invité : ADILI NEZAR

MCA. Université Hadj Lakhdar- Batna-1

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

A la mémoire de mes grands-parents...Zaidi mouhamed saleh et Bagou djigdjigua

Je tiens tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience pour accomplir ce modeste travail.

Je tiens aussi à remercier respectivement :

Ma directrice de thèse, professeur Heleili Nouzha de l'Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques de l'université de Batna 1, qui a bien voulu accepter la supervision du présent sujet de thèse pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.

Mon Co-Encadreur Claire Becker maître de conférences à l'Université de Lyon 1, VetAgro Sup, Anses, UMR Mycoplasmoses Animales. Je tiens vraiment à la complimenter, car c'est grâce à elle que ce travail a vu le jour, de même que le laboratoire de l'UMR où une partie de la pratique a été réalisée.

Madame Florence Tardy, chargée de recherche à l'Anses, Directrice adjointe de l'UMR Mycoplasmoses Animales, Université de Lyon, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition les meilleures conditions pour la réussite de ce travail.

Monsieur, le professeur Ayachi Ammar de l'Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques de l'université de Batna 1, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de soutenance de cette thèse. Il a été d'un grand soutien dans l'élaboration de ce travail.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux membres du jury :

Professeur Elgroud Rachid du département des Sciences Vétérinaires - Université frère mentouri Constantine 1.

Professeur Ait Oudhia Khatima - l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire - El Harrach, Alger.

Dr Khedouma Asma du département de biologie - Université Abbes Laghrour de Khenchela.

Dr Belkadi Souhila du département des Sciences Vétérinaires-Université de Batna 1.

Mes remerciements vont à Dr Adili Nezar de l'Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques de l'université de Batna, qui m'a beaucoup aidé dans le volet statistique, je tiens à le complimenter pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Un grand merci à l'équipe du laboratoire Anses, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses Animales et université de Lyon, France ; Colin Adélie, Catherine Mottet et Agnès Tricot pour l'assistance technique, pour leur disponibilité, leurs aides précieuses et pour le temps dépensé dans la réalisation de ce travail.

Ma gratitude s'adresse également à l'ensemble du personnel du Laboratoire National de Référence de la Fièvre Aphteuse d'Anses-Maisons-Alfort (France), et en particulier Labib Bakkali Kassimi, pour les analyses des prélèvements préalables à l'étude.

Je remercie aussi Monsieur Mihoubi Mohamed Aimene du Laboratoire de (LBMBPC) Université de Batna 2, pour sa disponibilité, pour le temps qu'il nous a consacré et pour

sa gentillesse.

Je remercie tous les enseignants de l'Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques- Université Batna 1, qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Je tiens aussi à remercier très chaleureusement et en particulier mes chères amies : Assia Guendouze, Rima koulaibi pour leurs orientations, leurs conseils et leurs aides précieuses et surtout leur patience dans la réalisation de ce travail.

Mes plus vifs remerciements aux soldats du terrain, les docteurs vétérinaires :

Houas Ridha, Kara Said, Belaifa Kheir Eddine, Oucief Azzedine, Laib Samir, Laamraoui Rayen, Sahraoui Zineb, Boudjnah Asma, khadidja, Aggoun Maria, Dr Arbaoui, Dr Benhadid, Dr. Oussama, Guettaf Belkacem Fadi, Chafik (khanchla), Dr Merci, Dr Boughris, Dr Benturki, pour leur aide précieuse pour pouvoir avoir accès aux fermes et réaliser les prélèvements nécessaires sur le terrain au niveau des régions d'études.

Mes sincères remerciements à Madame Ben yahiya Lamia, chef de service des échanges interuniversitaire et de la coopération, vice rectorat des relations extérieures, pour son professionnalisme, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont aidé dans ce modeste travail ; Dr Douaïssia Samira inspectrice à la DSV Alger, le Docteur Smadi Mustapha Adnane chercheur au (CRBT), Dr Kaseh Raouf, Guidoum Azzedine, Otmani khawla, koulaibi Rima, Monsieur Raouf (Lind Gaz Constantine) et mr Saada bendina le directeur de l'espace vétérinaire.

Je remercie vivement Monsieur Ali Zine, Enseignant à l'université de Biskra, pour ses nombreux conseils, son grand soutien dans l'élaboration de ce travail et le support moral qu'il m'a donné tout au long de mon parcours universitaire, il était vraiment mon 2^{ème} père ici à Batna.

Je remercie infiniment tous mes amies qui m'ont apporté leur soutien et qui m'ont supporté pendant ces années d'études, surtout Souad, Meriem, Sameh, Rima, Rahma.

Enfin, un très grand merci à mes adorables parents surtout toi « ma vie », que Dieu vous garde et vous récompense, mes chers frères, ma belle-sœur, qui m'ont comblé de leur amour, et de leur soutien, vous êtes mes piliers dans cette vie.

A l'homme de ma vie qui a toujours su être à mes côtés dans les meilleurs moments comme dans les pires que dieu te garde pour moi....

A mon petit bout de chou, Mouhamed Tadj Eddine qui m'a accompagné presque dans toutes mes sorties sur le terrain, dans toutes mes souffrances et problèmes malgré son petit âge, j'espère qu'un jour tu seras fier de ta maman et tu deviendras un exemple d'homme comblé et que tu réussisses dans ta vie.

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ANSES :	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
ARNt :	Acides ribonucléiques de transfert
ATB :	Antibiotique
BPIE :	Bronchopneumonies infectieuses enzootiques
BoHV-1 :	Bovine herpesvirus 1
BVD :	Bovine Viral Diarrhea
PI3 :	Parainfluenza virus-3,
BRSV :	Bovine Respiratory Syncytial Virus
BAdV :	Bovine Adenovirus
BCV :	Bovine Corona Virus
C :	Cytosine
CLSI :	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI :	concentrations minimales inhibitrices
D.P.S. B :	Direction de la Programmation et du Suivi Budgétaire
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay
G :	Guanine
LBA :	Lavage broncho-alvéolaire
MF dot :	Membrane Filtration dot immunobinding
MLST :	Multilocus Sequence Typing
MRB :	Maladie respiratoire bovine
MADR :	Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
<i>M.bovis</i> :	<i>Mycoplasma bovis</i>
NR :	Non réalisé

OIE :	Office international des épizooties
PCR :	Polymerase Chain Reaction.
PPLO :	Pleuropneumonia-like organism
PSM :	Poste de sécurité microbiologique
QRDR :	Quinolone resistance determining regions
RNA :	Ribonucléique acide
rt-PCR :	real-time Polymerase Chain Reaction
S.A.H :	Systèmes Antigéniques Hypervariables.
SNP :	Single nucléotide polymorphism
ST :	Sous type Register
st :	Sous type <i>PolC</i>
TM :	Domaine transmembranaire hydrophobe
Vsps :	Variable surface proteins

Sommaire

Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Introduction	

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES MYCOPLASMES

I .1. Historique	1
I. 2 Classification et phylogénie	2
I .3. Variabilité antigénique	5
I .3.1. Mécanismes	5
I .3. 2. Conséquences	5
I .4. Caractères généraux des Mycoplasmes.....	6
I .5. Caractéristiques des mycoplasmes	8
II .6. Propriétés physiques et chimiques	11
II .7. Importance économique de l'infection mycoplasmaïque	11
II.8. Rôle des facteurs de l'environnement.....	11

CHAPITRE II

LES BRONCHOPNEUMONIES INFECTIEUSES ENZOOTIQUES (IMPLICATION DE *M. BOVIS*)

II.1. Recherches spécifiques de <i>M. bovis</i> comme agent étiologique de BPIE.....	14
II.2. Etiologie et signes cliniques	14
II.3. Diagnostic sérologique	15
II.4. Diagnostic bactériologique	15
II.4. 1. Culture bactériologique	15
II.4. 2. Identification par détection des antigènes	16
II.5. Identification moléculaire (Test PCR).....	17
II.6. Traitements des BPIE	19
II.7. Prévention	20

CHAPITRE III

ANTIBIORESISTANCE DE *M. BOVIS*

III.1. Résistance naturelle aux antibiotiques chez les mycoplasmes et évaluation.....	22
III. 2. Les tétracyclines	23
III.2.1. Leur mode d'action	23
III.2.2. La résistance chez les mycoplasmes	23
III. 3. Les macrolides	24
III.3.1. Leur mode d'action	24
III.3.2. La résistance chez les mycoplasmes	25
III.4. Les fluoroquinolones	25
III.4.1. Leur mode d'action	25
III.4.2 La résistance chez les mycoplasmes	26

PARTIE EXPÉRIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

I. 1. Matériels.....	27
I. 1.1. Récolte des échantillons sur des veaux en Algérie.....	27
I.1. 2. Présentation des régions d'étude	27
I. 1.3. Caractérisation des élevages et des animaux.....	29
I.2. METHODES	31
I. 2.1. Prélèvements.....	31
I. 2.2. Stockage et transport des échantillons.....	36
I. 2.3. Le dépistage sérologique par ELISA.....	36
I. 2.4. Le diagnostic bactériologique et moléculaire.....	39
I. 2.5. La Préculture.....	40
I. 2.6. L'extraction D'ADN à partir des LBA.....	40
I. 2.7. La Réaction de Polymérisation en Chaîne en Temps Réel (rt-PCR).....	42
I. 2.8. Le clonage des souches.....	44
I. 2.9. La filtration sur membrane DOT immunobinding (MF-Dot).....	44
I. 2.10. L'extraction d'ADN à partir des cultures	46
I. 2.11. PCR classique	49
I.2.12. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) chez <i>M. bovis</i>	50
I.2.13. Sous-typage et construction des arbres phylogénétiques	55
I. 2.14. Stock	55
I.3. Étude statistique et analyse des résultats	56

RESULTATS ET DISCUSSION

II. RESULTATS	58
II.1. Sérologie	58
II.1.1. Répartition des résultats sérologiques en fonction du type d'élevage	60
II.1.2. Répartition des résultats sérologiques en fonction des animaux malades et sains.....	61
II.1.3. Répartition des résultats sérologiques en fonction des régions d'études	63
II.1.4. Répartition des résultats sérologiques en fonction des animaux malades et sains dans les différentes régions d'études.....	64
II.1.5. Répartition des résultats sérologiques en fonction de la saison et de l'âge.....	64
II.1.5.2. Influence de l'âge sur la prévalence de <i>M. bovis</i>	67
II.2. Prévalence Globale des animaux Malades en fonction de la culture et de la rt-PCR.....	69
II.2.1. Détection par rt-PCR.....	70
II.2.1.1. Résultats de la rt-PCR selon les régions	72
II.2.1.2. Influence de la saison sur la prévalence de la rt-PCR de <i>M. bovis</i>	72
II.2.1.3. Influence de l'âge sur la prévalence de la rt-PCR de <i>M. bovis</i>	73
II.3. Culture	74
II.3.1 Détection de mycoplasmes en culture.....	74
II.3. 2. Identification des clones de <i>M.bovis</i>	77
II.3.3 La spécificité et la sensibilité des tests utilisés dans l'étude	80
II.3.4. Isolement des clones par rapport à la saison	84
II.4. Caractérisation génétique des clones algériens de <i>M. bovis</i>	85
II.4.1. Détermination du sous-type polC.....	85
II.4.2 : Analyse par MLST.....	87
II.5. Antibiorésistance des clones de <i>M. bovis</i>	98
Conclusion et recommandations.....	105
Annexes	
References	
Résumé	
Abstract	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des Mollicutes (Euzeby, 1997 ; Johansson et Pettersson, 2002). ...	3
Tableau 2 : Les mycoplasmes isolés chez les animaux (Nicolet, 1996).	10
Tableau 3: Comparaison des différentes techniques de diagnostic(Sachse <i>et al.</i> , 1993).....	18
Tableau 4 : Caractéristiques de trois familles d’antibiotiques utilisées chez les bovins et décrites dans l’étude de (Khalil, 2016).	22
Tableau 5 : Evolution du cheptel bovin (nombre de têtes) en Algérie et dans les wilayas de l’étude entre 2012 -et 2021 (MADR, 2021).	29
Tableau 6: Réactifs des réactions PCR.....	49
Tableau 7: Caractéristiques des amorces utilisées en PCR.	50
Tableau 8: Tableau qui montre les antibiotiques à tester et leurs concentrations.	51
Tableau 9: L’interprétation de la densité des Colonies pour chaque spot.....	54
Tableau 10: Proportions d'animaux séropositifs dans chaque type d'élevage.....	60
Tableau 11: Répartition des résultats sérologiques en fonction des régions d’études.	63
Tableau 12: La prévalence des animaux malades et sains positifs et négatifs par rapport aux régions d’études.	64
Tableau 13: La prévalence des animaux malades et sains positifs et négatifs par rapport à la saison.	65
Tableau 14: l’influence de la saison et de l’âge sur la séoprévalence chez les animaux malades.	65
Tableau 15 : l’influence de la saison et de l’âge sur la séoprévalence des animaux sains. ...	65
Tableau 16: L’influence de l’âge sur la séoprévalence chez les animaux malades.	67
Tableau 17: L’influence de la saison sur la séoprévalence chez les animaux sains.	68
Tableau 18: La prévalence des animaux malades et sains positifs et négatifs par rapport à la tranche d’âge.	68
Tableau 19: La détection par rt-PCR de divers pathogènes autre que <i>M.bovis</i>	71
Tableau 20: La prévalence de <i>M. bovis</i> chez les animaux malades détectés par rt-PCR dans les différentes régions d’étude.	72
Tableau 21 : Influence de la saison sur les résultats de la rt-PCR chez les animaux malades.	73
Tableau 22: Influence de l’âge sur la rt-PCR chez les animaux malades.	73
Tableau 23: Les méthodes utilisées pour la sélection et l’isolement des clones.....	77
Tableau 24: Tableau récapitulatif des différentes espèces de mycoplasmes isolées.....	78
Tableau 25: Sensibilité et spécificité de sérologie et de la culture par rapport à la rt-PCR pour <i>M.bovis</i>	81

Tableau 26: Le nombre de clones isolés en fonction de la saison.	84
Tableau 27: fréquence des sous-types polC des clones étudiés.	85
Tableau 28: Sous-typage MLST selon le schéma de Register pour 14 clones algériens sélectionnés dans les différentes régions de l'étude.	94
Tableau 29: tableau récapitulatif sur les résultats des CMI ($\mu\text{g/ml}$) des différents clones isolés.	99

Liste des figures

Figure 1: Historique de la découverte des mycoplasmes : Des « bactéries virus-like » (Razin <i>et al.</i> , 2010).	1
Figure 2: Arbre phylogénétique de la classe des Mollicutes.	4
Figure 3: Structure des mycoplasmes en microscopie électronique (G x 68.000)	7
Figure 4: Aspect typique d'"œufs sur le plat" des colonies de <i>M. bovis</i> (x40) (Maunsell et Donovan, 2009).	8
Figure 5: Caractéristiques structurales de <i>M. bovis</i> (Porret-Blanc, 2017).	9
Figure 6 : Le kit pour test Elisa utilisé dans ce travail (Anonyme.2).	15
Figure 7: Test MF-Dot (Lorin, 2008).	16
Figure 8: Carte Administrative de l'Algérie (Anonyme 3).	28
Figure 9: Organigramme de l'analyse sérologique.....	37
Figure 10: Différentes manipulations réalisées sur les LBA prélevés sur veaux malades.	39
Figure 11: Protocole simplifié de l'extraction d'acides nucléiques par le kit Bioextract Column.	42
Figure 12: Protocole simplifié d'extraction d'ADN à partir des cultures (kit Qiagen ,QIAamp DNA Mini Kit).	48
Figure 13: La prévalence Globale des animaux Malades et Sains.	62
Figure 14: prévalence globale de la culture des mycoplasmes chez les animaux malades.	74
Figure 15: Le nombre des clones isolés en fonction de la saison.	84
Figure 16: Alignement des séquences <i>polC</i> des clones algériens avec les souches de référence françaises (PG45, 15711 et 15527) pour la détermination des sous-types sur 411 bases.	86
Figure 17: l'arbre phylogénique des clones algériens réalisé à partir des séquences d'une portion du gène <i>polC</i>	87
Figure 18: PCR <i>pta2</i> visualisé sur QIAxcel.	88
Figure 19: Alignement des séquences des 14 clones algériens et des allèles de la base PubMLST (1 à 31) pour la portion du gène <i>gyrB</i> ,	90
Figure 20: Arbre phylogénétique des 14 clones algériens avec les allèles de Register (de 1 à 31) pour la portion du gène <i>gyrB</i>	91
Figure 21: Alignement des séquences d'une portion du gène <i>gyrB</i> pour l'allèle 13 et le clone 58M1.	92
Figure 22 : L'alignement de la séquence du clone 34M2 avec tous les allèles présents dans la base PubMLST (1 à 28) pour une portion du gène <i>pta2</i>	93
Figure 23: L'alignement des séquences de l'allèle 2 de <i>pta2</i> et de la séquence du clone 34M2.	94

Figure 24: Analyse eBURST des profils alléliques des clones algériens (ST4 ; ST8 ; ST29 ; ST188 ; ST195-198), comparés aux sous-types les plus proches trouvés dans la base de données PubMLST.....	95
Figure 25: Distribution des profils MIC de la spectinomycine, de la tylosine et de l'enrofloxacin pour 44 clones de <i>M. bovis</i>	101

Liste des photos

Photos 1: Fermes pilotes pour l'échantillonnage.....	30
Photos 2: Fermes mixtes pour l'échantillonnage.....	31
Photos 3: Introduction de la sonde.....	32
Photos 4: L'extériorisation de la langue indique un passage dans la trachée.	33
Photos 5: Sonde maintenue dans l'orifice nasal.	33
Photos 6: Injection du liquide physiologique (Na Cl 0,9%).	34
Photos 7: Ré-aspiration immédiate du liquide en dirigeant la sonde vers le bas.	35
Photos 8: Récupération du liquide (LBA).	35
Photos 9: Préparation des échantillons dans la carboglace pour les transporter en France.	36
Photos 10: Le kit IDVet (ID Screen ° <i>M. bovis</i> indirect).....	37
Photos 11: Le lecteur de microplaque à spectrophotomètre.	38
Photos 12: Tube de bouillon PPLO.	40
Photos 13: Le kit LSI VetMAX™ Screening Pack-Ruminant Respiratory Pathogens.	43
Photos 14: Le thermocycleur de (rt-PCR).	43
Photos 15: Différentes étapes du clonage.	44
Photos 16: Différentes étapes de la membrane de filtration DOT immunobinding (MF-Dot).	46
Photos 17: Un plan de plaque de dépôt sur fichier excel.....	52
Photos 18: L'ensemencement avec le multi-inoculateur.	53
Photos 19: séchage des boîtes sous PSM avant de les mettre dans l'étuve.	53
Photos 20: La loupe binoculaire.	54
Photos 21: comptage des colonies.	75
Photos 22: Taille et aspect des colonies.....	55
Photos 23: plaque pour MF-Dot, exemple de 5 souches.	76
Photos 24: Lecture de la plaque pour MF- Dot pour les 5 souches en exemple.....	76

Introduction

Introduction

La maladie respiratoire bovine (MRB), autrement appelée broncho-pneumonies infectieuses enzootiques (BPIE), est une maladie multifactorielle et associée à plusieurs agents infectieux (Fulton *et al.*, 2009 ; Panciera et Confer, 2010).

La MRB est due à divers agents pathogènes et est fortement favorisée par de mauvaises conditions environnementales (température basse, hygrométrie élevée, tirage important, présence d'ammoniac) et différents facteurs de risque, dont le stress, le transport, le brassage et les troubles nutritionnels (Taylor *et al.*, 2010).

Les agents infectieux couramment associés à la MRB sont des virus tels que l'herpèsvirus bovin de type 1 (BoHV-1), l'adénovirus bovin (BAdV), le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV), le coronavirus bovin (BCoV), le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) et le virus parainfluenza bovin (BPiV) (Cirone *et al.*, 2019). Ces virus sont généralement des agents pathogènes primaires obligatoires, et la plupart d'entre eux facilitent la surinfection par des agents pathogènes bactériens tels que *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, *Trueperella pyogenes* et *Mycoplasma (M.) bovis* (Pardon et Buczinski, 2020). *M. bovis* est reconnu comme une cause importante des maladies respiratoires, en particulier de la forme de pneumonie chronique (Maunsell et Donovan, 2009 ; Perez-casal, 2020).

Cet agent pathogène a été isolé pour la première fois aux États-Unis en 1961 à partir d'un cas de mammite sévère chez les bovins (Hale *et al.*, 1962). *M. bovis* est considéré comme l'un des principaux agents pathogènes émergents du bétail dans les pays industrialisés menaçant la production animale (Nicolas, 2011) et représentant d'importants impacts économiques et de pertes de production dans les industries bovines allaitante et laitière dans le monde (Nicholas et Ayling., 2003 ; Maunsell *et al.*, 2011). *M. bovis* a non seulement été confirmé comme un agent pathogène majeur dans les maladies respiratoires bovines, mais il provoque également des maladies chez les bovins de tous âges, telles qu'arthrite, otite moyenne, mammite et troubles de la reproduction (Nicholas, 2011).

M. bovis est considéré comme l'une des espèces les plus pathogènes du genre *Mycoplasma* et de la famille des Mycoplasmataceae au sein de la classe des Mollicutes (Brown *et al.*, 2015) De très petite taille, les mycoplasmes habitent généralement les muqueuses (appareils respiratoires, urogénitaux, gastro-intestinaux, yeux et glandes mammaires). Sans paroi, ils sont déformables et sont enveloppés par une membrane plasmique complexe, avec des protéines membranaires variables responsables de la capacité d'adaptation aux différents environnements (formation de biofilms, facteurs d'adhérences, infections chroniques (Potter et

Hogan, 2022).

Lors de MRB, le diagnostic de laboratoire est d'une importance cruciale pour un diagnostic étiologique précis. Les signes cliniques causés par les différents agents pathogènes ne sont pas pathognomoniques (Miles et Nicholas, 1998), la mise en évidence d'un agent en laboratoire est nécessaire pour affirmer que cet agent pathogène est responsable de la maladie. En effet, les signes cliniques observés lors de maladie due à *M. bovis* sont loin d'être spécifiques, le prélèvement d'échantillons est donc primordial afin de déterminer l'implication de cette bactérie. Les prélèvements par lavage broncho-alvéolaire (LBA) chez les veaux malades sont bien représentatifs des agents pathogènes impliqués dans la maladie, même s'ils sont plus difficiles à réaliser que les écouvillons nasaux. Un diagnostic rapide est nécessaire pour mettre en place des mesures efficaces contre *M. bovis* (Pfützner et al., 1996). La détection par culture et la détection moléculaire PCR en temps réel (rt-PCR) chez des veaux malades sont des méthodes directes pour le diagnostic de *M. bovis*. L'isolement par culture bactérienne et l'identification étaient considérés comme la méthode de référence, mais cela demande beaucoup de travail et de temps, du matériel et un savoir-faire particuliers (Nicholas et Ayling., 2003). Des tests sérologiques par ELISA peuvent être utilisés pour détecter la circulation (détection indirecte) de *M. bovis*. Cela représente la méthode de choix pour réaliser un screening à l'échelle du troupeau et lors d'achat d'animaux et surtout pour le suivi épidémiologique de la maladie (Pfützner *et al.*, 1996).

Alors que l'épidémiologie des MRB est bien décrite dans de nombreux pays du monde, il existe très peu de données pertinentes disponibles pour le continent africain, où le syndrome de MRB est pourtant endémique (Thompson *et al.*, 2000 ; Callaby *et al.*, 2016). En Algérie, la MRB dans les parcs d'engraissement des veaux de boucherie a un impact important sur l'économie nationale en raison de la perte de production et du coût du traitement. Une seule étude a été faite en Algérie concernant les mycoplasmoses respiratoires : celle de Kabouia (2005) sur les petits ruminants ce qui nous a poussé à réaliser cette étude sur les maladies respiratoires des bovins.

L'objectif de la présente étude était d'explorer la présence de *M. bovis* chez les veaux de boucherie atteints de maladies respiratoires dans l'est de l'Algérie, dans cette partie du pays où l'élevage bovin est d'une grande importance, par 2 méthodes de détection, indirecte (ELISA) et directe (rt-PCR). Ensuite, l'isolement par culture de souches de *M. bovis* a été réalisé pour caractériser les génotypes et les profils de sensibilité aux antibiotiques de cet agent pathogène.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I
Généralités sur
les mycoplasmes

I .1. Historique

M. bovis a été isolé pour la première fois en 1961 aux États-Unis par Hale et ses collaborateurs lors d'un cas de mammite sévère (Hale *et al.*,1962) ; puis, il a été reconnu comme un agent pathogène respiratoire en 1976 (figure 1). *M. bovis* fut d'abord appelé *M. bovimastitidis* puis *M. agalactiae sub sp, M.bovis*, car il provoque des symptômes très similaires à ceux de *M.agalactiae* chez les ovins et les caprins. De plus, il existe de nombreuses publications faisant état d'une relation taxonomique proche entre *M. bovis* et *M. agalactiae*. Notamment, les réactions croisées lors de tests sérologiques, ou encore, la présence d'un grand nombre d'antigènes identiques. Par exemple, la séquence de l'ARNr 16S de ces deux espèces a été analysée et montre plus de 99,8 % de similarité (Pettersson, 1996). En 1976, *M. bovis* est finalement considérée comme une espèce à part entière (Askaa, 1976) car les deux espèces se différencient lorsqu'on étudie l'intégralité des protéines cellulaires, en faisant des hybridations ADN/ADN (Acide désoxyribonucléique) ou encore grâce aux empreintes par PCR (Polymérase Chain Reaction).

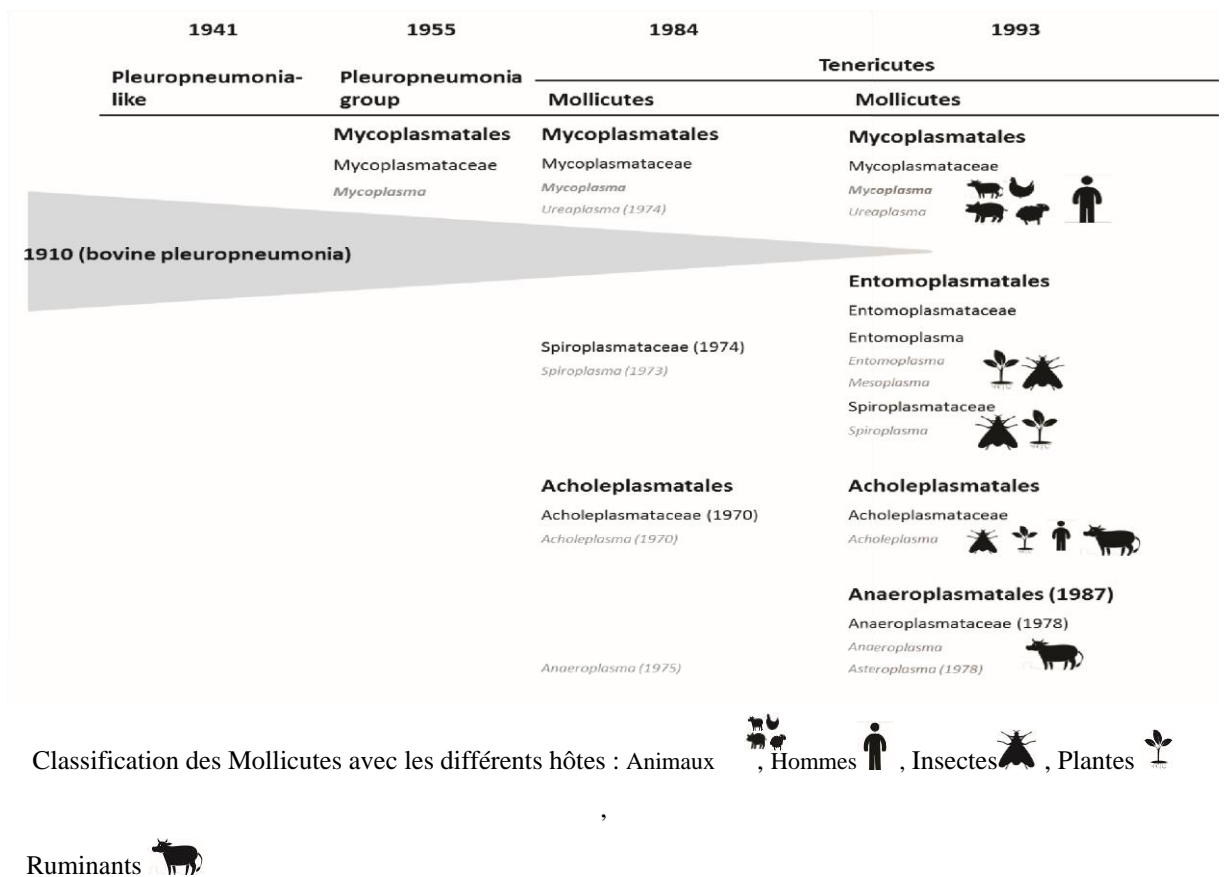


Figure 1: Historique de la découverte des mycoplasmes : Des « bactéries virus-like » (Razin *et al.*, 2010).

I. 2 Classification et phylogénie

Les mycoplasmes sont les plus petits Procaryotes connus. Ils appartiennent à la classe des Mollicutes qui regroupe les bactéries sans paroi. Les Mollicutes sont apparentés aux bactéries à Gram positif mais l'absence de paroi les rend incapables de prendre la coloration de Gram (Songer et Post, 2005).

Le terme « mycoplasme » est utilisé communément pour désigner l'ensemble des organismes appartenant à la classe des Mollicutes. Cette classe comporte quatre ordres :

1) Mycoplasmatales, 2) Entomoplasmatales, 3) Acholeplasmatales et 4) Anaeroplasmatales.

L'ordre des *Mycoplasmatales* comprend une seule famille, celle des *Mycoplasmataceae*. L'ordre des Mycoplasmes comprend une seule famille, à savoir les Mycoplasmes (tableau 1). Celui-ci comprend, chez les ruminants 107 espèces et sous-espèces à ce jour (Brown, 2011) dont certaines sont pathogènes. Parmi elles, deux sont responsables de maladies inscrites sur la liste de l'Office International des Epizooties (OIE) organisation internationale des épizooties : *M. mycoides* subsp. *mycoides*, appelé maintenant *M. mycoides*, agent de la péripneumonie contagieuse bovine et *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, agent de la pleuropneumonie contagieuse caprine.

Chez les bovins, les Mycoplasmoses à *M. bovis* ont pris une réelle importance, notamment dans les élevages en lot. De plus, les espèces *M. canis* et *M. alkalescens* sont suspectes d'être également pathogènes pour les bovins (Poumarat *et al.*, 2014).

Les essais de subdivision du genre *Mycoplasma* ont longtemps été basés sur une approche immunologique ou sur l'examen de la composition de l'ADN. Ce sont les analyses successives des séquences d'ARN ribosomique 16S (figure 2) qui ont permis de caractériser l'évolution des différentes familles. Les *Acholeplasmatales* et les *Anaeroplasmatales* sont considérés comme les premiers Mollicutes à s'être différenciés de leurs ancêtres bactériens GRAM+ par la perte de matériel génétique. Les *Spiroplasmataceae* se sont ensuite séparés de la branche des *Acholeplasmataceae*, certaines souches ayant vraisemblablement évolué pour former les *Mycoplasmataceae* (Razin *et al.*, 1998). Mais ces approches furent insuffisantes pour étudier la phylogénie des différentes espèces (Heleili, 2011).

M. bovis a été différencié de *Mycoplasma agalactiae* par seulement 8 nucléotides variant au niveau de l'ARN ribosomal 16s. Il existe donc une forte similitude entre les deux bactéries avec notamment des réactions immunologiques croisées et des séquences génomiques semblables. Ainsi, ils ont longtemps été confondus.

Tableau 1 : Classification des Mollicutes (Euzeby, 1997 ; Johansson et Pettersson, 2002).

Ordre	Famille	Genre	Nombre d'espèce	Hotes
<i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i> ^a	<i>Mycoplasma</i>	127	Animaux, Homme
		<i>Ureaplasma</i>	7	Animaux, Homme
		<i>Eperythrozoon</i> ^b	2	Animaux
		" <i>Candidatus Mycoplasma</i> "	17	Animaux
<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Entomoplasma</i>	6	Plantes, Insectes
		<i>Mesoplasma</i>	12	Plantes, Insectes
	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>	38	Plantes, Insectes
<i>Haloplasmatales</i> ^c	<i>Haloplasmataceae</i>	<i>Haloplasma</i>	1	Eau
<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i>	18	Animaux, Plantes
		" <i>Candidatus Phytoplasma</i> " nd	38	Plantes, Insectes
<i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasma</i>	4	Animaux
		<i>Asteroleplasma</i>	1	Animaux

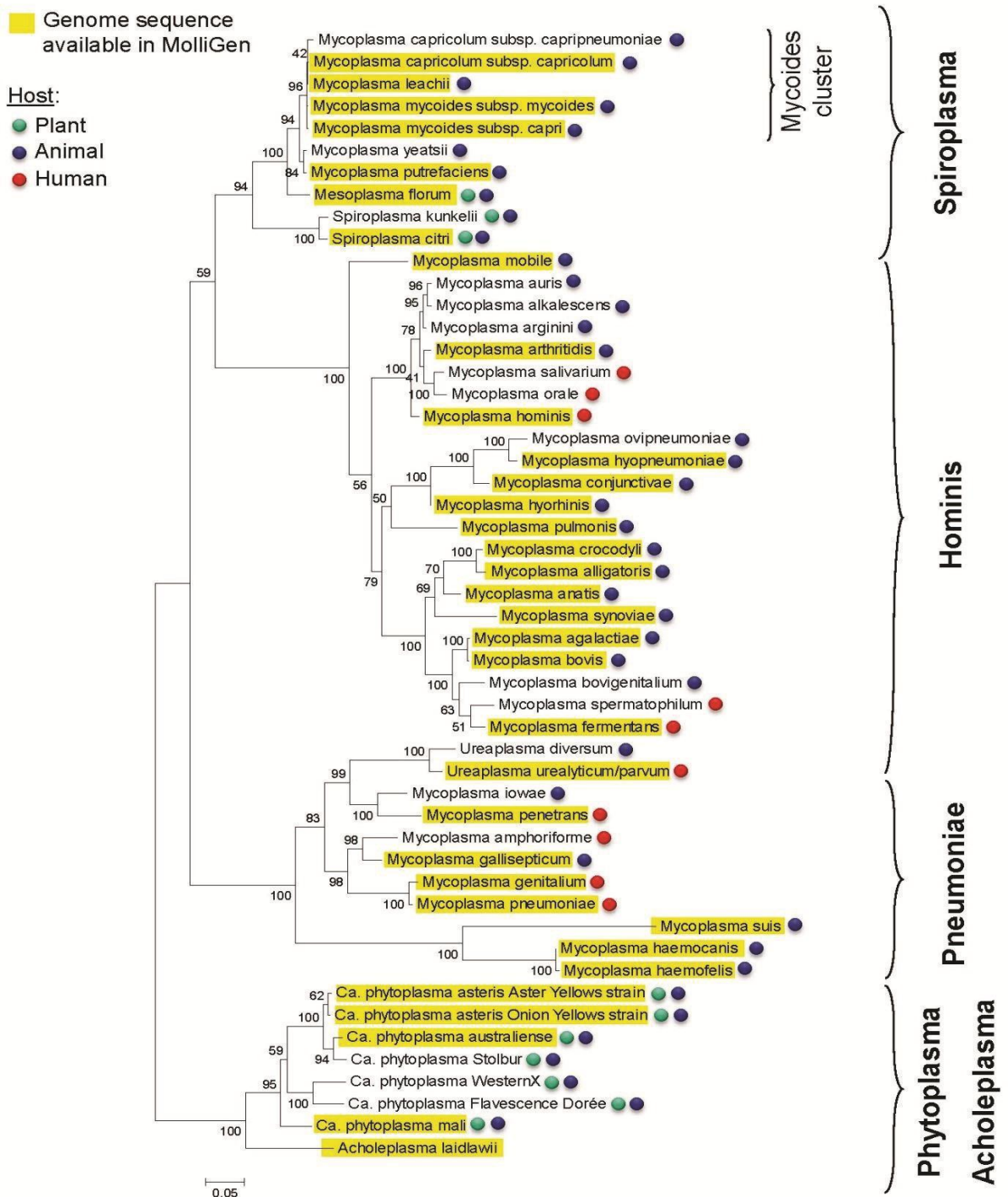


Figure 2: Arbre phylogénétique de la classe des Mollicutes.

Basé sur les séquences d'ADNr 16S, cet arbre est issu de la base de données Molligen (MolliGen , Barré and de Daruvar *et al.* 2004).

I .3. Variabilité antigénique

I .3.1. Mécanismes

Les mycoplasmes ont la capacité de faire varier les protéines de leur membrane plasmique. Ces protéines, antigènes pour l'hôte, sont appelées des S.A.H (Systèmes Antigéniques Hypervariables). Ils ont été mis en évidence chez une dizaine d'espèces de mycoplasmes dont *M. bovis*. Les protéines concernées par cette variabilité sont des protéines de surface (lipoprotéines et protéines non liées aux lipides) (Poumarat *et al.*, 1996) :

- Des lipoprotéines de la famille des Vsps (Variable surface proteins),
- Une protéine non lipidique : la pMB 67.

Ces protéines occupent une place importante dans le génome des mycoplasmes. Ces gènes auraient donc une grande importance dans la survie et le pouvoir pathogène de *M. bovis* (Klein *et al.*, 2005).

La variabilité de ces protéines est marquée. Elle a été mise en évidence chez des générations de mycoplasmes issus d'un même clone. La fréquence des variations est de 10^{-2} à 10^{-4} par cellule et par génération chez *M. bovis*.

Deux mécanismes de variation antigénique touchent les gènes d'expression des protéines membranaires variables (ou gènes Vsps : « Variable membrane surface lipoproteins ») :

- La variation de phase, mécanisme le plus courant, se traduisant par l'induction de l'expression d'un gène ou au contraire par la suppression de son expression (système ONOFF ou « switching »), se produisant à haute fréquence chez *M. bovis*.
- La variation de taille, indépendante de la variation de phase, qui aboutit à la synthèse d'une protéine de longueur variable, plus ou moins reconnue par les anticorps sériques.

Ces variations résultent de réarrangements chromosomiques au niveau du locus des gènes Vsps (Lysnyansky *et al.*, 1996). Outre l'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte, les S.A.H. auraient d'autres fonctions (Poumarat *et al.*, 1996) :

- L'ensemble des S.A.H. constituerait la structure membranaire fondamentale des Mollicutes, et pourrait jouer un rôle dans les échanges entre la bactérie et son environnement.
- Les S.A.H. interviendraient dans l'adhérence avec les surfaces cellulaires de l'hôte, et conditionneraient les tropismes cellulaires ainsi que le pouvoir invasif des Mollicutes.

I .3. 2. Conséquences

La réponse immunitaire humorale d'un hôte infecté met en jeu des anticorps spécifiques des protéines de surface de *M. bovis*. Mais les anticorps ne reconnaîtront pas ou auront une faible interaction avec un système protéique membranaire modifié en composition ou des protéines modifiées en taille.

La variabilité des antigènes chez *M. bovis* pose des problèmes de sensibilité et de spécificité des tests de diagnostic sérologique ou immunologique notamment dans l'élaboration de sérums contenant des anticorps anti-*M. bovis*. Dans des tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), les antigènes de l'agent pathogène sont reconnus habituellement par des anticorps monoclonaux. Ici, la variabilité des antigènes de *M. bovis* ne permet pas l'emploi de tels anticorps. Des anticorps polyclonaux sont donc utilisés mais ils doivent couvrir la variabilité du système protéique de *M. bovis*. De même, si l'on veut utiliser les antigènes de *M. bovis*, il faut que ces derniers soient représentatifs de la variabilité de l'agent pathogène pour la détection d'anticorps contre *M. bovis*.

Le même problème se pose pour la fabrication de vaccins, le choix des antigènes est difficile au vu de leur variabilité, et un trop grand nombre d'antigènes ne provoquera pas une réponse spécifique efficace (Lorin, 2008).

I .4. Caractères généraux des Mycoplasmes

- Structure et morphologie

M. bovis est une bactérie dépourvue de paroi, la forme de base des mycoplasmes est coccoïde (figure 3) de 0.33 à 1 µm de diamètre (Maniloff and Morowitz, 1972), avec un tout petit génome (Stanbridje, 1971 ; Taylor et Bébéar, 1997) De nombreux gènes manquent dont ceux qui codent la synthèse de la paroi et de certains acides aminés. Sa structure cellulaire est simple et comprend un nucléoïde, des ribosomes et une membrane cytoplasmique d'environ dix nanomètres d'épaisseur qui, en l'absence de paroi, constitue l'interface entre le mycoplasme et la cellule hôte (Maunsell et Donovan, 2009) Il est dépourvu d'organites spécialisés dans l'attachement et ne synthétise pas de toxine.

La membrane cytoplasmique se compose de lipides (32-40%) et de protéines (50-59% de la masse membranaire), 0.5- 2% de carbohydrates, 2-5% de RNA (ribonucléique acide) et environ 1% de DNA (Rottem et Razin, 1967 ; Maniloff et Morowitz, 1972). Ces protéines influencent la forme de la cellule, la division cellulaire, la motilité ainsi que l'adhésion à la cellule hôte. Cette membrane joue un rôle essentiel pour les Mollicutes.

La membrane cytoplasmique intervient également dans les processus de multiplication. Elle est surtout majeure dans la pathogénicité de *M. bovis* car les lipoprotéines de surface dont elle est constituée présentant des caractéristiques plastiques remarquables à l'origine des spécificités antigéniques et pathogéniques de la bactérie (Adamu *et al.*, 2013). Sa plasticité rend également l'usage des filtres usuels (filtre 45µm) inutiles pour cette bactérie. Ils ne possèdent ni flagelles ni pili et certains sont mobiles (Taylor et Bébéar, 1997)

L'absence de paroi permet des modifications morphologiques. Elle rend aussi la bactérie très sensible au milieu extérieur et en limite la survie. Cette fragilité est cependant modulée

grâce à la formation de biofilms permettant une survie dans certains milieux et matériaux (Citti, 2006).

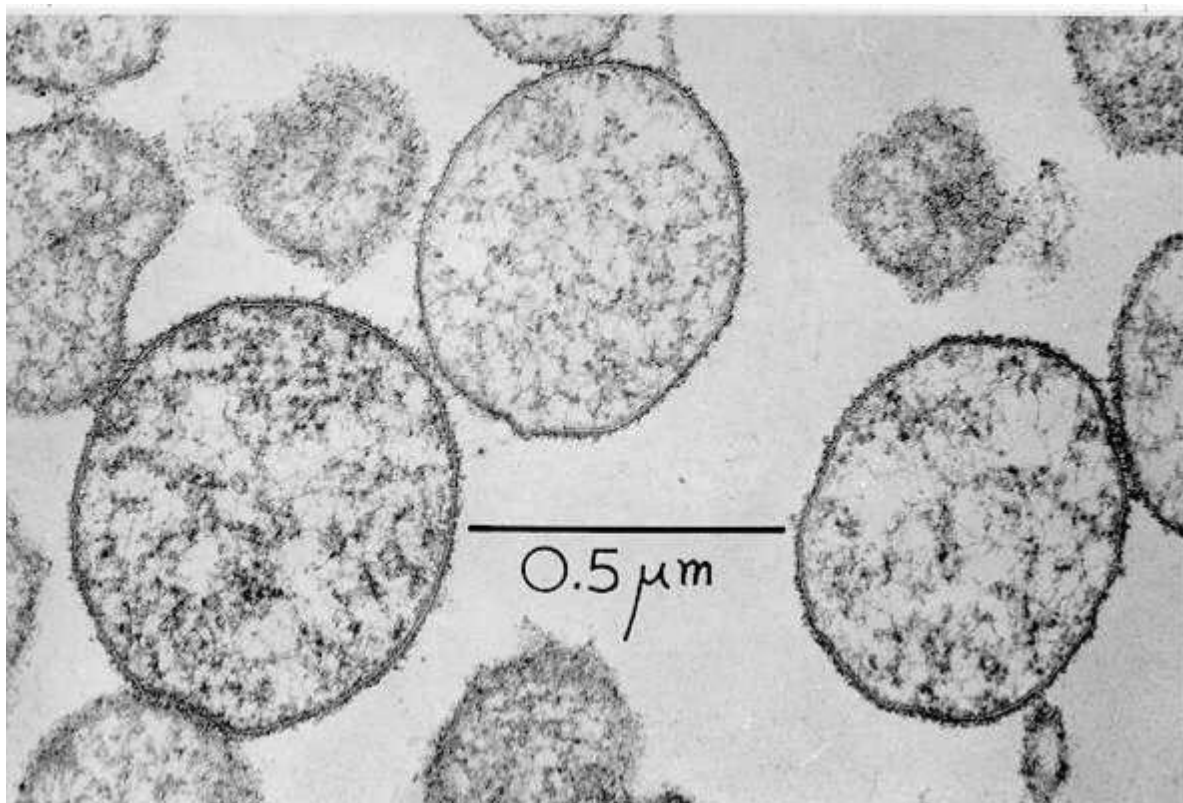


Figure 3: Structure des mycoplasmes en microscopie électronique (G x 68.000)
(Razin, 1996).

- Culture et observation des colonies

Cette méthode est intéressante dans le cadre d'un diagnostic individuel, elle présente une grande sensibilité et spécificité. Par contre, elle demande un long délai d'attente pour obtenir le résultat à cause de la croissance lente de *M. bovis*. (Pfützner et Sachse, 1996).

La culture de *M. bovis* demande l'utilisation de milieux spécifiques et très souvent enrichis en acides aminés en raison de son incapacité de les synthétiser (Parker *et al.*, 2017). Le temps d'incubation est assez long car il nécessite environ 5 à 7 jours. L'aspect des colonies des mycoplasmes est celui d'un « œuf sur le plat » (figure 4). Elle peut produire film and spot et donner une couleur orangée en fonction du milieu de culture (Nicholas *et al.*, 2003 ; Caswell *et al.*, 2008).

Le problème avec cette méthode est que l'isolement de *M. bovis* peut être compromis à cause d'une contamination par une autre bactérie ou encore la réalisation d'un traitement antibiotique. Donc, cette technique peut résulter sur des faux négatifs suite à la contamination du prélèvement (Sachse *et al.*, 1993). La culture peut résulter sur la croissance d'autres bactéries dont les colonies sont morphologiquement homologues et conclure à un résultat faussement positif. Une identification des mycoplasmes est nécessaire.

De plus, le choix des échantillons, le transport et le stockage sont élémentaires pour minimiser la croissance d'autres bactéries, maximiser la viabilité de *M. bovis* et la croissance sur le milieu de culture. Si l'acheminement au laboratoire a lieu dans les 2 jours, on peut garder les prélèvements à une température de 4 °C, au-delà il faut les congeler (Parker *et al.*, 2017).

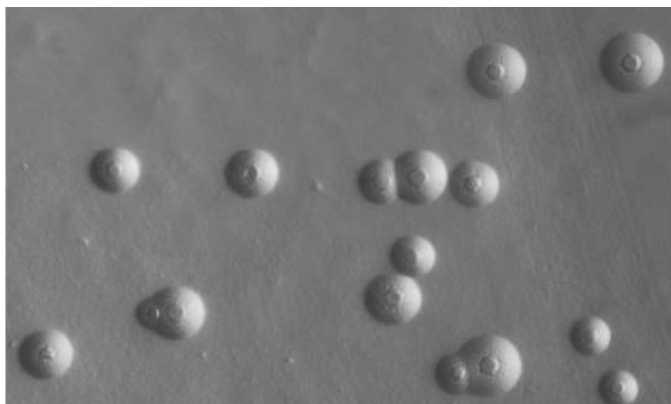


Figure 4: Aspect typique d'"œufs sur le plat" des colonies de *M. bovis* (x40) (Maunsell et Donovan, 2009).

I .5. Caractéristiques des mycoplasmes

- L'absence de paroi rigide

L'absence de la paroi rigide est la principale caractéristique qui différencie les mycoplasmes des autres procaryotes (Poumarat *et al.*, 1996). Les gènes permettant la synthèse de cette paroi commune à toutes les autres bactéries sont absents du génome des mycoplasmes. La barrière entre le cytoplasme et le milieu extérieur est uniquement constituée de la bi-couche lipidique classique de la membrane. Cette absence engendre plusieurs conséquences :

- Les antibiotiques ayant pour cible la paroi bactérienne, comme les bêta-lactamines, sont bien sûr inactifs sur ces germes (Nascimento, 2005) ;
- Les défenses immunitaires de l'hôte sont en contact direct avec la membrane plasmique du mycoplasme.

- Génome de taille réduite

Le génome des mycoplasmes varie en taille de 600 à 1400 kpb selon l'espèce (Figure 5), et comporte entre 400 et 1400 gènes. Depuis 1995, date du premier séquençage du génome de mycoplasme (Fraser *et al.*, 1995), 76 génomes appartenant à 51 espèces ont été séquencés et déposés dans la base de données Molligen (anonyme 1 ; Barre *et al.*, 2004). Le génome mycoplasmiq, le plus petit des génomes de cellules procaryotes, est constitué d'un ADN circulaire à double brin avec une faible teneur en bases G+C (guanine+cytosine) (23 à 41% pour *Mycoplasma*).

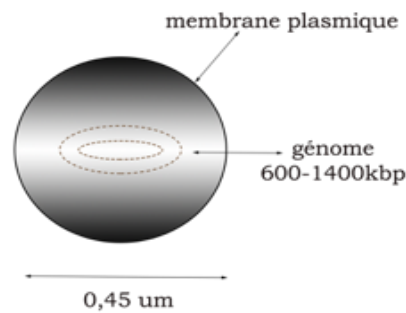


Figure 5: Caractéristiques structurales de *M. bovis* (Porret-Blanc, 2017).

- Mode de développement naturel

Les mycoplasmes sont des bactéries parasites, des saprophytes ou des commensaux des organismes supérieurs. Ces mycoplasmes présentent une structure d'attachement et pénètrent dans les cellules (Lam, 2005).

- Répartition

Dans le règne animal, les Mollicutes sont des organismes extrêmement connus. L'identification chez les mammifères, les reptiles et les oiseaux, a abouti à presque une centaine d'espèces. En laissant supposer une répartition beaucoup plus large et régulière, de nouvelles espèces sont explorées, ou les Mollicutes sont aussi bien trouvés chez les végétaux et les insectes (Bencina *et al.*, 2006).

Chez l'animal, les Mollicutes ont un tropisme cellulaire extrême. *M. bovis* possède une grande affinité pour les cellules épithéliales des voies respiratoires inférieures, des muqueuses génitales, oculaires, la glande mammaire et des articulations (Lam, 2005). On peut le trouver aussi dans la flore ruminale des bovins (Pfützner et Sachse, 1996).

- Les mycoplasmes et leur hôte

Une particularité de *M. bovis* est sa spécificité d'hôte (Pfützner et Sachse, 1996). Ce qui signifie sa grande adaptation aux bovins. *M. bovis* compte une multitude de souches qui semblent diverger entre les troupeaux et indiquerait une spécificité selon le troupeau (Aebi *et al.*, 2012). Par ailleurs, la possibilité de transfert de gènes par recombinaison entre espèces de mycoplasme n'est pas exclue et pourrait participer à la pathogénicité de *M. bovis*.

Après avoir supposé que les mycoplasmes aient une spécificité d'hôte étroite ou stricte, il s'est avéré que cette spécificité est plutôt préférentielle mais non exclusive : des bovins peuvent être contaminés par *M. canis* dont l'hôte habituel est le chien, par exemple. En fait, les mycoplasmes sont adaptés à un hôte spécifique chez lequel ils sont généralement pathogènes (tableau 2) ; parfois, ils colonisent un tiers hôte sans toutefois être forcément pathogène (Habert, 2002).

Tableau 2 : Les mycoplasmes isolés chez les animaux (Nicolet, 1996).

Hôte	Espèces	Agents pathogènes
Primate (sauf humains)	Mycoplasma :12 Acholeplasma :1 Ureaplasma :1	
Ruminants	Mycoplasma :19 Acholeplasma :4 Anaeroplasma :2 Ureaplasma :1	<i>M. mycoides mycoides</i> et <i>M. mycoides capri</i> <i>M. agalactiae</i> <i>M. bovis</i> <i>M. capricolum</i> subsp <i>capricolum</i> ...
Porcins	Mycoplasma :13 Acholeplasma : 5 Ureaplasma : 1	<i>M. hyopneumoniae</i> <i>M. hyorhinis</i> <i>M. hyosynoviae</i>
Oiseaux domestiques	Mycoplasma :17 Ureaplasma :2 Acholeplasma :2	<i>M. gallisepticum</i> <i>M. meleagridis</i> <i>M. synoviae</i>
Equins	Mycoplasma :11 Acholeplasma :8	<i>M. felis</i> <i>M. equirhinis</i>
Chiens et chats	Mycoplasma :15 Acholeplasma :1 Ureaplasma :1	<i>M. canis</i> <i>M. cynos</i> <i>M. felis</i> <i>M. gatae</i>
Animaux de laboratoire	Mycoplasma :11 Acholeplasma :3	<i>M. pulmonis</i> <i>M.</i> <i>arthridis</i>
Animaux sauvages	Mycoplasma :17 Acholeplasma :2 Ureaplasma :1	

- Présence de *M. bovis* dans le monde

M. bovis apparaît bien implanté au niveau mondial. Il n'est pas ubiquitaire mais est tout de même largement répandu au niveau des troupeaux présents dans une région infectée (Pfützner et Sachse, 1996; Nicholas et Ayling, 2003). L'importance et la diversité des mycoplasmes ont longtemps été négligées. Le fait que cette bactérie soit impliquée dans des

maladies multifactorielles ne facilite pas les choses car il est difficile de déterminer la contribution exacte de *M. bovis* dans une affection, leur dépendance vis-à-vis des nutriments essentiels les rends très fragiles.

II .6. Propriétés physiques et chimiques

Les mycoplasmes sont fragiles, sensibles aux détergents, aux solvants organiques et à l'alcool en l'absence de la paroi rigide (Poumarat, 1996). Ce sont des bactéries rapidement mourantes en milieu liquide, qui ont longtemps été considérées comme instables (Nagamoto, 2001).

Alors, ces bactéries résistent à l'action des antibiotiques inhibant la synthèse des peptidoglycanes de la paroi bactérienne, comme les glycopeptides, les céphalosporines, la bacitracine, les pénicillines ainsi que la vancomycine (Rosendal, 1990 ; Rodriguez, 1995 ; Greene, 1998). Elles sont aussi insensibles à la rifamycine (vraisemblablement, à cause d'une faible ressemblance de la sous unité bêta de l'ARN polymérase pour cet antibiotique), aux polymyxines, à l'acide nalidixique et au chloramphénicol (Rodriguez, 1995 ; Bey, 2006).

II .7. Importance économique de l'infection mycoplasmique

Alors que *M. bovis* est à la base de deux entités pathologiques majeures, à savoir les maladies broncho- respiratoires et les mammites, il existe très peu de données à propos des coûts économiques engendrés par ce pathogène. Il est très difficile d'estimer précisément les pertes économiques que sa présence peut engendrer. A défaut de pouvoir les chiffrer précisément, on peut néanmoins affirmer que ces pertes sont de plusieurs natures : diminution de la production (lait et viande), diminution du gain moyen quotidien le cout des médicaments, difficultés de traitement et de gestion entraînant des coûts de main d'œuvre, intervention vétérinaire, mortalité et pertes liées à l'abattage précoce ainsi que la mise en place du diagnostic et de mesures de contrôle et de prévention. De plus, étant donné que les maladies liées à *M.bovis* ont une tendance marquée à la chronicité, ces pertes apparaissent globalement plus élevées que pour d'autres agents pathogènes(Nicholas et Ayling, 2003; Maunsell *et al.*, 2011) .

II.8. Rôle des facteurs de l'environnement

L'ambiance et la conduite du bâtiment vont influencer l'apparition de maladies respiratoires et favoriser le développement de certains agents pathogènes.

La densité animale en lien avec le manque de ventilation et la poussière vont augmenter la possibilité pour un animal d'être contaminé via les aérosols ou un animal malade. L'orientation du bâtiment par rapport aux vents dominants et à l'ensoleillement vont influencer la température et l'hygrométrie, donc en partie l'ambiance du bâtiment. L'agencement intérieur

du bâtiment par le cloisonnement va influencer le système de ventilation.

Les systèmes de ventilation peuvent être des systèmes avec extraction dynamique de l'air. La ventilation est un moyen de prévention très important pour les problèmes respiratoires car les veaux sont particulièrement sensibles aux courants d'air (Brscic *et al.*, 2012).

L'environnement peut être une source de contamination supplémentaire, l'air et la litière peuvent abriter ces mycoplasmes même si les capacités de survie de ces derniers sont faibles notamment à la sécheresse et la dessiccation (Pfützner et Sachse, 1996). Ainsi, un animal peut se contaminer par contact avec un autre infecté ou encore à partir d'aliments ou de matériel contaminés. Cependant, il est peu probable que ces voies soient des sources majoritaires de contamination (Nicholas et Ayling, 2003).

De nombreux gaz sont nocifs pour les poumons mais le plus toxique et le plus fréquemment impliqué est l'ammoniac. Peu d'études sont réalisées sur les bovins mais il semble que les effets soient les mêmes que chez les autres animaux. A des taux de 23 et 32 mg/m³ d'ammoniac dans le bâtiment, une inflammation pulmonaire est démontrée, avec une augmentation de l'activité des macrophages et des taux de neutrophiles importants dans des lavages broncho-alvéolaires. Une action irritative sur les muqueuses de l'appareil respiratoire supérieur a aussi été démontrée avec l'observation d'une augmentation de larmes et de toux chez les animaux exposés à de fortes concentrations d'ammoniac (Phillips *et al.*, 2010). On cherche alors à diminuer le taux d'ammoniac par le renouvellement de la litière et une ventilation adaptée.

L'humidité et la température aurait également un impact sur le développement des maladies. Elles influenceraient les capacités de colonisation et la sécrétion de *M. bovis*. L'excrétion de *M. bovis* peut être influencée par la température extérieure et le niveau de stress. Elle serait augmentée à faible température et serait également à la hausse lors de changement brusque de température (Gasmi, 2011).

La saison aurait d'ailleurs un effet sur la prévalence des cas d'infection à *M. bovis* qui serait plus élevée par temps froid et humide. La saison d'arrivée des veaux dans l'élevage semble montrer des différences. Les veaux arrivant en hiver ont moins de troubles respiratoires que ceux arrivant à l'automne (Brscic, 2012). En effet, l'automne est souvent la période où les lots sont mis en place, il y a donc de nouveaux pathogènes en circulation, et une contamination plus importante. Plusieurs auteurs ont suggéré que les changements importants de températures avaient plus d'impact sur les BPIE (bronchopneumonies infectieuses enzootiques) qu'un froid constant (Taylor *et al.*, 2010).

Chapitre II
Les bronchopneumonies
infectieuses enzootiques
(Implication de M. bovis)

II.1. Recherches spécifiques de *M. bovis* comme agent étiologique de BPIE

M. bovis est l'espèce la plus fréquemment isolée lors des mycoplasmoses bovines en Europe et en Amérique du Nord (Nicholas et Ayling, 2003). Longtemps considérée comme une bactérie opportuniste du tractus respiratoire des ruminants, elle est aujourd'hui incriminée dans de nombreux cas de broncho-pneumonies infectieuses enzootiques chez les veaux, de mammites chez les vaches laitières, d'arthrites, et un peu moins fréquemment lors d'otites moyennes et internes, d'avortements ou encore de kérato-conjonctivites infectieuses (Thomas *et al.*, 2003a).

II.2. Etiologie et signes cliniques

Les BPIE sont un syndrome infectieux multifactoriel c'est-à-dire provoqué par différents agents pathogènes. Elles sont de plus, exacerbées par divers facteurs : les conditions de vie de l'animal (l'humidité, la température et la ventilation des étables, la taille, la densité et la composition des lots d'animaux...etc), le statut immunitaire des animaux et le stress. Ces facteurs de risque jouent un rôle extrêmement important dans la survenue et la propagation de la maladie.

Tous les âges peuvent être touchés par les BPIE à mycoplasmes, autant les races laitières que les races à viande. L'apparition des symptômes est la plus élevée vers 10-15 jours et son pareil à ceux d'une bronchopneumonie induite par les autres pathogènes. On peut dès lors relever de la fièvre, de la tachypnée, de la dyspnée, de la perte d'appétit, de la toux, du jetage muco-purulent ainsi que des bruits anormaux à l'auscultation (Nicholas *et al.*, 2003). Dans certains cas, on peut observer uniquement de la toux suite à un stress ou à des déplacements (Peek *et al.*, 2018).

M. bovis est en effet généralement associé à d'autres agents pathogènes tels que *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* et *Histophilus somni*, le virus BVD (Bovine Viral Diarrhea), PI3 (Parainfluenza virus-3), BRSV (Bovine Respiratory Syncytial Virus). On évoque d'ailleurs un éventuel effet de synergie entre ces différents agents (Bürki *et al.*, 2015). Cependant, il semble être plus souvent en interaction avec d'autres bactéries. *M. bovis* est ainsi considéré soit comme un facteur prédisposant pour l'installation d'autres bactéries à la base des lésions (Hermeyer *et al.*, 2012) ou bien comme un agent compliquant au niveau des infections initiées par d'autres bactéries (Bürki *et al.*, 2015). L'association avec le virus BRSV ne semble pas augmenter la sévérité des signes cliniques ainsi que les lésions (Thomas *et al.*, 1986).

Comme pour l'association avec le virus BVDV, où un rôle immunosuppresseur potentiel est évoqué (Shahriar *et al.*, 2002).

II.3. Diagnostic sérologique

Des kits ELISA de sensibilité et de spécificité variables sont actuellement commercialisés en Europe (en France, IDVet et BioX, Bio-X Diagnostics en Belgique, Biovet au Québec, Bommelli en Suisse) (figure 6). Ils peuvent être utilisés sur sérum, mais également sur le lait de tank et le lait individuel (Byrne *et al.*, 2000 ; Wisselink *et al.*, 2019). Cependant, la variabilité antigénique des souches de *M. bovis* entraîne un risque important de faux-négatifs. Les anticorps peuvent également persister plusieurs mois à plusieurs années, de même que chez le jeune veau, les anticorps maternels peuvent fausser le diagnostic. Enfin, l'agent pathogène ne peut pas être détecté pendant la période d'incubation, car le taux d'anticorps dans le sérum n'apparaît que 10 à 14 jours après l'infection (Pfützner et Sachse, 1996). La sérologie est donc inappropriée pour un diagnostic individuel. Elle est en revanche un excellent outil de surveillance épidémiologique, permettant de repérer rapidement les séroconversions au sein d'un troupeau en réalisant des prises de sang répétées sur un grand nombre d'animaux (Thomas *et al.*, 2003).

Un test positif n'informe pas quant à la présence de *M. bovis* chez l'animal au moment du prélèvement et non plus sur le statut excréteur de l'animal. Se fier sur le seul test positif ELISA n'est pas une approche adéquate pour contrôler une infection

Le dépistage par technique ELISA peut se faire en complément d'autres méthodes de diagnostic telles que la culture et la PCR (Parker *et al.*, 2017).



Figure 6 : Le kit pour test Elisa utilisé dans ce travail (Anonyme 2).

II.4. Diagnostic bactériologique

II.4. 1. Culture bactériologique

La culture bactériologique de *M. bovis* nécessite 5 à 7 jours d'incubation et doit être spécifiquement demandée au laboratoire d'analyses. Elle est suivie ensuite obligatoirement d'une phase d'identification (par MF-Dot) pour éliminer les mycoplasmes non pathogènes.

Le meilleur prélèvement pour isoler *M. bovis* est le lavage broncho-alvéolaire ou LBA. La sensibilité de l'écouvillonnage nasal, nettement inférieure à celle du LBA, en fait un test peu

intéressant (Thomas *et al.*, 2003b). Du fait de la sensibilité de *M. bovis* au milieu extérieur, les prélèvements doivent être soigneusement réfrigérés à +4°C et envoyés au laboratoire d'analyse dans les 24-48 heures, dans un récipient hermétiquement fermé (Francoz *et al.*, 2010). Si un délai plus important est nécessaire pour l'acheminement du prélèvement, il devra être congelé à au moins -20°C. *M. bovis* peut ainsi persister plusieurs mois entre -20°C et -70°C sur les fluides recueillis par LBA (Maunsell et Donovan, 2009).

Pour ce faire, il faut effectuer une identification après la culture pour prouver l'identité et par conséquent la pathogénicité du mycoplasme (Wisselink *et al.*, 2019) car *M. dispar*, *M. argini* et *M. bovirhinis* peuvent être présents.

II.4. 2. Identification par détection des antigènes

La technique MF-Dot (Membrane Filtration dot immunobinding) est fondée sur l'utilisation de microplaques contenant 96 puits (figure 7). Le fond des puits est constitué par une membrane poreuse. La taille des pores mesure 0,22 microns, ce qui autorise une filtration des puits après le dépôt de chaque agent réactif, à l'aide d'une pompe à vide (Poumarat *et al.*, 1991). Les réactions liées aux composants du milieu sont ainsi minimisées, cela permet d'augmenter la spécificité du test sérologique.

Cette méthode est majoritairement utilisée, couplée à la PCR dans le cadre de la surveillance épidémiologique (Chazel *et al.*, 2010). Cette technique présente une bonne sensibilité (10^4 à 10^7 mycoplasmes par puits) et sa spécificité est proche des tests sérologiques de référence (test d'inhibition de croissance, l'immunofluorescence). L'analyse en elle-même ne prend que 3 heures mais il faut en général rajouter une phase de culture de 2 à 7 jours. Il y a également un risque important de réactions croisées, que l'on peut diminuer par l'usage d'amorces spécifiques d'espèces (Poumarat *et al.*, 1991).

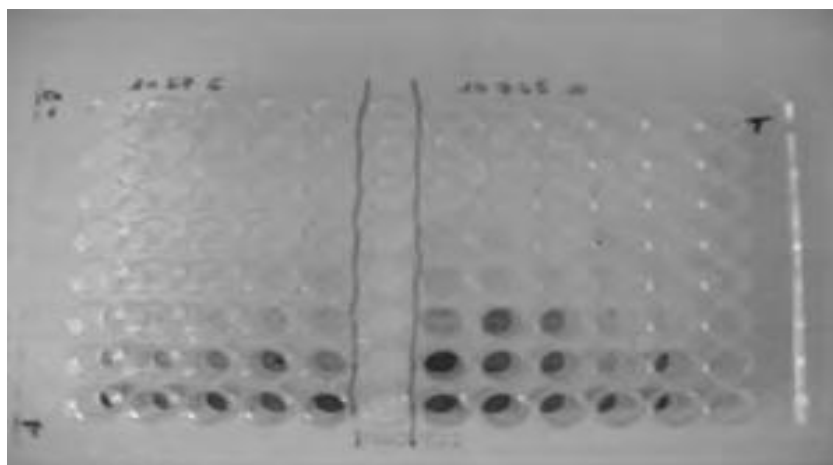


Figure 7: Test MF-Dot (Lorin, 2008).

II.5. Identification moléculaire (Test PCR)

La PCR ou la technique de polymérisation en chaîne permet aujourd'hui l'identification des différentes espèces de mycoplasmes d'intérêt vétérinaire. Elle est fondée sur l'amplification de séquences d'ADN grâce à la Taq polymérase et à des amorces spécifiques, aussi appelées primers. Une trentaine de cycles se succèdent avant l'analyse de la séquence. Cette dernière est ensuite décryptée à l'aide de logiciels informatiques. Cette technique a été en premier lieu appliquée au séquençage de l'ARN ribosomal 16 S des espèces de mycoplasmes puis à l'espace intergénique situé entre la séquence codant l'ARN ribosomal 16 S et la séquence codant l'ARN ribosomal 23 S chez les mycoplasmes d'intérêt vétérinaire (Chalker *et al.*, 2004).

L'identification génétique par PCR est la méthode de diagnostic la plus pratique à l'heure actuelle. Plusieurs techniques existent et ciblent différents gènes (Tableau. 3). Ces différentes techniques montrent des performances comparables (Wisselink *et al.*, 2019). En effet, elle dispose d'une sensibilité et spécificité supérieure à la culture. Elle peut être effectuée sur différents types de prélèvement tels que le lait, les écouvillons nasaux, les lavages broncho-alvéolaires. En plus, la PCR est une méthode rapide de diagnostic comparée à la culture car elle ne demande pas d'isolement préalable pour l'identification (Timoonen *et al.*, 2017).

L'amplification du gène *uvrC* a rendu possible la différenciation entre deux types de mycoplasmes (*M. bovis* et *M. agalactiae*), très proches génétiquement (Subramaniam *et al.*, 1998). La PCR en temps réel appliquée récemment promet une amélioration de la détection de *M. bovis* à partir du liquide broncho-alvéolaire et du lait individuel. Cette technique présente cependant quelques inconvénients, notamment pour l'analyse des échantillons de lait. La polymérase utilisée pour hybrider les amorces et l'ADN peut en effet interférer avec les protéines du lait, et une phase d'extraction préalable de ces protéases est nécessaire (Sachse *et al.*, 2010).

Tableau 3: Comparaison des différentes techniques de diagnostic (Sachse *et al.*, 1993).

Technique	Diagnostic direct par mise en culture	Diagnostic indirect par méthode ELISA	Diagnostic direct par méthode PCR	Diagnostic direct par MF-Dot
Sensibilité (CFU/mL)	10-100	100 avec l'hémagglutination indirecte	10 ³ -10 ⁵ selon la Nature du prélèvement	Au moins 1
Spécificité	++	+	++	++
Temps requis	5-10 jours	2 jours	2 jours	2 jours
Facilité de réalisation	+	++	+	+/-
Avantages	Détection simultanée de plusieurs mycoplasmes Directement sur des échantillons biologiques Utilisation en laboratoire de routine	Traitement rapide de plusieurs échantillons Utilisation en laboratoire de routine	Rapide et spécifique Directement sur des échantillons biologiques	Spécificité élevée et définie Possible directement sur quelques échantillons biologiques
Inconvénients	Contamination bactérienne Nécessité de mycoplasmes viables	Pas de contrôle de la maladie (anticorps détectés 10 à 14 jours après l'infection) Sur sérum uniquement.	Interférences avec les protéines du lait Réalizable dans certains laboratoires.	Bruit de fond Non réalisable en laboratoire de routine

II.6. Traitements des BPIE

L'absence de paroi bactérienne chez *M. bovis* se répercute sur les choix de traitement. En effet, cela signifie que celle-ci bénéficie d'une protection structurelle contre les antibiotiques de la famille des β -lactamines. *M. bovis* bénéficie également d'une résistance intrinsèque aux antibiotiques de la famille des sulfonamidés car elle ne synthétise pas l'acide folique. Les antibiotiques habituellement utilisés faces aux affections respiratoires et qui théoriquement ont une efficacité sont le florfénicol, les tétracyclines, les macrolides, les aminosides et les fluoroquinolones (Lysnyansky et Ayling, 2016). Ils permettent généralement la réduction des symptômes cliniques mais ne permettent pas l'élimination de l'infection (Nicholas et Ayling, 2003).

Le problème qui se pose actuellement est l'émergence de résistance vis-à-vis de ces antibiotiques (Ayling *et al.*, 2000 ; Nicholas et Ayling 2003). En effet, l'émergence de résistance vis-à-vis des classes d'antibiotiques utilisées à l'encontre de *M. bovis* a été relevée. Au travers de plusieurs études, on constate une élévation de la MIC50 pour l'ensemble des antibiotiques utilisés. L'apparition de ces résistances est causée par des points de mutations génétiques (Khalil *et al.*, 2016, Khalil *et al.*, 2017). En Europe, *M. bovis* devient résistant aux antibiotiques habituellement utilisés contre les Mycoplasmoses (Sulyok *et al.*, 2014).

D'autre part, la détermination des sensibilités antimicrobiennes pour *M. bovis* est compliquée car elle requiert des méthodes dont les laboratoires ne disposent pas (Gasmi, 2011). Les traitements sont fréquemment longs et inefficaces dans beaucoup de cas. Les veaux affectés par plusieurs atteintes montrent une réponse très faible aux traitements. Cependant, il est inutile d'instaurer des traitements en cas d'isolement unique de *M. bovis* et lorsqu'il n'a pas de signes d'atteinte.

La tulathromycine s'est montrée efficace à l'encontre de *M. bovis* lorsque celle-ci est mise en œuvre 2-3 jours après inoculation. Elle a été d'ailleurs approuvée comme traitement des maladies associées à *M. bovis* aux USA. Lors d'études réalisées en Europe, les fluoroquinolones sont apparues les plus efficaces contre *M. bovis* mais doivent être réservés dans des situations sévères (Suylok *et al.*, 2014).

Les macrolides sont parmi les premières molécules à être prescrites dans le cas des BPIE (De briyne *et al.*, 2014). La prescription des macrolides se fait dans deux cadres : à titre préventif ou en traitement d'une maladie infectieuse. Ces molécules sont prescrites pour traiter des maladies respiratoires (BPIE) chez les bovins. Elles sont réputées efficaces contre un grand nombre d'agents microbiens comme les entérobactéries, les staphylocoques, les chlamydias et les mycoplasmes.

En médecine vétérinaire, les quinolones sont prescrites contre un ensemble de bactéries

y compris les mycoplasmes, contre les otites, les mammites, les conjonctivites ainsi que les pneumonies à mycoplasmes (Giguère *et al.*, 2013). Grace à leur temps de demi-vie plasmatique qui varie entre 24 et 48 heures, et leur diffusion cellulaire, elles sont largement utilisées. Les fluoroquinolones, de 3^{ème} génération, comme la danofloxacin, l'enrofloxacin et la marbofloxacin, ne sont pas administrées en métaphylaxie ou en prévention, contrairement aux tétracyclines et aux macrolides (Rerat *et al.*, 2012). En Europe, ce sont des antibiotiques critiques dont l'usage est restreint.

L'ensemble des souches isolées de *M. bovis* restent sensibles aux trois molécules de fluoroquinolones utilisées en médecine vétérinaire : la danofloxacin et la marbofloxacin sur le terrain ainsi que l'enrofloxacin qui donnent de très bon résultats *in vitro* (Hannan *et al.*, 1997). A l'heure actuelle, les deux premières molécules, sont plus récentes et restent efficaces en l'absence de résistance chez les mycoplasmes (Kroemer *et al.*, 2012).

Dans le cadre des bronchopneumonies à *M. bovis*, un traitement anti-inflammatoire peut être bénéfique afin de limiter les effets délétères de celle-ci (Maunsell et Donovan, 2009).

II.7. Prévention

Il n'existe pas de vaccin reconnu efficace actuellement, donc la prévention sanitaire reste le seul moyen nécessaire pour éviter les BPIE, notamment celles dues à *M. bovis*. De nombreuses mesures préventives peuvent alors être prises pour éviter la propagation des infections respiratoires :

- A l'achat d'animaux, il est fortement conseillé d'appliquer une quarantaine et d'effectuer un test de dépistage pour *M. bovis*. Pourtant, l'opération d'un seul test à l'achat d'un animal n'est pas fiable au vu de l'existence de porteur asymptomatique et de la possibilité d'excrétion intermittente (Butler *et al.*, 2000).
- Il est conseillé de limiter les facteurs de stress préjudiciables pour l'ensemble des affections de l'appareil respiratoire et de vacciner contre les autres agents pathogènes respiratoires. Par ailleurs, il faut essayer d'assurer des bonnes conditions d'étable par une bonne qualité de l'air et d'ambiance d'étable pour les veaux comme préconisé pour l'ensemble des maladies respiratoires. La température, la densité de population, l'alimentation sont des éléments qui doivent être régulés (Aebi *et al.*, 2015).
- Vu les faibles défenses de *M. bovis* dans le milieu extérieur, une désinfection des équipements et des locaux est conseillée pour diminuer la pression infectieuse. La pratique d'une conduite « all in, all out » est avancée comme autre moyen de prévention pour minimiser la contamination entre les animaux d'âges différents (Nicholas et Ayling, 2003).

- Le logement individuel des veaux avant sevrage semble prévenir le niveau d'infection de ceux-ci (Peek *et al.*, 2018). La présence de box de vêlage semble être un facteur protecteur contre la dissémination de *M. bovis* (Gille *et al.*, 2018).
- Le timing est également déterminant par rapport au moment de l'infection pour l'interprétation et la détection des cas subcliniques. Les difficultés sont liées au fait que la durée de séroconversion est évaluée à 2-3 semaines et que la durée du titre en anticorps n'est pas bien définie (environ 6 mois). La concentration en anticorps diminue généralement 2 mois après l'infection même chez les animaux touchés cliniquement (Petersen *et al.*, 2018). Dès lors, il est inefficace de réaliser une analyse à un moment donné pour déterminer le statut d'un animal et par conséquent d'un troupeau (Hazelton *et al.*, 2018).
- Pour parvenir à déterminer si un troupeau est sain, il faut combiner les types de tests et réaliser ces derniers de manière séquentielle et sur différentes classes d'âge. Les tests doivent combiner des analyses sérologiques et génétiques pour statuer sur un troupeau (Vähänikkilä *et al.*, 2019).
- L'application d'un traitement métaphylactique voire préventif n'est pas recommandée mais dans certaines situations où le taux de morbidité et mortalité est élevé, il peut être justifié (Nicholas et Ayling, 2003). Des études ont montré qu'il peut contribuer à une diminution nette de l'incidence et la sévérité des symptômes respiratoires. Dans une étude européenne, l'ajout de valnemuline à partir de 4 jours jusqu'à 3 semaines d'âge permet de limiter les cas de maladies associées à *M. bovis* (Haapala *et al.*, 2018).
- Une possibilité de prévention serait le développement d'un vaccin (Perez-Casal *et al.*, 2017) mais aucun n'est disponible à l'heure actuelle et les essais ne montrent pas de résultats satisfaisants. Les raisons pour lesquelles il est difficile de mettre au point un vaccin est le fait qu'il n'existe pas de modèle animal représentatif d'une infection à *M. bovis* (Nicholas *et al.*, 2016). D'autre part, il existe des variations de virulence et la variation antigénique entre les souches ce qui entraîne des difficultés quant à la sélection d'une souche pour développer un vaccin.

Chapitre III

Antibiorésistance de M. bovis

III.1. Résistance naturelle aux antibiotiques chez les mycoplasmes et évaluation

La plupart des études sur la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes ont été réalisées *in vitro*. Ils impliquent la détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI). Cependant, il existe peu d'études, principalement *in vitro*. Les méthodes utilisées pour déterminer la CMI sont également mal standardisées pour les mycoplasmes et entre les laboratoires, ce qui rend difficile la comparaison des résultats. Des recommandations et des lignes directrices ont été élaborées pour limiter cette variabilité (Hannan, 2000).

Les mycoplasmes sont insensibles aux antibiotiques qui inhibent l'élaboration de la paroi bactérienne, comme les β -lactamines et les antibiotiques polypeptidiques. Par contre, ils sont réputés être sensibles aux tétracyclines qui interrompent les transferts d'acides aminés dans les complexes ribosomiques, empêchant la croissance des chaînes peptidiques, aux macrolides et lincosamides qui inhibent la synthèse protéique et enfin aux pleuromutilines, aux aminosides et aux quinolones et fluoroquinolones qui affectent l'activité de l'ADN-gyrase (tableau 4).

Les profils antimicrobiens traditionnels ne peuvent pas être utilisés pour déterminer le niveau de résistance des souches de *Mycoplasma* en raison de leur croissance lente et de leurs exigences élevées (milieux de culture complexes). Par conséquent, seules les méthodes de détermination de la CMI par dilution sont applicables.

Tableau 4 : Caractéristiques de trois familles d'antibiotiques utilisées chez les bovins et décrites dans l'étude de (Khalil, 2016).

Familles	Molécules	Effet	Cible
Macrolides	Erythromycine, spiramycine, gamithromycine, tulathromycine, tylosine, tilmicosine	Bactériostatique	Ribosome
Tétracyclines	Oxytétracycline, chlortétracycline	Bactériostatique	Ribosome
Quinolones	Acides nalidixique et oxolinique (1 ^{ère} génération) Fluméquine (2 ^{ème} génération) Enrofloxacin-, danofloxacin-, marbofloxacin-, difloxacin (3 ^{ème} génération)	Bactéricide	Gyrase et topoisomérase

III. 2. Les tétracyclines

III.2.1. Leur mode d'action

Les tétracyclines ont été largement utilisées en médecine vétérinaire et leur résistance est en augmentation. De plus, l'oxytétracycline n'est efficace que lorsque le système immunitaire fonctionne correctement, ce qui limite encore son utilisation (Chopra et Roberts, 2001). La sensibilité des mycoplasmes à la tétracycline est variable et dépend largement de la source de la souche bactérienne. Ainsi, certaines études ont montré que la plupart des souches de *M. bovis* testées *in vitro* sont résistantes (Hannan *et al.*, 1997; Ayling *et al.*, 2000) tandis que d'autres études ont conclu que l'efficacité de la tétracycline est satisfaisante (Cai *et al.*, 2019). En général, elles ne sont pas considérées comme les molécules de choix contre les mycoplasmes.

III.2.2. La résistance chez les mycoplasmes

Le niveau de résistance aux tétracyclines chez les mycoplasmes varie considérablement, que ce soit chez *M. hominis* et *M. pneumoniae*, ou chez des animaux tels que *M. bovis*, *M. bovis* et *M. gallisepticum* (Waites *et al.*, 2014).

La résistance aux tétracyclines repose sur deux mécanismes principaux : la modification de la cible, en l'occurrence l'ARNr 16S, et la protection des ribosomes par la protéine Tet (M) codée par un transposon de la famille Tn916.

Les mutations retrouvées dans l'ARNr 16S réduisent l'affinité des tétracyclines avec le ribosome (Del castillo, 2013). Ce mécanisme est celui le plus répandu et décrit chez les mycoplasmes. Des positions clés ont été définies comme responsables de la perte de sensibilité des mycoplasmes aux tétracyclines. De plus, une corrélation entre le nombre d'allèles mutés (plusieurs copies du 16S) et les valeurs des CMI des tétracyclines a été démontrée chez *M. bovis* (Amram *et al.*, 2015). D'autre part, la protéine Tet (M) n'a été détectée que chez *M. hominis* et *Ureaplasma spp* mais jamais chez *M. pneumoniae* ou *M. bovis* (Grover *et al.*, 2014).

Chez *M. bovis*, la sensibilité aux tétracyclines varie suivant les pays. Plusieurs études d'antibiosensibilité ont montré une augmentation dans les valeurs des CMI 50 (c.à.d. la valeur de CMI de 50% de la population). Dans plusieurs pays européens comme l'Angleterre, les Pays Bas et la Hongrie, les valeurs des CMI 50 de l'oxytétracycline sont supérieures à 8 µg/mL (Heuvelink *et al.*, 2016), alors qu'en Belgique par exemple, les valeurs restent inférieures à 8 µg/mL (Thomas *et al.*, 2003 ; Cai *et al.*, 2019). Ailleurs dans le monde, les résultats de CMI sont aussi hétérogènes et varient entre 2 et 16 µg/mL (Uemura *et al.*, 2010).

Le mécanisme à la base de la perte de sensibilité chez *M. bovis* aux tétracyclines a été recherché dans une étude. Cette étude a montré que la double mutation sur les positions 965 et

967 des deux copies de l'ARNr 16S est corrélée avec l'augmentation des valeurs de CMI (Amram *et al.*, 2015).

Une étude a examiné les mécanismes sous-jacents à la perte de sensibilité aux tétracyclines chez *Mycobacterium bovis*. Cette étude a montré que les doubles mutations aux positions 965 et 967 des deux copies de l'ARNr 16S étaient associées à une augmentation des valeurs de CMI (Amram *et al.*, 2015).

III. 3. Les macrolides

III.3.1. Leur mode d'action

En raison de leur solubilité élevée dans les lipides, les macrolides ont une bonne diffusion tissulaire et une bonne persistance dans différents types de cellules. Ils sont également présents à des concentrations élevées dans les macrophages alvéolaires. Cependant, l'étude *in vitro* d'Ayling *et al.* L'émergence de souches de *M. bovis* résistantes à la tilmicosine a été confirmée et l'efficacité de cette molécule dans le traitement des BPIE a été remise en cause. Cependant, les résultats *in vivo* restent satisfaisants car la molécule cible d'autres agents responsables de maladies respiratoires, notamment *Pasteurella* et *Haemophilus* (Ayling *et al.*, 2000).

Les macrolides ont un usage vétérinaire strict et sont couramment utilisés pour traiter la pneumonie bovine et les infections à mycoplasmes. Les macrolides de nouvelle génération, la tulathromycine et la gamithromycine, sont de plus en plus utilisés pour traiter les maladies à mycoplasmes (Khalil *et al.*, 2016).

Ce sont des molécules bactériostatiques. Ils inhibent la synthèse des protéines en se liant à l'ARNr 23S de la sous-unité ribosomique 50S (Giguère, 2013). Plus précisément, le macrolide se fixe sur un site au niveau de la voie peptidique émergente : ce site est le domaine V de l'ARN 23S, près du fond de la cavité contenant le centre de la peptidyl transférase. Cette liaison empêche la sortie du polypeptide par libération prématurée du peptidyl-ARNt et inhibe la translocation des ribosomes. La nucléobase clé de cette interaction macrolide/ribosome est l'adénine, située en position 2058 du domaine V du 23S (Schlunzen, 2001). D'autres positions dans le ribosome, telles que le domaine II, peuvent jouer un rôle dans les interactions ribosome/macrolide.

De plus, deux protéines ribosomales, L4 et L22, codées respectivement par les gènes *rplD* et *rplV*, sont également impliquées dans cette interaction puisqu'elles jouent un rôle dans le maintien de la structure du ribosome durant le processus de la production protéique (Lovmar, 2009).

III.3.2. La résistance chez les mycoplasmes

A part *M. hominis* qui est intrinsèquement résistant aux macrolides à 14 et 15 chaînons, les autres mycoplasmes, comme *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* et *M. bovis* sont naturellement sensibles aux macrolides. Néanmoins, les résultats récents de la détermination de la sensibilité des mycoplasmes aux macrolides montrent une augmentation des valeurs des CMI₅₀ dans beaucoup de pays européens et ailleurs dans le monde (Waites, 2013).

Les mutations du site de liaison des macrolides avec le ribosome dans les domaines II et/ou V des sous-unités 23S des ARN ribosomiaux ainsi que dans les gènes *rplD* et *rplV* sont les mécanismes principaux conférant la résistance aux macrolides chez les mycoplasmes (Pereyre, 2002).

Les souches récentes de *M. bovis* isolées entre 2009 et 2012 en France sont résistantes aux macrolides avec une CMI supérieur à 64 µg/mL, alors que celles isolées entre 1978 et 1979 sont sensibles (CMI < 1 µg/mL) (Bouchardon *et al.*, 2014).

Chez *M. bovis*, une étude assez récente a montré que l'accumulation des mutations dans les deux domaines II et V de la sous unité 23S du ribosome est en corrélation avec la perte de sensibilité des souches de *M. bovis*. De plus, des substitutions multiples d'acides aminés ont été identifiées dans la protéine L4, aux positions 185-186 qui sont adjacentes au site de liaison du macrolide (Lerner *et al.*, 2014). En Chine, les souches de *M. bovis* s'avèrent aussi résistantes aux macrolides (CMI >64 µg/mL pour tylosine et tilmicosine) mais ne présentent qu'une seule mutation dans une seule copie de l'ARN 23S et plus précisément dans le domaine V, à la position 2058. Ces résultats suggèrent l'implication d'autres mécanismes moléculaires pour expliquer la résistance phénotypique observée (Kong, 2015).

III.4. Les fluoroquinolones

III.4.1. Leur mode d'action

Ces substances sont les seuls antibiotiques mycoplasmicides à faible concentration. La plupart des mycoplasmes sont sensibles aux fluoroquinolones, notamment à l'enrofloxacin (BAYTRIL®), avec de très bons résultats *in vitro* (Hannan *et al.*, 1997) et sur le terrain, par contre les études de (Khalil *et al.*, 2016) montre une très haute résistance aux fluoroquinolones.

La Danofloxacin (ADVOCIN®) se révèle également efficace dans la lutte contre la propagation de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC au sein des troupeaux (Hubschle *et al.*, 2006). L'utilisation des fluoroquinolones, notamment de dernière génération (marbofloxacin) est cependant de plus en plus critiquée, voir déconseillée en médecine des animaux de rente, du fait d'une possibilité d'apparition rapide de résistances. Les bactéries peuvent en effet sélectionner des mutations chromosomiques *de novo* leur permettant rapidement une résistance aux fluoroquinolones par une protection de l'ADN-gyrase. Afin d'éviter que ces résistances

n'apparaissent, il semble essentiel de contrôler l'utilisation de ces molécules. Aucune résistance à la marbofloxacin n'a cependant été mise en évidence chez les mycoplasmes (Kroemer *et al.*, 2012).

Les fluoroquinolones empêchent la réplication de l'ADN bactérien en bloquant l'activité de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV. La fixation des fluoroquinolones sur la gyrase, pendant la phase de duplication de l'ADN, inhibe ce processus. L'interaction des quinolones avec la topoisomérase IV, protéine impliquée dans le surenroulement de l'ADN, induit des cassures dans cette dernière. Les quinolones se fixent aussi sur les extrémités des brins d'ADN qui alors ne peuvent plus se réassembler. La formation de ce complexe ADN-quinolones est irréversible et conduit à la mort cellulaire. De ce fait, les fluoroquinolones sont des antibiotiques bactéricides (Giguère, 2013).

III.4.2 La résistance chez les mycoplasmes

La résistance aux fluoroquinolones a déjà été décrite chez plusieurs espèces de mycoplasmes qu'elles soient d'origine humaine ou animale (Gharaibeh et Al-Rashdan, 2011).

Contrairement aux tétracyclines et aux macrolides, la sensibilité de *M. bovis* aux fluoroquinolones est toujours satisfaisante. Malgré la détection de quelques isolats cliniques résistants, les populations de *M. bovis* dans le monde restent sensibles avec des valeurs de CMI₅₀ qui ne dépassent pas 1 µg/mL (Lysnyansky et Ayling, 2016). Le même cas de figure a été récemment reporté chez *M. agalactiae* (Poumarat *et al.*, 2016). Néanmoins, en Angleterre, la valeur de CMI₉₀ (c'est-à-dire la valeur de CMI de 90% de la population) de l'enrofloxacin est passée de 0,25 µg/mL en 2004 plus de 32µg/mL en 2009 (Ayling *et al.*, 2014). Au Japon, les isolats de *M. bovis* ont des CMI élevées variant de 2,5 à 16 µg/mL (Sato *et al.*, 2013). En France, d'après (Bouchardon *et al.*, 2014), la CMI₅₀ des souches françaises isolées entre 1978 et 1979 est de 0,25 µg/mL alors que celle des souches isolées entre 2009 et 2012 est de 0,5 µg/mL.

Plusieurs mécanismes de résistance ont été identifiés chez les mycoplasmes comme la modification de la cible due à des mutations ponctuelles des gènes codant les protéines cibles (Gruson, 2005). La modification de la cible dans le cas des fluoroquinolones est un ensemble de substitutions de nucléotides dans des régions appelées QRDR (quinolone resistance determining regions) des gènes codant les gyrases et les topoisomérases : *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*.

D'autres mécanismes de résistance existent aussi comme des mécanismes d'efflux qui résultent d'une surexpression des deux gènes codant pour une pompe ATP dépendante dans le cas des souches de *M. hominis* résistantes également au bromure d'ethidium (Raheison *et al.*, 2005). Ce mécanisme n'a été caractérisé que chez cette espèce de mycoplasme pour les

fluoroquinolones.

Récemment, une résistance aux fluoroquinolones a été identifiée chez des souches de *M. bovis* isolées au Japon (Uemura, 2010). Cette résistance est codée par des mutations ponctuelles dans les régions QRDR et plus précisément des gènes *gyrA* et *parC* (Sato, 2013). Les mutations, généralement liées à la résistance et donc appelées « hot spots », sont généralement Ser83Phe/Leu dans GyrA, Ser80Ile, Ser81Tyr et Asn84Asp dans ParC (Lysnyansky et Ayling, 2016).

PARTIE
EXPÉRIMENTALE

Matériels et Méthodes

M. bovis est une bactérie pathogène des bovins, à l'origine de signes cliniques divers, tels des mammites, des arthrites, des otites et des bronchopneumonies. Les Mycoplasmoses à *M. bovis* ont un fort coût économique et leur contrôle impose une importante mobilisation sanitaire et un recours très fréquent à l'antibiothérapie. Cette étude est une première en Algérie qui va nous permettre de reconnaître les différents sous types de *M. bovis* circulant en Algérie et d'évaluer le danger potentiel que pourrait représenter la présence de souches résistantes cause primordiale dans l'échec des programmes thérapeutiques et donc d'éviter les lourdes pertes économiques engendrées par ces redoutables pathogènes.

L'objectif de ce travail consiste à étudier les Mycoplasmoses respiratoires à *M. bovis* incriminées chez les bovins en général et les veaux en particulier dans les bronchopneumonies enzootiques sévères.

Cette étude se base sur la détection de la présence de *M. bovis* chez les veaux souffrant d'atteintes respiratoires à partir de lavages broncho alvéolaires ainsi que sur des sérums dans les différentes régions de l'Est Algérien. Nous avons eu recours à des techniques sérologiques (ELISA, MF-Dot), moléculaires (PCR en temps réel et PCR classique), un sous-typage des souches, la construction de l'arbre phylogénique et enfin l'établissement, d'un profil de résistance des souches de *M. bovis* vis-à-vis des différents antibiotiques.

I. 1. Matériels

I. 1.1. Récolte des échantillons sur des veaux en Algérie

Nous avons commencé notre travail par des enquêtes réalisées dans plusieurs exploitations des régions d'études et cela pour un échantillonnage représentatif, notre choix s'est arrêté sur 7 régions toutes situées dans l'est de l'Algérie.

Ces régions et ces exploitations ont été retenues sur la base des critères suivants :

- L'effectif important d'élevage des veaux de boucherie.
- L'aide des praticiens vétérinaires pour avoir accès aux fermes.
- L'autorisation des éleveurs à procéder à des prélèvements tels que la prise de sang et le lavage broncho alvéolaire.

I.1. 2. Présentation des régions d'étude

Le travail vise à estimer l'importance des infections à mycoplasmes chez les bovins en Algérie. Ainsi, 7 régions où l'élevage bovin présente un intérêt particulier ont été choisies. Il s'agit des régions de Batna, Sétif, Constantine, Biskra, Oum El Bouaghi, Khanchla et M'sila (voir Figure. 8). Ce sont des régions qui reçoivent pour engraissement de très nombreux jeunes bovins de boucherie d'origine diverse, destinés surtout à la consommation de viande.

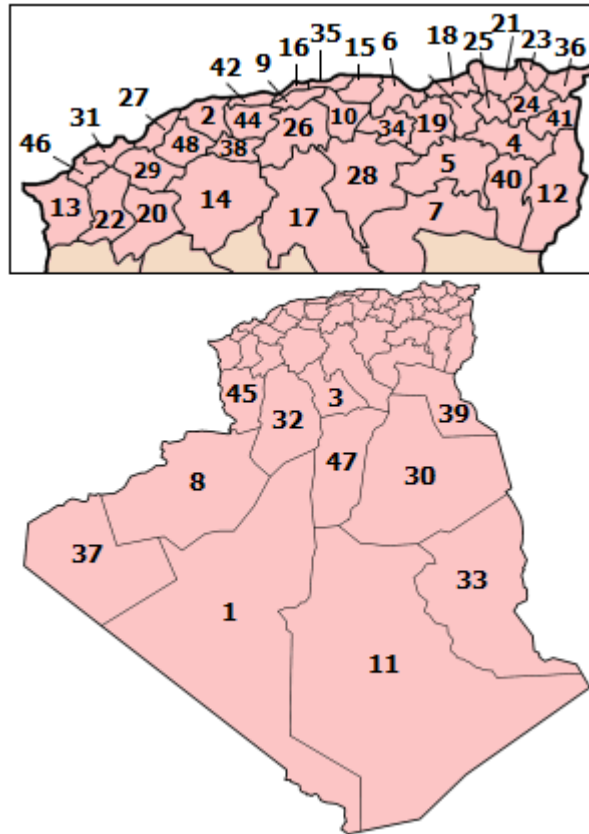


Figure 8: Carte Administrative de l'Algérie (Anonyme 3).

(Oum el bouaghi (04), Batna (05), Biskra (07), Sétif (19), Constantine (25), M'sila (28), Khanchla (40))

- La wilaya d'Oum El Bouaghi (Wilaya N° 04)

La wilaya d'Oum El Bouaghi se situe au Nord-Est de l'Algérie, à environ 468 Km de la capitale Alger. Elle s'étend sur une superficie de 6738 km², et compte une population de 621.612 habitants (D.P.S.B. Oum El Bouaghi, 2020).

- La Wilaya de Batna (Wilaya N°05)

La Wilaya de Batna est située dans la partie orientale (Est) de l'Algérie, à environ 432 Km de la capitale Alger. Elle s'étend sur une superficie de 12192Km², avec une population de 1119,791 habitants (D.P.S.B. Batna, 2020).

- La wilaya de Biskra (Wilaya N°07)

La wilaya de Biskra est située Au Sud –Est Algérien entre la région des Aurès et les Ziban à environ 439 Km de la capitale Alger, Elle s'étend sur une superficie de 2167 ,20 Km² et compte une population de 721356 habitants (D.P.S.B. Biskra, 2020).

- La Wilaya de Sétif (Wilaya N°19)

La Wilaya de Sétif est située au Nord-Est Algérien dans les hauts-plateaux, à environ 270 Km de la capitale Alger. Elle présente une superficie de 6504Km² et une population de 2988.145 habitants (D.P.S.B. Sétif, 2020).

- La wilaya de Constantine (Wilaya N°25)

La région de Constantine qui est l'une des villes les plus importantes de l'Est Algérien à environ 390 Km de la capitale Alger s'étend sur une superficie de 2288Km², elle compte une population de 938475 habitants (D.P.S.B. Constantine, 2020).

- La wilaya de m'sila (Wilaya N°28)

La wilaya de M'sila est située au Sud-Est Algérien, elle fait partie de la région des hauts plateaux du centre-Est du pays. A environ 237 Km de la capitale Alger, elle s'étend sur une superficie de 18 718 Km² et une population de 991 846 habitants (D.P.S.B. m'sila, 2020).

- La wilaya de Khenchla (Wilaya N°40)

La wilaya de Khanchla est située à l'Est Algérien, à environ 528 Km de la capitale Alger, elle s'étend sur une superficie de 9811 Km², et compte une population de 386683 habitants (D.P.S.B. Khenchla, 2020).

Tableau 5 : Evolution du cheptel bovin (nombre de têtes) en Algérie et dans les wilayas de l'étude entre 2012 -et 2021 (MADR, 2021).

Wilaya	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020 /2021
Oum El Bouaghi	46 215	49 846	58 639	62 022	60 650	45 000	38 000	34 137	31570
Batna	54 007	66 497	78 292	84 073	45 450	53 019	59 249	65 052	66081
Biskra	3 894	3 991	4 850	4 995	5 010	5 055	5 055	5 085	5085
Sétif	128 374	132 270	134 180	161 909	160 602	156 879	15 5263	15 1446	14 7363
Constantine	49 050	51 535	53 220	61 900	55 177	53 350	39 457	41 874	41 705
M'sila	26 800	27 650	32 700	29 000	32 600	33 500	34 700	35 000	34 550
Khenchla	18 800	21 100	21 844	23 330	22 205	17 780	15 930	16 355	14 430
Total Algérie	4 397 886	4 671 997	4 862 903	5 256 474	5 377 548	5 439 024	1 816 280	1 780 591	1 740 183

I. 1.3. Caractérisation des élevages et des animaux

L'étude expérimentale s'est étalée sur une période allant d'Avril 2018 jusqu'en Aout 2021.

Les prélèvements ont été réalisés par ma personne à raison de 2 à 3 visites par jour, visant les fermes où il y avait des veaux atteints de maladies respiratoires suite aux appels des éleveurs ou des vétérinaires privés.

Les animaux prélevés étaient des veaux de boucherie de différentes races, âgés de 03 jour-22 mois. Ils présentaient des symptômes caractéristiques telles que l'hyperthermie, la toux, le jetage et la dyspnée.

Les animaux provenaient tous d'élevages semi intensifs (fermes pilotes et fermes mixtes) voir photos 1 et 2. Le statut sanitaire des élevages contre la tuberculose et la brucellose était indemne. Un questionnaire de caractérisation des élevages a été fait (voir questionnaire en

annexe1).

Tous les bâtiments ont subi un nettoyage et une désinfection rigoureuse ainsi qu'un vide sanitaire périodique.

Certains animaux qui présentaient des signes d'une atteinte respiratoire avaient reçu un traitement antibiotique par les vétérinaires praticiens.



Photos 1: Fermes pilotes pour l'échantillonnage.



Photos 2: Fermes mixtes pour l'échantillonnage.

I.2. METHODES

I. 2.1. Prélèvements

A. Pour la sérologie :

Des prélèvements sanguins ont été réalisés aussi bien sur des animaux présentant des symptômes respiratoires, que sur d'autres apparemment sains (3 sujets malades et 3 sujets sains dans chaque exploitation visitée).

Sur chaque animal, 5 ml de sang sont prélevés par la veine jugulaire dans des tubes sous vides, sans anticoagulant. La préparation des sérums a été réalisée au Laboratoire de Microbiologie, du Département des Sciences Vétérinaires, Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques, Université Batna 1. Le tube est centrifugé à 3000t/mn pendant 15 mn, puis le sérum est récolté et placé dans des Eppendorf et stocké à - 80°C au laboratoire de biotechnologie des molécules bioactives et de la physiopathologie cellulaire (LBMBPC) Batna 2.

B. Pour l'isolement des mycoplasmes : LBA

Les prélèvements des LBA ont été réalisés sur les mêmes animaux malades ayant été prélevés pour la sérologie.

Le lavage broncho-alvéolaire par voie nasotrachéale permet le prélèvement de cellules, de bactéries et de virus présents dans la lumière des voies respiratoires profondes sans recourir ni à l'endoscopie (couteuse et lourde à mettre en œuvre) ni à l'aspiration trans-trachéale (Giraud *et al.*, 2002).

- Mode opératoire

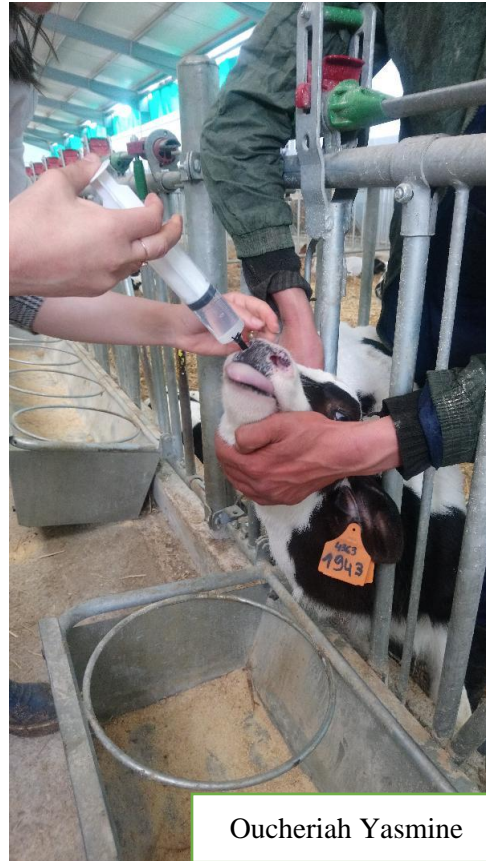
- Procéder tout d'abord à la contention qui doit être assurée par deux personnes. Le veau est bloqué en arrière dans un angle du bâtiment. Une première personne tient l'arrière du veau, l'autre l'encolure et la tête.
- Remplir la seringue stérile de 60 ml de solution stérile de NaCl à 0,9%.
- Nettoyer l'orifice nasal à l'aide d'une lingette imprégnée d'une solution désinfectante (alcool à 70 %).
- Maintenir la tête de l'animal en extension vers le haut et dans le prolongement de l'encolure.
- Introduire la sonde le long du septum nasal puis dans le méat ventral en guidant avec l'index. Le réflexe de toux et l'extériorisation de la langue confirment son passage dans la trachée (Photo 3 et Photo 4).
- Pousser la sonde jusqu'au blocage dans une grosse bronche et la maintenir en place.
- Injecter 60 mL de Na Cl (Photo 6).
- Ré-aspirer immédiatement le liquide de lavage broncho-alvéolaire avec la même seringue en dirigeant la sonde vers le bas (on récupère environ 30% du volume injecté) (Photo 7 et Photo 8).
- Transférer le liquide d'aspiration dans un pot stérile de 40 ml identifié.



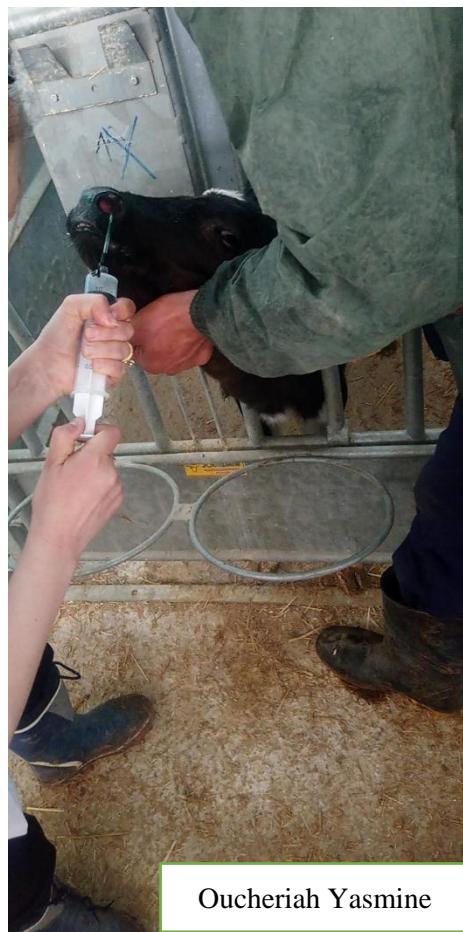
Oucheriah Yasmine

Photos 3: Introduction de la sonde.

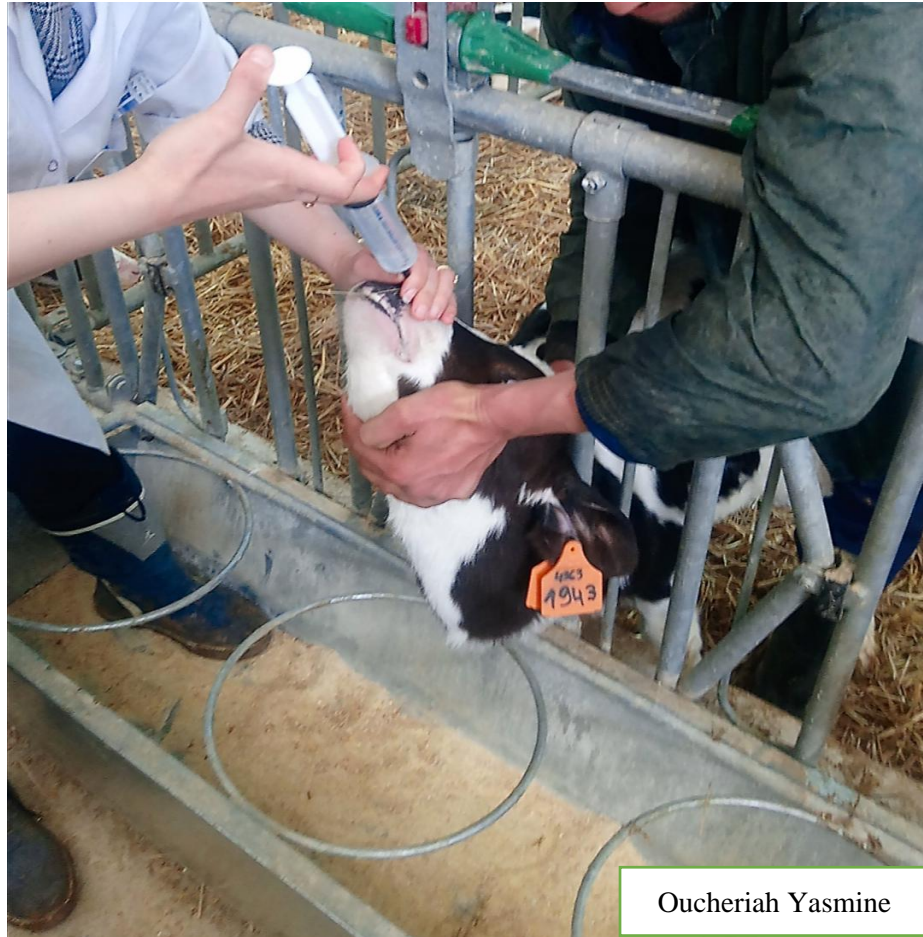
(Tenir la sonde comme un stylo, la faire progresser et la maintenir médialement et ventralement).



Photos 4: L'extériorisation de la langue indique un passage dans la trachée.



Photos 5: Sonde maintenue dans l'orifice nasal.



Photos 6: Injection du liquide physiologique (Na Cl 0 ,9%).



Oucheriah Yasmine

Photos 7: Ré-aspiration immédiate du liquide en dirigeant la sonde vers le bas.



Oucheriah Yasmine

Photos 8: Récupération du liquide (LBA).

I. 2.2. Stockage et transport des échantillons

Les LBA sont immédiatement placés dans une glacière avec réfrigérants et transportés au laboratoire où ils seront conservés dans un congélateur à -80°C et ultérieurement transportés congelés aux laboratoires en France.

Tous les prélèvements effectués ont été transportés à l'Anses de Maisons-Alfort à Paris, pour garantir l'absence de virus de la Fièvre Aphteuse avant de les analyses pour la recherche des mycoplasmes.

Les échantillons ont été transportés en France avec la carboglace (Photos 9), acheminés ensuite directement au laboratoire à Lyon où les analyses ont été effectuées.



Photos 9: Préparation des échantillons dans la carboglace pour les transporter en France.

I. 2.3. Le dépistage sérologique par ELISA

A partir des prélèvements sanguins, on a procédé à la recherche des anticorps anti-*M. bovis* par le protocole présenté ci- dessous (figure 9).

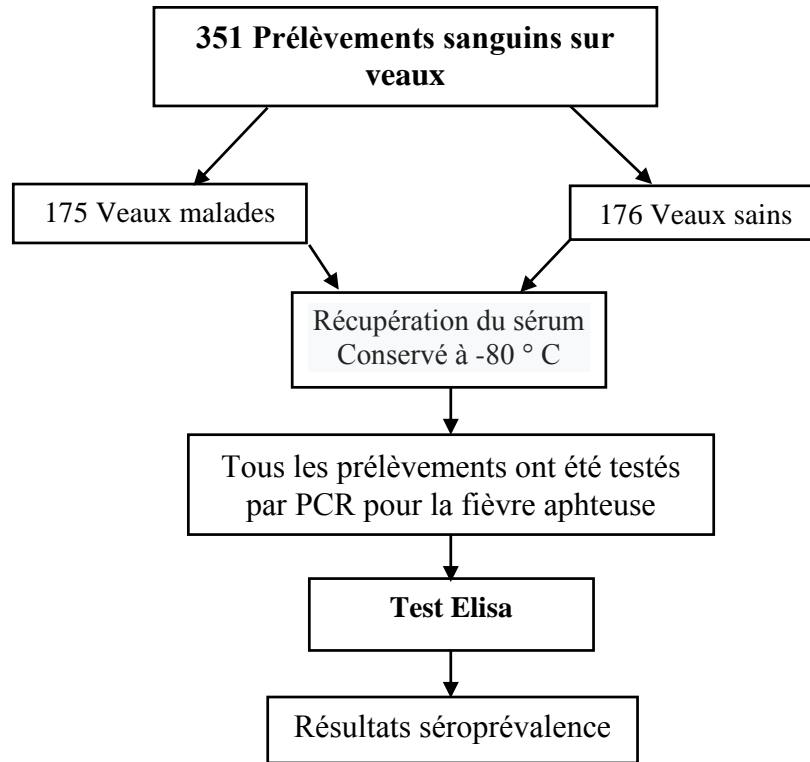


Figure 9: Organigramme de l'analyse sérologique.

C'est une méthode de diagnostic indirect, elle a pour but de mettre en évidence les anticorps dirigés contre *M. bovis* présents chez l'animal avec le kit IDVet (ID Screen ° *M. bovis* indirect) (Photo 10) selon le protocole ci-dessous (Andersson *et al.*, 2019):



Photos 10: Le kit IDVet (ID Screen ° *M. bovis* indirect).

- Laisser les réactifs atteindre la température ambiante ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) avant utilisation.
Homogénéiser tous les réactifs par inversion ou vortex dans une plaque de 96 puits.

1. Ajouter

- 195 µl de tampon de dilution 13 dans chaque puits
- 5 µl du contrôle négatif aux puits A1 et B1.
- 5 µl de contrôle positif aux puits C1 et D1.
- 5 µl de chaque échantillon à tester dans les puits restants.

2. Couvrir la plaque et incuber 45 min \pm 5 min à 21 ° C (\pm 5 ° C).
 - Videz les puits.
3. Laver chaque puits 3 fois avec au moins 300 μ l de la solution de lavage. Eviter le séchage des puits entre lavages
4. Préparez-le conjugué 1X en diluant le conjugué concentré 10X à 1/10 en dilution tampon.
5. Ajouter 100 μ l de Conjugué 1X dans chaque puits
6. Couvrir la plaque et incuber 30 min \pm 3 min à 21 ° C (\pm 5 ° C).
7. Videz les puits. Laver chaque puits 3 fois avec au moins 300 μ l de la solution de lavage. Eviter le séchage du puits entre les lavages.
8. Ajouter 100 μ l de substrat dans chaque puits.
9. Couvrir la plaque et incuber 15 min \pm 2 min à 21 ° C (\pm 5 ° C) dans le noir.
10. Ajouter 100 μ l de solution d'arrêt dans chaque puit, dans le même ordre que dans l'étape n ° 8, pour arrêter la réaction
11. Lire avec un lecteur de microplaque à spectrophotomètre à 450 nm (Tecan) et noter la DO (Densité Optique) (Photos 11).



Photos 11: Le lecteur de microplaque à spectrophotomètre.

12. Le test est considéré comme valide si la valeur moyenne de la DO du contrôle positif est supérieure à 0,350 et si le rapport entre la moyenne des contrôles positifs et la moyenne des contrôles négatifs est supérieur à 3. Pour chaque échantillon de sérum, le pourcentage échantillon / positif (S / P%) est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$S/P\% = (DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{m control negatif}} / DO_{\text{m controle positif}} - OD_{\text{m controle negatif}}) \times 100$$

Le pourcentage S / P pour chaque échantillon a été utilisé pour classer l'échantillon comme positif ou négatif en utilisant la valeur seuil fournie par le fabricant (positive si le S / P% \geq 50%).

I. 2.4. Le diagnostic bactériologique et moléculaire

A partir des LBA prélevés, on procède à la recherche de *M.bovis* par différentes techniques (figure 10) présentées ci- dessous.

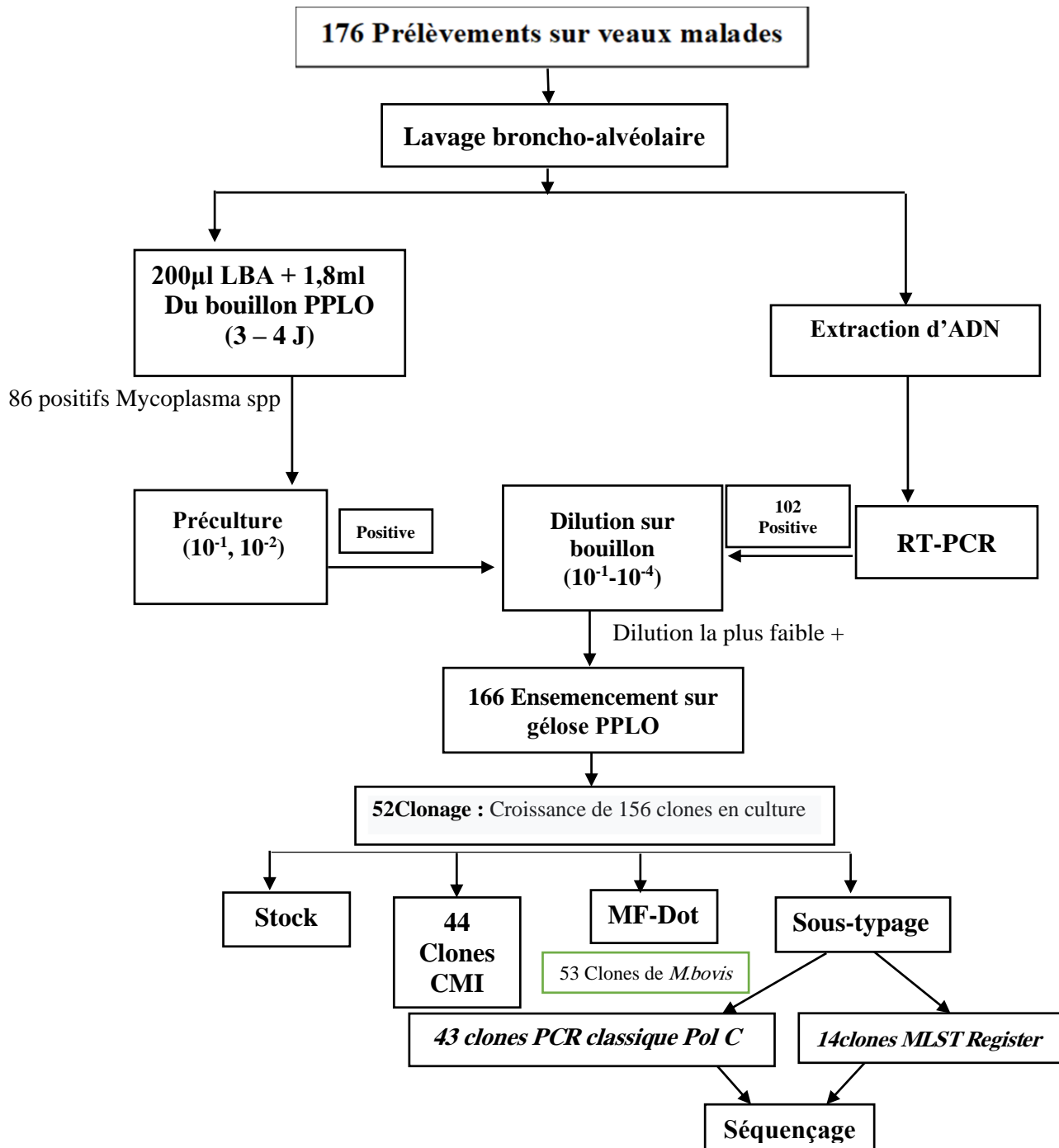


Figure 10: Différentes manipulations réalisées sur les LBA prélevés sur veaux malades.

I. 2.5. La Préculture

Ceci consiste à mettre 200 µl du LBA récolté à partir des animaux malades dans 1,8 ml de bouillon PPLO (Pleuropneumonia-like organism) à reconstituer (Photo 12) composé du milieu de base, de supplément (Indicia). De l'amoxicilline (Clamoxyl ND), antibiotique qui rend le milieu sélectif et permet d'éliminer la croissance d'autres bactéries, est ajouté au milieu à une concentration de 2 mg/ml (Poumarat *et al.*, 1991). La suspension est incubée à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24h à 48 h dans le but de revivifier les microorganismes présents dans les LBA préalablement congelés à -80 C° en Algérie.



Photos 12: Tube de bouillon PPLO.

I. 2.6. L'extraction D'ADN à partir des LBA : avec le kit BioExtract® Column

En parallèle à la préculture, une extraction d'acides nucléiques à partir des LBA est entreprise afin de s'assurer de la présence de *M. bovis* dans l'échantillon en question par la technique de la PCR en temps réel (rt-PCR). C'est un kit d'extraction et de purification d'acides nucléiques totaux (ARN et ADN) en colonnes de silice individuelles pour la recherche d'agents pathogènes (bactéries, virus, parasites) à partir d'échantillons d'origine animale ou de leur environnement et cela en différentes étapes (figure 11).

Méthode :

- Préparer les consommables : deux tubes de 1.5 ml par échantillon à extraire (non fourni dans le kit), et une colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un tube collecteur. Les annoter sur le capuchon avec le nom de l'échantillon à extraire.
- Préparer les différentes solutions
- Lyse et ajustement des conditions d'Adsorption
Dans un tube de 1.5 ml identifié :

- Ajouter 20 µl de protéinase K.
- Ajouter 200 µl d'échantillon, en fonction de la matrice à traiter.
- Ajouter 100 µl de solution de lyse LA-carrier.
- Vortexer.
- Incuber 15 min à 15–25°C (à température ambiante).
- Centrifuger brièvement puis ajouter 350 µl de Buffer LB.
- Vortexer puis centrifugé brièvement.
- Adsorption sur la membrane de silice
 - Transférer délicatement la totalité du volume dans la colonne BioExtract® Mini Spin Column (déjà placée dans un tube collecteur de 2 ml).
 - Centrifuger à 6 000 g pendant 1 min.
 - Changer de tube collecteur (Placer la colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube collecteur contenant le filtrat).
- Lavages et Séchage de la membrane de silice
 - Ajouter 600 µl de Buffer W1.
 - Centrifuger à 6 000 g pendant 1 min. Changer de tube collecteur.
 - Ajouter 600 µl de Buffer W2.
 - Centrifuger à 6 000 g pendant 1 min. Changer de tube collecteur.
 - Centrifuger à 20 000 g pendant 2 min (ou à 16 000g pendant 3 minutes) pour sécher la membrane.
- Elution
 - Placer la colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un nouveau tube de 1.5 ml identifié, et jeter le tube collecteur contenant le filtrat.
 - Ajouter 50µl de Buffer EL (à température ambiante) délicatement au centre de la membrane.
 - Incuber à température ambiante (15–25°C) pendant 1 min.
 - Centrifuger à 20 000 g pendant 1 min (ou à 16 000g pendant 2 minutes).
 - Jeter la colonne.
 - Conserver le tube de 1.5ml contenant les 50 µl d'extrait d'acides nucléiques purifiés.
















<p>1</p> <p>Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption</p>	 <p>20 µl de protéinase K 100-200 µl d'échantillon* 100 µl de solution de lyse LA-carrier (Pour 1 : 100 µl Buffer LA / 1 µl carrier RNA / 5 µl IPC exogène)</p> <p>Température ambiante (TA) 15 min</p> <p>350 µl de Buffer LB</p>												
<p>2</p> <p>Adsorption sur la membrane de silice</p>	 <p>Charger la colonne BioExtract® Mini Spin Column délicatement</p> <p> 6 000 x g 1 min</p>												
<p>3</p> <p>Lavages</p> <p>Séchage de la membrane de silice</p>	 <table border="0"> <tr> <td>1^{er} Lavage</td> <td>600 µl W1</td> <td></td> <td>6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>2nd Lavage</td> <td>600 µl W2</td> <td></td> <td>6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>-</td> <td></td> <td>20 000 x g 2 min (ou 16 000xg 3 min)</td> </tr> </table>	1 ^{er} Lavage	600 µl W1		6 000 x g 1 min	2 nd Lavage	600 µl W2		6 000 x g 1 min	-	-		20 000 x g 2 min (ou 16 000xg 3 min)
1 ^{er} Lavage	600 µl W1		6 000 x g 1 min										
2 nd Lavage	600 µl W2		6 000 x g 1 min										
-	-		20 000 x g 2 min (ou 16 000xg 3 min)										
<p>4</p> <p>Elution des acides nucléiques</p>	 <p>50-100 µl de Buffer EL* (TA) délicatement</p> <p>TA 1 min</p> <p> 20 000 x g 1 min (ou 16 000xg 2 min)</p>												

Figure 11: Protocole simplifié de l'extraction d'acides nucléiques par le kit Bioextract Column.

I. 2.7. La Réaction de Polymérisation en Chaîne en Temps Réel (rt-PCR)

La détection des agents étiologiques présents dans les prélèvements de lavage broncho-alvéolaire des veaux, est réalisée par une PCR en temps réel d'après le kit LSI VetMAX™ Screening Pack-Ruminant Respiratory Pathogens (Photo 13), Le kit permet la détection simultanée de *M. bovis*, *Histophilus. Somni*, *Pasteurella. Multocida*, *Mannheimia. haemolytica*, (*BCV*), *Bovine Corona Virus*, *bovine respiratory syncytial virus (BRSV)*, and *parainfluenza-3 virus PI-3*.



Photos 13: Le kit LSI VetMAX™ Screening Pack-Ruminant Respiratory Pathogens.

Méthode :

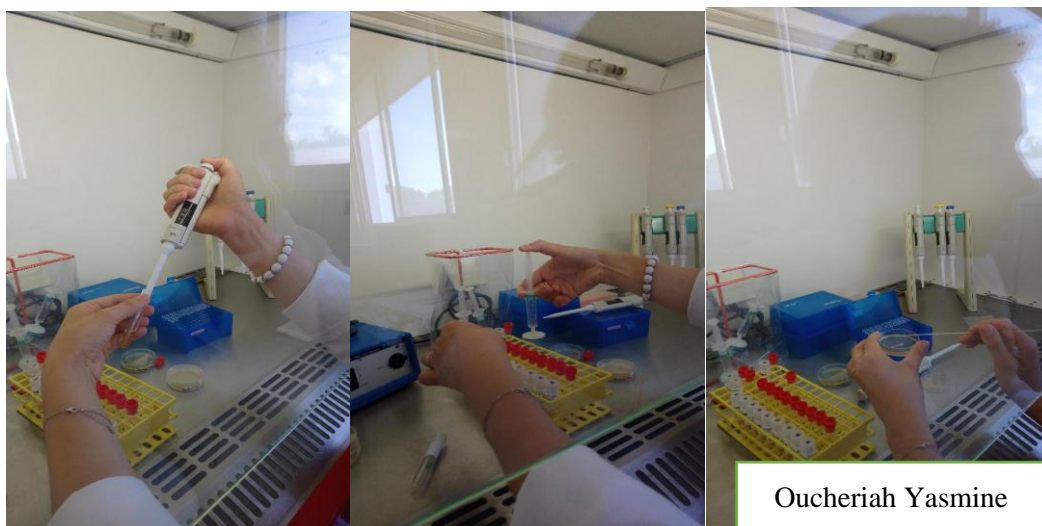
- Créer un plan d'analyse pour la distribution des mix et échantillons. Eloigner si possible le contrôle positif (EPC) des autres échantillons.
- Distribuer 20 µl de chaque Mix décongelé par puits de la microplaque PCR.
- Déposer ensuite 5 µl d'Extrait d'acides nucléiques (cf partie précédente).
- Fermer la plaque PCR avec un film adhésif.
- Mettre dans le thermocycleur (Photo 14) avec le programme suivant : 45 °C pendant 10 min, 95 °C pendant 10 min puis 45 cycles à 95 °C pendant 15 s et 60 °C pendant 1 min.
- Seuls les résultats avec un Ct < 37 étaient considérés comme positifs (Wisselink *et al.*, 2019).



Photos 14: Le thermocycleur de (rt-PCR).

I. 2.8. Le clonage des souches

À partir des précultures positives (visibles au trouble du milieu de culture) et confirmées positives à *M. bovis* en rt-PCR, on commence par faire des dilutions en milieu liquide 10^{-1} à 10^{-4} . Ces dilutions sont cultivées pendant 2 à 3 jours. Pour chaque échantillon, la dilution positive la plus faible a été filtrée à travers un filtre à membrane de $0,22 \mu\text{m}$ (Photo 15) et $10 \mu\text{L}$ de ce bouillon filtré ont été ensemencés sur des plaques de gélose PPLO (Pleuropneumonia-like organisms) (Indicia Production, Saint-Genis-L'Argentière, France) additionnées de 0,1 % de Tween 80 pour empêcher la croissance de *M. bovirhinis* (Shimizu, 1983), puis incubé à 37°C avec 5% de CO_2 pendant 48 h. *M. bovirhinis* est un organisme commensal des voies respiratoires bovines qui peut entraver l'isolement de *M. bovis* à mesure qu'il se développe plus rapidement. Les colonies visibles et isolées sont repérées sous loupe binoculaire ($\times 40$) et ensuite piquée : Un maximum de 3 colonies par échantillon ont été sélectionnées au hasard, puis cueillies avec un cure-dent en bois et ensuite cultivées dans un bouillon PPLO de 4 ml. Chaque unité formant colonie isolée a ensuite été considérée comme un clone.



Photos 15: Différentes étapes du clonage.

Une fois la culture positive, chaque tube est utilisé ainsi :

- Un stock du clone au congélateur à -20°C (2ml).
- Le test MF- Dot (1ml).
- L'extraction d'ADN ($200 \mu\text{l}$).
- La CMI ($200 \mu\text{l}$).

I. 2.9. La filtration sur membrane DOT immunobinding (MF-Dot)

L'identification de l'espèce de mycoplasme est effectuée par la technique immunoenzymatique du MF-Dot (Poumarat *et al.*, 1991; Poumarat, 1998). L'identification a été systématiquement vérifiée par MF-Dot (Photo 16) pour chaque clone.

- 1. Préparation de la plaque

Préparer un plan de plaque avec les différentes souches à analyser ainsi que les différents sérums testés. Travailler soit en mettant une souche par ligne et les sérums en colonnes (plan utilisé dans notre étude) soit en plaçant une souche par colonne et les sérums en lignes.

Identifier les échantillons et les sérums sur la plaque en suivant le plan préalablement établi

- 2. Fixation des antigènes sur les membranes

Répartir 200µl des cultures à tester par cupule en respectant le schéma de la plaque. Vidanger la plaque en appliquant une dépression maximale de -50 à -60 kPa pendant moins d'une minute. Éponger le dessous de la plaque à l'aide d'un mouchoir en ouate de cellulose.

- 3. Blocage

Répartir 200µl de la solution de blocage par cupule. Agiter lentement (environ 100rpm) pendant 30 minutes sur un agitateur de plaque. Ensuite, vidanger la plaque.

- 4. Réaction antigène/anticorps

La préparation des sérums dilués doit se faire au maximum environ 30 min avant de les utiliser. Commencer par identifier les tubes et les réservoirs correspondants avec les noms des sérums. On les prépare extemporanément, au mieux durant le temps d'action de la solution de blocage.

Répartir 200µl des solutions de sérums dilués dans les cupules correspondantes. Agiter lentement pendant 45 min minimum. Réaliser 3 cycles de lavage-vidange de 5min avec 200µl de solution de TBS 1X + 0.05% de Tween 20 par cupule en agitation lente. Effectuer alors un cycle de lavage-vidange de 5min avec 200µl de solution de TBS 1x par cupule en agitation lente.

- 5. Réaction anticorps/conjugué

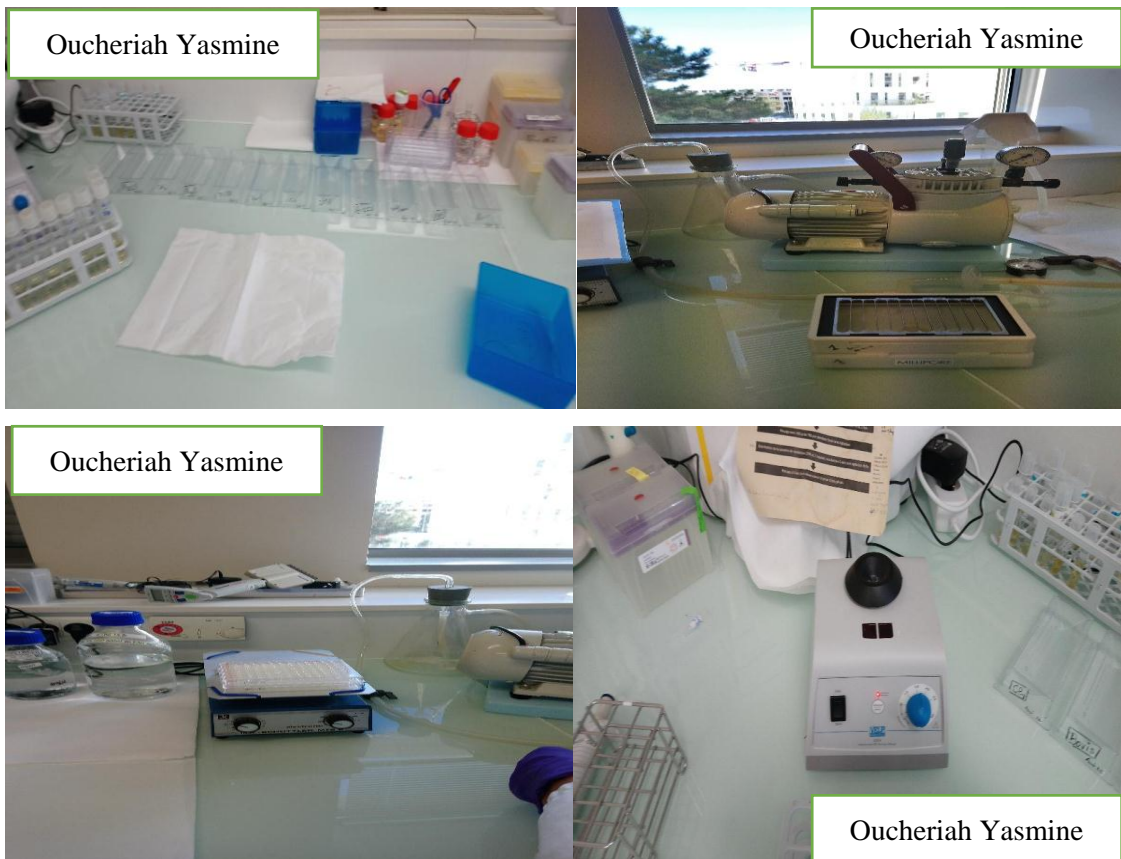
Répartir 200µl par cupule de la solution de conjugué et incuber 30 min sous agitation. Effectuer un cycle de lavage-vidange de 5 min avec 300µl par cupule de solution de TBS 1X + 0.05% de Tween 20 sans agitation. Poursuivre avec 2 cycles de 5 min avec 200µl de cette solution sous agitation. Finir avec un cycle de lavage-vidange de 5 min avec 200µl par cupule de solution de TBS pur en agitation lente.

- 6. Révélation et lecture

Répartir 200µl par cupule de la solution révélatrice préparée au moment de l'emploi. Agiter fortement jusqu'à l'obtention d'une coloration rouge brun intense dans les cupules des antigènes témoins. Laisser ensuite sous agitation plus lente pendant 5 min. Lorsque la réaction est complète, rincer délicatement et sans aspiration la plaque à l'eau en versant les solutions à l'évier.

- 7. Expression des résultats

Prendre la plaque en photo et l'enregistrer sur l'ordinateur



Photos 16: Différentes étapes de la membrane de filtration DOT immunobinding (MF-Dot).

I. 2.10. L'extraction d'ADN à partir des cultures

L'extraction des ADN est réalisée par le kit Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit). L'extraction de l'ADN génomique se fait en plusieurs étapes (figure 12).

Méthode :

Aliquoter le volume nécessaire de tampons (PK/Tampon AL/Ethanol/AW 1-2) pour traiter les échantillons.

- Pipeter 20 μ l de protéinase K et les mettre dans un tube de 1.5ml
- Ajouter 200 μ l d'échantillon (Culture)
- Ajouter 200 μ l de tampon AL
- Vortex pendant 15 secondes.
- Incuber 20 minutes à 56°C sous agitation douce (200 rpm)
- Centrifuger brièvement à 8000 rpm à 4°C
- Ajouter 200 μ l d'éthanol (96-100%)
- Vortexer
- Centrifuger brièvement
- Mettre le mélange dans la colonne

- Centrifuger 8000 rpm pendant une minute
- Changer le tube collecteur
- Ajouter 500 µl de tampon AW1 dans la colonne
- Centrifuger à 8000 rpm pendant une minute
- Changer le tube collecteur
- Ajouter 500 µl de tampon AW2 dans la colonne
- Centrifuger a 14000 rpm pendant 3min
- Jeter le tube collecteur
- Mettre la colonne dans le nouveau tube de 2 ml
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 1 minute
- Placer la colonne sur un tube de 1.5 ml identifié
- Ajouter 50 µl d'eau Aguettant autoclavée
- Laisser au moins 5 min à température ambiante
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 1 minute
- Jeter la colonne
- Conservation de l'ADN extrait à – 20 °C

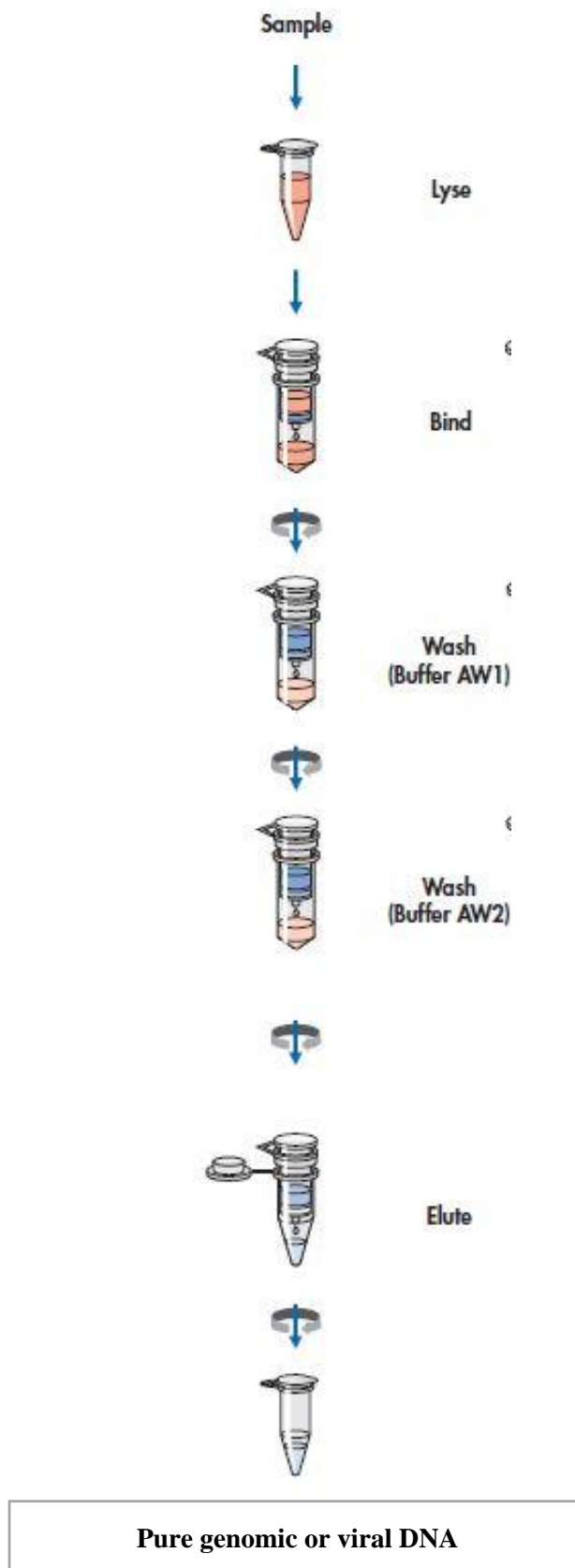


Figure 12: Protocole simplifié d'extraction d'ADN à partir des cultures (kit Qiagen ,QIAamp DNA Mini Kit).

I. 2.11. PCR classique

7 PCR différentes ont été réalisées (toutes même T_m) pour les différents clones. Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 μL contenant : voir tableau 6 :

Tableau 6: Réactifs des réactions PCR.

	1x	15
H ₂ O	17,7 μl	265,5
Tp 5x (with MgCl ₂)	5 μl	75
dNTP mix	0.5 μl	7,5
Amorce F* (40 μM)	0.25 μl	3,75
Amorce R* (40 μM)	0.25 μl	3,75
Go-Taq	0.3 μl	4,5
Echantillon ADN	1 μL	
Volume mix	24 μL	360
Volume réactionnel total	25 μl	

*Amorces : voir liste dans tableau.7 Ci-dessous

ADN : souches à tester + 1 témoin positif (PG45) + 1 témoin négatif (H₂O)

La réaction PCR s'est faite dans un thermocycleur avec

1. Une étape de dénaturation initiale à 94°C 2 minutes,
2. Puis 35 cycles :
 - Dénaturation à 95°C 30 secondes,
 - Hybridation des amorces à la température d'hybridation des amorces (T_m , voir tableau 7) pendant 30 secondes
 - Puis élongation à 72°C 30 secondes
3. Suivi d'une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.
4. Puis 12°C à l'infini

Les produits PCR ont été analysés par électrophorèse en capillaire (QIAxcel, QIAGEN) pour Vérifier la taille attendue ; Cet appareil permet de visualiser la taille des fragments amplifiés par PCR, comme sur un gel d'électrophorèse, mais sans agent intercalant (bromure d'éthidium) et en utilisant une très petite quantité de produit PCR.

Tableau 7: Caractéristiques des amorces utilisées en PCR.

Gène	Amorce F		Amorce R		Tm	Taille Amplicon pb
polC						
dnaA	dnaA-F(Rosales)	TCA-AAT-CGT-GAA-GTC-GAC-AA	dnaA-R(Rosales)	CTT-CCC-AAT-TTG-TTC-CAG-TG	56	924
gltX	gltX-3	TGG-TGA-GTA-TTC-AAT-AAG-GT	gltX-4	GTT-TTG-AGA-ATC-ATT-GCA	55	530
gpsA	gpsA-3	AAA-ATG-TGA-GGA-ATT-GAT-CA	gpsA-2	CCA-ATT-CCA-ATT-GCT-AAA-AC	55	521
gyrB	gyrB-1	AGC-TTG-CTA-ATT-GCA-CCA	gyrB-2	TAT-TTT-GAA-CAA-ATT-TTG-CAT	55	678
pta2	pta-2-1	AAT-TCG-TAA-TGG-CAA-AGA-AG	pta-2-2	CTT-AGC-TTT-TCT-TAC-ATT-TAG-GT	55	490
tdk	tdk-3	ATG-TAT-TTA-AAA-AGT-GGA-TTA-GG	tdk-4	TAT-CTC-ATA-GCT-TTT-TTA-GC	55	572
tkl	tkl-1	CCA-ACT-TAT-ATT-ATG-GTG-CA	tkl-2	CCA-CCA-TAT-AAA-TTA-ATG-CC	55	533

Séquençage des fragments PCR dans un seul sens

Les fragments ont été séquencés dans un seul sens (F ou R) en fonction des gènes cas de doute (mauvaise qualité de séquence) ou en cas de mutations, les 2 sens de séquençage ont été réalisés et la séquence corrigée et/ou confirmée.

I.2.12. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) chez *M. bovis*

La CMI d'un antibiotique vis-à-vis d'un micro-organisme est la concentration minimale de cet antibiotique bloquant complètement la croissance de celui-ci. Cette procédure décrit les différentes étapes permettant de déterminer la CMI d'une souche de mycoplasmes pour un antibiotique donné par dilution en milieu gélosé (Khalil *et al.*, 2015).

À partir de la culture mère estimée à 10^6 CFU/ml (concentration classiquement atteinte pour une culture en phase exponentielle), on réalise des dilutions en microplaque. Pour chaque échantillon, 2 dilutions sont déposées dans une autre microplaque, à raison de 100 μ l par puits.

Les cultures sont alorsensemencées sur une série de géloses ayant une concentration croissante en antibiotique par un multi inoculateur (1 µl par spot) (Hannan, 2000). Chaque point de dépôt doit compter entre 30 et 300 colonies, ce qui correspond à une densité suffisante et non excessive en colonies pour que les antibiotiques restent actifs sur la population.

Méthodes

Dénombrement de l'inoculum

Préparation des plaques de dilution

- Dans une plaque 96 puits, dispatcher 270µL de milieu de culture par puits pour réaliser la gamme de dilution. Pour une souche et une gamme allant de 10^{-1} à 10^{-5} , 5 puits d'une colonne sont remplis.
- Prélever 30 µL de la culture bactérienne initiale et les déposer dans la première cupule ; on obtient une solution à 10^{-1} . Prélever ensuite 30 µL de la solution à 10^{-1} et les déposer dans la cupule en dessous ; on obtient la solution à 10^{-2} , etc. Changer de cône entre chaque série de dilution et penser à bien homogénéiser la dilution entre chaque prélèvement.
- Répéter l'opération jusqu'à obtenir des solutions à de concentration égales à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} pour chaque souche de l'étude.

Préparation des boîtes de CMI et dilution des antibiotiques

Pour cette manipulation, on réalisera une solution mère de l'antibiotique choisi que l'on diluera pour obtenir une gamme de concentrations (Annexe 2).

La liste des antibiotiques testés et leur concentration sur les souches de *M.bovis* isolées est : oxytétracycline, tylosine, florfénicol, enrofloxacin et spectinomycine (voir Tableau.8). Ces molécules ont été évaluées sur un panel de 44 clones en utilisant la méthode de dilution en gélose comme décrit ailleurs (Jay *et al.*,2021).

Tableau 8: Tableau qui montre les antibiotiques à tester et leurs concentrations.

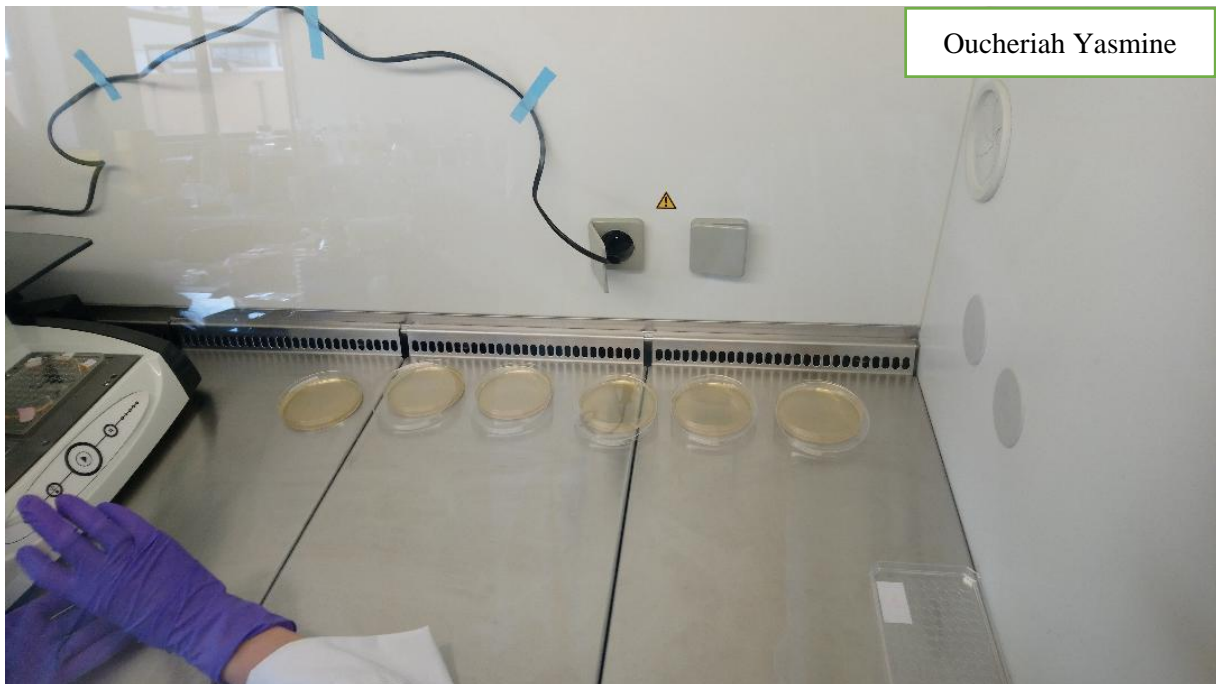
Antibiotiques :	Enrofloxacin	Tylosine	Oxytétracycline	Florfénicol	Spectinomycine
Valeur seuil :	0,5 - 2 µg/ml	16 - 64 µg/ml	2 - 8 µg/ml	2 - 8 µg/ml	64 - 128 µg/ml

Seules deux concentrations de chaque antimicrobien ont été testées, ce qui correspond aux seuils cliniques du CLSI pour les *Pasteurellaceae*, une famille connue pour coloniser la même niche corporelle chez les bovins (C L S I, 2015). Chaque estimation a été exécutée au moins deux fois et les résultats n'ont jamais été divergents.



Photos 18: L'ensemencement avec le multi-inoculateur.

- Sous PSM, laisser les spots sécher 5 à 10 min, couvercle de la boîte de gélose entrouvert, puis placer les boîtes à l'étuve, couvercle vers le bas (Photo 19).



Photos 19: séchage des boîtes sous PSM avant de les mettre dans l'étuve.

Lecture de la CMI

- Lire les boîtes sous la loupe binoculaire le 3^e jour d'ensemencement La croissance des souches est étudiée à la loupe binoculaire (Voir Photo 20) (Comptage des colonies).



Oucheria Yasmine

Photos 20: La loupe binoculaire.

- On peut aussi noter les informations relatives à la croissance et à la densité des Colonies pour chaque spot : taille et aspect des colonies . On peut spécifier :

Tableau 9: L'interprétation de la densité des Colonies pour chaque spot.

(>300 UFC)	(30<x<300)	< 30	<10
▪ dense	▪ +	▪ - (pas de croissance)	

- Dans le fichier Excel (Photo 21), compter les colonies. Il faut vérifier que chaque spot compte bien entre 30 et 300 colonies.

			5M1_c1	rep	7M3_c1	rep	8M1_c1	rep			
			10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3			
	1		0	0	0	0	0	0			
		8M1_c2	rep	8M3_c1	rep	8M4_c1	rep	27/M1_c1	rep		
		10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3		
	2		0	0	0	0	0	73	>50		
		34/M1_c1	rep	34/M2_c1	rep	35/M1_c1	35/M2_c1	37/M1_c1	37/M3_c1		
		10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3		
	3		nd	>100	>200	>200	14	>300	>300		
		38/M1_c1	rep	39/M2_c1	rep	39/M3_c1	rep	39/M3_c3	42/M2_c1		
		10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3		
	4		nd	nd	nd	9	6	nd	nd		
		44/M1_c1	44/M2_c3	44/M3_c1	46/M3_c1	49/M1_c1	50/M2_c1	50/M3_c1	57/M2_c1		
		10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3		
	5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	1		
		57/M3_c1	58/M1_c1	59/M2_c3	59/M3_c1	60/M1_c1	60/M2_c1	60/M3_c1	61/M1_c1		
		10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3		
	6		0	0	7	nd	49	nd	158	76	
		61/M2_c1	rep	62/M2_c1	62/M3_c1	63/M1_c1	64/M2_c1	70/M2_c1	71/M1_c1		
		10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3		
	7		1	0	>100	>50	0	nd	nd	nd	
			72/M1_c1	72/M3_c1	73/M1_c1	73/M2_c1	T -	T +			
			10-3	10-3	10-3	10-3	10-3	10-3			
	8		nd	nd	nd	nd	0	19	Oucheriah Yasmine		

Photos 21 : comptage des colonies.

I.2.13. Sous-typage et construction des arbres phylogénétiques

L'ADN génomique de chaque clone de *M. bovis* a été extrait de 200 µL de culture à l'aide du QIAamp® DNA Minikit (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. Les clones ont tous été sous-typés en utilisant l'analyse de séquence *polC* (Becker *et al.*, 2015).

Des clones ont ensuite été sélectionnés et analysés par MLST. Les locus *dnaA*, *gltX*, *gpsA*, *gyrB*, *pta-2*, *tdk* et *tkl* ont été amplifiés par PCR comme décrit ailleurs (Register *et al.*, 2015, Register *et al.*, 2020).

Le séquençage Sanger des produits PCR a été externalisé (Genewiz ou Genoscreen). Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide de Geneious (BioMatters). Les séquences ont été alignées avec Geneious avec la matrice CLUSTALW. Les alignements tronqués ont servi de base pour faire des arbres de type UPGMA.

Les sous-types ont été attribués à l'aide de la base de données PubMLST pour *M. bovis* (Anonyme 5). Une analyse BURST a été réalisée à l'aide de PHYLOViZ (Anonyme 6).

I. 2.14. Stock

Il s'agit de garder 2ml du bouillon de clone dans des cryotubes et cela pour bien conserver les clones à long terme. La conservation se fait à la température de -80°C.

I.3. Étude statistique et analyse des résultats

Pour un meilleur traitement analytique et descriptif des résultats enregistrés, l'étude statistique est effectuée essentiellement au moyen des logiciels **MedCalc 2021** et **Microsoft Office Excel 2010**.

L'étude analytique est réalisée par le logiciel **MedCalc 2021** (version 12.7, Copyright © 1993-2013 MedCalc software bvba), un puissant outil et intéressante application de statistique, conçue et développée pour les chercheurs en biologie et du corps médical.

Pour l'étude descriptive réalisée avec le **Microsoft Office Excel 2010**, nous avons utilisé la représentation graphique.

Pour étudier l'influence de la saison et l'âge sur la présence des anticorps anti *M. bovis* chez les animaux malades et sains et aussi sur la présence de *M. bovis* chez les animaux malades, nous avons utilisé le test T de STUDENT (Comparaison des moyennes entre différentes saisons et entre différentes tranches d'âge).

Dans le test analytique T, nous avons présenté dans chaque saison et tranche d'âge les moyennes et les écarts-types (déviations standards) permettant de calculer les intervalles de confiance.

Les seuils de significativités retenus étaient :

- **Une différence significative** : $0.05 \geq P \geq 0.01$
- **Une différence hautement significative** : $0.01 \geq P \geq 0.001$
- **Une différence très hautement significative** : $0.001 \geq P$

Les paramètres pour lesquels il y a une différence significative est observés entre les différents tests (sérologie, QPCR, Culture), ainsi que pour les facteurs saison et âge ; sont indiqués par :

- **Une étoile (*)** : il existe une différence significative.
- **Deux étoiles (**)** : il existe une différence hautement significative.
- **Trois étoiles (***)** : il existe une différence très hautement significative.
- **N. S** : Pas de différence significative ($P \geq 0.05$)

Résultats et Discussion

II. RESULTATS

Des prélèvements sanguins ont été réalisés aussi bien sur des animaux présentant des symptômes respiratoires, que sur d'autres apparemment sains (3 sujets malades et 3 sujets sains dans chaque exploitation visitée) et cela pour la recherche des anticorps anti *M. bovis*. Les 3 veaux malades ont également subi un lavage broncho alvéolaire pour un diagnostic de l'infection à *M. bovis* par la culture et la rt-PCR.

II.1. Sérologie

Le dépistage sérologique a été réalisé par la technique ELISA, une technique intéressante en routine pour évaluer le statut sanitaire des troupeaux, de par sa praticité d'utilisation et la rapidité d'obtention des résultats. Les résultats ont montré la présence d'anticorps anti-*M. bovis* dans 53 élevages sur les 70 visités avec 241 sérums positifs sur un total de 351 animaux testés correspondant à 68,66 % de prévalence.

Il serait difficile de comparer ces résultats avec des études algériennes étant donné le manque d'informations relatives à cet agent pathogène chez les veaux. A notre connaissance, quatre études uniquement ont été réalisées en Algérie et particulièrement à l'Est ; deux études chez l'espèce aviaire par Aimeur (2011) et Heleili (2011), les deux autres ont concerné l'étude des mycoplasmes chez les petits ruminants par Belaid *et al.* (1990) et par Kabouia (2005). La présente étude expose les premiers résultats concernant la prévalence des anticorps spécifiques de *M. bovis* dans les sérums de veaux de différentes localités de l'Est Algérien.

Sur le continent africain, peu d'études ont été publiées sur la séroprévalence de *M. bovis*, car la principale préoccupation pour les mycoplasmoses est *M. mycoides mycoides*, l'agent étiologique de la pleuropneumonie contagieuse bovine, une maladie à déclaration obligatoire pour l'OIE (OIE, 2021). Au Nigeria, une étude de Francis *et al.* (2015) a rapporté une séroprévalence de *M. bovis* de 19,5 % chez des bovins en élevage semi-intensif et en élevage extensif. Cette valeur étonnamment faible pouvait être selon les auteurs attribuée à un temps trop long de transport des échantillons au laboratoire ainsi qu'à une mauvaise conservation.

M. bovis est devenu un agent étiologique couramment impliqué dans les cas de pneumonie en Europe. En Italie, 76 % des bovins adultes et 100 % des veaux de boucherie présentant une pneumonie à l'abattage se sont avérés porteurs d'anticorps dirigés contre *M. bovis* (Radaelli *et al.*, 2008). De même, les élevages de veaux en France et en Belgique ont également présenté une forte proportion d'animaux testés positifs (60 et 100 %) pour les anticorps de *M. bovis* (Arcangioli *et al.*, 2008 ; Pardon *et al.*, 2011). Une étude sérologique récente réalisée en 2017 sur 86 troupeaux à travers la Hongrie a révélé que tous les troupeaux hongrois testés avaient au moins 2/10 animaux sérologiquement positifs, avec 88,38 % des troupeaux ayant

plus de 50 % d'animaux séropositifs (Fodor *et al.*, 2017). Les infections à mycoplasmes sont considérées comme endémiques en Pologne. L'examen de 3670 échantillons de sérums sanguins bovins provenant de 16 provinces par la technique d'ELISA a révélé une séroprévalence élevée de 76,1%.

Au Québec, les mycoplasmes sont le troisième agent pathogène impliqué dans les maladies respiratoires ; une étude a notamment montré que sur 95 bovins suivis dans 11 élevages, 78 cas (82,11 %) étaient positifs à *Mycoplasma spp* (Francoz *et al.*, 2015). Gasmi (2011) avance quant à lui une séroprévalence assez proche de notre résultat avec 61,19%.

En Asie et spécifiquement en Chine, la séroprévalence de *M. bovis* a été étudiée dans le sud du pays dans 6 principales régions d'élevage de vaches de la région de Gzar. Ces dernières sont les principales zones d'élevage et de production de lait dans le Gzar (Jing Hua *et al.*, 2011). 7,69 % des animaux (35/455 vaches) ont été diagnostiqués positifs à *M. bovis* par la technique ELISA.

En République de Serbie, Vidic *et al.*, (2014) ont déterminé que la séroprévalence était de 4,81% chez 3 777 veaux à l'engrais. Dans une autre étude, Vojinović *et al.*, (2017) ont donné une séroprévalence d'environ 9,92 % sur 131 échantillons provenant de vaches laitières. Ces résultats contrastent avec ceux de notre étude et pourraient éventuellement indiquer que ces animaux provenaient d'élevages ayant de meilleures pratiques de gestion et de biosécurité, ou peu d'échanges entre les élevages. Par exemple, parmi les pays d'Europe du Nord, la Finlande et la Suède sont restées indemnes de la maladie pendant longtemps, mais elles se sont révélées positives à partir de 2011 et 2012 enregistrant toutefois une prévalence très faible (SVA, 2018 ; Haapala *et al.*, 2018 respectivement).

La séroprévalence très élevée enregistrée dans la présente étude pourrait être due au fait que les bovins sont une population particulièrement sensible au développement d'infections bactériennes et virales en raison du contact quotidien étroit entre les animaux (souvent issus de fermes différentes). L'infection respiratoire à *M. bovis* se transmet principalement directement par voie aérienne : aérosols, toux des animaux infectés. Ce pathogène peut également atteindre les voies respiratoires avec des particules de poussière contaminées. Le nettoyage et la désinfection des locaux étaient fréquents (nettoyage 1 à 3 fois/jour, désinfection 2 fois par an) dans la majorité des élevages visités (81 %, n=49). 38 % des élevages ont utilisé des traitements antiparasitaires sur les animaux. Ils sont également plus sujets aux infections parasitaires. Celles-ci peuvent affecter l'apport en nutriments, entraînant des carences qui compromettent l'immunité protectrice contre *Mycoplasma spp* et d'autres agents pathogènes (Fekete et Kells, 2007). Lors de l'importation des troupeaux bovins, aucun examen de surveillance n'est entrepris aux frontières pour le contrôle des infections à mycoplasmes et ceci semble

représenter le facteur déterminant pour la contamination des troupeaux algériens et à la propagation de *M. bovis* rejoignant la théorie de Maunsell *et al.* (2011) qui avancent que l'excrétion de *M. bovis* a lieu rapidement après le contact avec des animaux infectés.

Les animaux en convalescence excrètent pendant longtemps et les porteurs chroniques sont généralement responsables de la persistance de *M. bovis* dans un troupeau. Cela peut faire en sorte que l'infection reste dormante pendant des mois, puis réapparaisse en raison du stress. (Maunsell *et al.*, 2009).

En comparant nos résultats (68,66%) aux données de la littérature disponible, on peut conclure que des résultats de séropositivité sont similaires à la plupart des autres pays, en particulier en Europe, dans des conditions d'élevage équivalentes.

II.1.1. Répartition des résultats sérologiques en fonction du type d'élevage

60 élevages ont fait l'objet de notre étude afin d'évaluer l'état sanitaires des troupeaux dans sept wilayas de l'Est Algérien. 88,34% des élevages (53/60) hébergeaient des animaux présentant des anticorps anti *M. bovis*.

En France, la prévalence sérologique de troupeau peut aller de 28 à 90% selon les cas étudiés (Le grand *et al.*, 2002) ce qui rejoint nos résultats. En Angleterre, 20 à 25% des troupeaux atteints de pneumonies contiennent des animaux présentant des anticorps contre *M. bovis* (Ayling *et al.*, 2004).

Le Tableau 10 rapporte la prédominance des séropositifs au niveau des unités d'engraissement par rapport aux troupeaux mixtes (72 % contre 46 %). La même constatation a été faite dans les troupeaux classiques par rapport aux élevages pilotes (72 % contre 41 %).

Tableau 10: Proportions d'animaux séropositifs dans chaque type d'élevage.

	Fermes classiques	Fermes pilotes	Total
Troupeau d'engraissement	76% (204/269)	44% (16/36)	72% (220/305)
Troupeau mixte	49% (18/37)	33% (3/9)	46% (21/46)
Total	72% (222/306)	41% (19/45)	69% (241/351)

Les MRB sont dues à de nombreux facteurs zootechniques constituant des facteurs de risque et pouvant influencer la contamination ou l'apparition de la maladie. Parmi ceux-ci, la gestion du logement avec l'hygiène générale et l'ambiance du bâtiment, la densité des animaux, l'âge des individus. Si l'on considère nos résultats dans les unités d'engraissement, la séroprévalence était un peu plus élevée à savoir 72 % contre 46 % pour les troupeaux mixtes. Effectivement, Callan et Garry (2002) rapportent que le regroupement des animaux d'origines

diverses est un important facteur de risque pour la présence de *M. bovis*. Même si dans les troupeaux laitiers la prévalence initiale peut être faible, le fait de mélanger des animaux provenant de très nombreux élevages différents augmente la probabilité d'avoir un animal contaminé au départ dans le lot. La taille de l'élevage, les personnes chargées de l'élevage mais aussi de l'hébergement des veaux peuvent influencer l'apparition de troubles respiratoires et cela par leurs contacts directs avec des animaux infectés qui représentent une source de contamination par leurs productions nasales : la contamination peut se faire même à partir d'animaux convalescents, en bonne santé, pendant des mois, voire pendant des années (Pfützner et Sachse, 1996). De même, les animaux très viandeux de type culard ont, de par leur masse musculaire plus développée, une résistance à l'écoulement de l'air plus élevée, d'où un travail de respiration plus intense et encore plus coûteux en énergie. Il en résulte une sensibilité particulière des bovins de race à viande par rapport aux bovins de type laitier. Pour les bovins viandeux à l'engraissement, les maladies respiratoires représentent plus des 3/4 des problèmes sanitaires (Lekeux, 1988 ; Gustin *et al.*, 1988).

Une différence a également été notée entre les troupeaux des fermes classiques et des fermes pilotes. Les fermes pilotes, qui reçoivent un soutien financier du gouvernement Algérien, sont des fermes plus modernes qui emploient du personnel formé, dont un vétérinaire permanent responsable de la gestion sanitaire du troupeau. Dans ces établissements, les propriétaires s'investissent pleinement et un intérêt particulier est porté à l'hygiène et à une alimentation maîtrisée. En effet, il faut essayer d'assurer des bonnes conditions de logement telle qu'une bonne qualité de l'air et d'ambiance pour les veaux pour prévenir l'apparition des maladies respiratoires. La température, la densité, l'alimentation sont autant d'éléments qui doivent être régulés (Aebi *et al.*, 2015). Ainsi un niveau plus élevé de compétences en gestion de la santé bovine et des conditions d'élevage ont permis une séroprévalence plus faible (41% contre 72% dans les fermes classiques).

II.1.2. Répartition des résultats sérologiques en fonction des animaux malades et sains

Les résultats du test d'ELISA illustrés dans la figure 13 rapportent la prédominance des anticorps anti-*M. bovis* (134 sérums positifs correspondant à 55,19%) chez les veaux apparemment sains par rapport aux veaux malades présentant divers symptômes respiratoires (température, toux, dyspnée et jetage) (107 sérums correspondant à 44,81%).

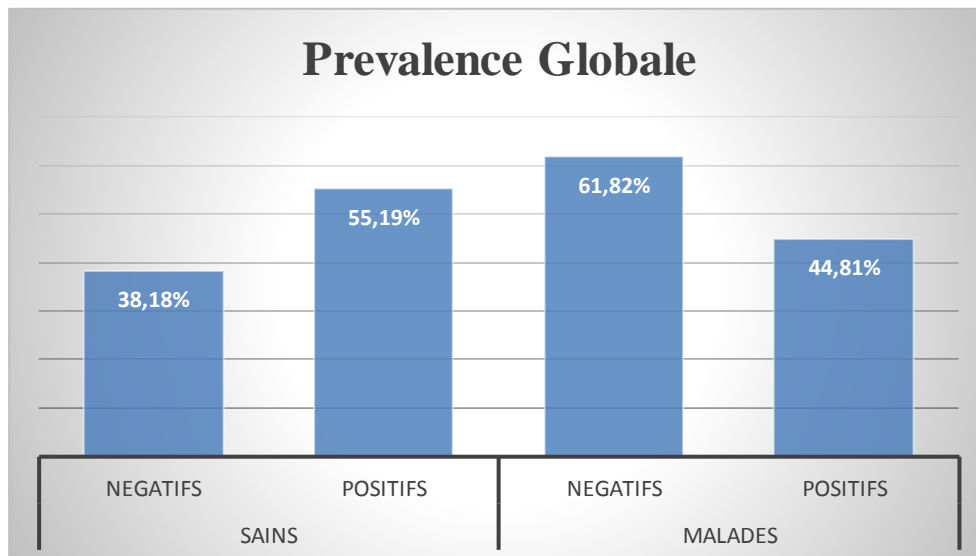


Figure 13: La prévalence Globale des animaux Malades et Sains.

Dans notre population, la proportion d'animaux séropositifs sains était légèrement supérieure à celle des veaux malades (55,19%) contrairement à l'étude de (Vojinovic *et al.*, 2014) où ils ont trouvé une très faible séroprévalence de l'ordre de 2.57% dans 5603 sérums de veaux apparemment sains. Cette étude avait été réalisé dans 3 très gros élevages, les résultats ne peuvent donc pas être tout à fait comparés entre eux.

Les résultats sérologiques de nos veaux pourraient donc ne pas corrélés avec l'état clinique des veaux pour de multiples raisons :

- Le test ELISA permet de détecter la trace de l'existence antérieure de *M. bovis* ou la circulation dans un troupeau (séroconversion après exposition), plutôt que d'indiquer une véritable infection clinique de l'animal donc *M. bovis* ne peut pas être détecté par cette technique pendant la phase d'incubation ou au début de l'infection (Arcangioli *et al.*, 2021). De plus, le temps nécessaire à l'apparition des anticorps est assez long (9 à 21 jours après l'infection), les animaux malades peuvent ne pas être tous déjà séropositifs au moment du prélèvement (Caswell et Archambault, 2007 ; Parker *et al.*, 2017).
- L'animal peut être dans une phase chronique au cours de laquelle très peu d'animaux sont séropositifs (Thomas *et al.*, 2003a).
- Le maintien d'une infection dans un troupeau ne dépend pas de l'expression clinique (Maunsell *et al.*, 2011). Certains auteurs soutiennent que les maladies surviennent lorsque des conditions spécifiques sont rencontrées. Ces animaux infectés de manière latente jouent un rôle important dans la propagation de l'agent infectieux (Pfützner *et al.*, 1996).

- Petersen *et al.* (2020) in Mc Aloon *et al.* (2021) ont discuté de la sensibilité beaucoup plus élevée du test ELISA ID-Vet par rapport aux autres kits. De plus, cette étude suggère que l'ID-Vet ELISA peut détecter les anticorps pendant plus longtemps en raison d'une sensibilité accrue, ce qui pourrait fournir des estimations d'exposition pour une période importante dans le passé. L'une des limites de cette étude est que nous n'avons pas d'information sur le nombre d'infections actives récentes.

La sérologie est donc inappropriée pour un diagnostic individuel. En revanche, c'est un excellent outil de surveillance épidémiologique, permettant d'identifier rapidement les séroconversions au sein d'un troupeau en réalisant des prélèvements sanguins répétés sur un grand nombre d'animaux (Thomas *et al.*, 2003a).

II.1.3. Répartition des résultats sérologiques en fonction des régions d'études

Les analyses de prévalence par région ont montré des résultats assez différents (Tableau 11), avec des taux de séropositivité allant de 36 à 91,67%. C'est seulement dans les régions où les prélèvements ont été les plus nombreux (Setif, Batna et Constantine) que les résultats peuvent être interprétés de manière fiable. D'une manière générale, la séroprévalence est assez haute (supérieure à 40%). Mais on constate une différence entre les régions de Sétif et Constantine où la séroprévalence est très forte (72 à 82%), alors qu'elle est plus modérée dans la région de Batna (47%).

Tableau 11: Répartition des résultats sérologiques en fonction des régions d'études.

	Négatifs	Positifs	Total Prélèvements	Prévalence par région
Setif	29	138	167	82,63
Khenchla	2	1	3	33,33
Batna	50	46	96	47,92
M'ssila	16	9	25	36
Constantine	10	26	36	72,22
Oum el Bouaghi	1	11	12	91,67
Biskra	2	10	12	83,33

Cette étude a apparemment révélé que les régions de Biskra et Oum el Bouaghi ont les séroprévalences les plus hautes avec des taux de 83,33% et 91,66% respectivement. Cela peut s'expliquer par la faible taille de l'échantillon (12 veaux dans les deux wilayas) ce qui rejoint les résultats de Vähänikkilä *et al.* (2019) et Murai *et al.* (2019). Il peut être attribué aussi selon Nicholas *et al.*, (2016) au nombre de prélèvements effectués, qui est très faible par rapport aux

autres régions telle la région de Sétif avec 167 échantillons (82,63%), Batna avec 96 échantillons (47,92%) et Constantine avec 36 prélèvements correspondant à 72 ,22% où la prévalence des séropositifs était élevée en raison de la taille des troupeaux bovins et du nombre d'échantillons dans ces régions qui est important (tableau 11).

II.1.4. Répartition des résultats sérologiques en fonction des animaux malades et sains dans les différentes régions d'études

A travers les résultats illustrés dans le tableau 12 nous constatons que la séroprévalence la plus importante (50%) fut observée chez les veaux présentant des symptômes respiratoires dans la wilaya de Biskra, suivie par Oum El Bouaghi, Sétif, Constantine avec 41,67 %, 37,72 % et 33,33% respectivement. La séroprévalence présentait des taux très bas dans les régions de Batna et M'sila (18,75 % et 16 % respectivement).

D'autre part, les veaux asymptomatiques ont eux aussi affiché une séropositivité assez importante de l'ordre de 50 % à Oum El Bouaghi, 44,91% à Sétif, 38 ,89% à Constantine, 33 ,33% à Khenchla et Biskra et enfin Batna avec 29,17%. La prévalence la plus basse a été enregistrée à M'sila avec un taux de 20 %.

Tableau 12: La prévalence des animaux malades et sains positifs et négatifs par rapport aux régions d'études.

	Sain		Malade	
	négatifs	positifs	négatifs	positifs
Setif	4,79	44,91	12,57	37,72
Khenchla	33,33	33,33	33,33	0,00
Batna	20,83	29,17	31,25	18,75
M'sila	28,00	20,00	36,00	16,00
Constantine	11,11	38,89	16,67	33,33
Oum EL Bouaghi	0,00	50,00	8,33	41,67
Biskra	16,67	33,33	0,00	50,00

II.1.5. Répartition des résultats sérologiques en fonction de la saison et de l'âge

Le tableau.13 et 14 nous montre la prévalence globale des animaux malades et sains positifs et négatifs en fonction de la saison et la tranche d'âge.

II.1.5.1. Influence de la saison sur la prévalence de *M. bovis***Tableau 13:** La prévalence des animaux malades et sains positifs et négatifs par rapport à la saison.

	Sains		Malades	
	négatifs	positifs	négatifs	positifs
Printemps	10,63	40,00	15,00	34,38
Été	9,76	39,02	21,95	29,27
Automne	50,00	0,00	33,33	16,67
Hiver	12,50	37,50	22,92	27,08

Tableau 14: l'influence de la saison et de l'âge sur la séroprévalence chez les animaux malades.

	Hiver	Printemps	Été	Automne	Différence significative
0-6 mois	3,71 ± 6,94	5,42 ± 5,62	0,71 ± 1,25	//	B*** , D**
6-12 mois	1,28 ± 2,21	1,42 ± 2,57	0,28 ± 0,75	0,14 ± 0,37	B*, C***,D**,E***
12-18 mois	0,57 ± 1,13	0,85 ± 2,26	0,57 ± 1,51	//	//
18-24 mois	//	0,14 ± 0,37	0,14 ± 0,37	//	//

A= taux de séropositifs entre hiver / printemps, **B=** taux de séropositifs entre hiver / Été, **C=** taux de séropositifs entre hiver /automne, **D=** taux de séropositifs entre printemps/ Été, **E =** taux de séropositifs entre printemps / automne, **F =** taux de séropositifs entre Été / automne

Tableau 15 : l'influence de la saison et de l'âge sur la séroprévalence des animaux sains.

	Hiver	Printemps	Été	Automne	Différence significative
0-6	5,71 ± 9,03	5,42 ± 8,44	1,14 ± 1,67	//	B***,D***
6-12	1,71 ± 3,40	1,14 ± 2,60	0,71 ± 0,95	//	B** ,D*
12-18	0,28 ± 0,48	0,71 ± 1,88	0,28 ± 0,75	//	A**,D*
18-24	//	//	//	//	//

A= taux de séropositifs entre hiver / printemps, **B=** taux de séropositifs entre hiver / Été, **C=** taux de séropositifs entre hiver /automne, **D=** taux de séropositifs entre printemps/ Été, **E =** taux de séropositifs entre printemps / automne, **F =** taux de séropositifs entre Été / automne.

Chez les sujets malades, la présence d'anticorps contre *M. bovis* semble être plus dominante durant le printemps chez toutes les tranches d'âge.

Chez les animaux malades âgés entre 0-6 mois, la séroprévalence à *M. bovis* était très significativement supérieure en hiver qu'en été avec un $p=0,001$. De même, la prévalence de ces anticorps est hautement significative en printemps qu'en été ($p=0,002$). Aucune différence significative n'a été enregistrée entre l'hiver et le printemps.

Par contre pour les animaux âgés entre 6-12 mois, on observe une séroprévalence très hautement significative en hiver et au printemps par rapport à l'automne avec un ($p<0,001$). Cependant, on remarque une différence hautement significative entre le printemps et l'été ($p=0,009$), et seulement une différence significative ($p=0,0019$) pour l'hiver et été.

Concernant les résultats obtenus dans le tableau 15 traitant l'influence de la saison et de l'âge chez les animaux sains, on considère que les sujets âgés de 0-6 mois avaient des séroprévalences plus importantes en hiver qu'en été mais également au printemps qu'en été (différence très hautement significative avec un $p=0,001$).

D'autre part, le taux est moins important pour les animaux de 6-12 mois ; on note une différence hautement significative ($p=0,007$) en hiver qu'en été alors qu'entre le printemps et l'été la différence est significative ($p=0,027$).

De plus, dans la tranche d'âge de 12 mois-18 mois on observe un taux remarquable des séropositifs en hiver par rapport au printemps avec une différence hautement significative ($p=0,004$), dans un second temps on relève une différence significative ($p=0,042$) entre printemps et été.

L'enquête sérologique entreprise dans les sept wilayas de l'Est algérien à savoir Batna, Constantine, Setif, Biskra, Oum El Bouaghi, Khanchla et M'sila démontre l'influence de la saison sur la séroprévalence.

En effet, la Mycoplasmosse sévit lourdement durant l'hiver puis son intensité décroît avec l'arrivée de l'été. Cependant, nos résultats rapportent un plus fort taux de séropositifs durant le printemps (74,38%) suivi de de l'été (68,29%), de plus près par l'hiver (64,68%) et enfin l'automne ou on a enregistré le plus bas taux avec 16,67% (tableau 13). Ce résultat semble rejoindre celui de Dudek *et al.* (2020) pour la prédominance du printemps par rapport à l'été et à l'automne. Si l'on considère que la plupart des infections ont lieu l'hiver, il paraît logique que les plus fortes séroprévalences soient observées dans les saisons suivantes (fin hiver, printemps et été).

Le logement peut aussi être un facteur influant sur la survenue de MRB. Ainsi, les veaux vivants dans des bâtiments fermés s'exposent à un plus grand risque de maladies respiratoires, résultant d'une exposition potentielle à de fortes concentrations d'infectieux, de poussières et de

gaz (comme l'ammonium) et à des contacts plus étroits avec les autres animaux. Le risque est aggravé lorsque la ventilation n'est pas adaptée (Wikse et Baker, in BRADFORD) ce qui peut expliquer le taux élevé en été (68,29%) dans nos élevages où le type de stabulation est très varié entre la stabulation libre et majoritairement pour la stabulation clôturée.

II.1.5.2. Influence de l'âge sur la prévalence de *M. bovis*

Animaux malades

Tableau 16: L'influence de l'âge sur la séroprévalence chez les animaux malades.

	0-6	6-12	12-18	18-24	Différence significative
Hiver	3,71 ± 6,94	1,28 ± 2,21	0,57 ± 1,13	//	A*,B***
Printemps	5,42 ± 5,62	1,42 ± 2,57	0,85 ± 2,26	0,14 ± 0,37	B*,C***,E***,F***
Été	0,71 ± 1,25	0,28 ± 0,75	0,57 ± 1,51	0,14 ± 0,37	C*,F*
Automne	//	//	//	//	//

A= taux de séropositifs entre 0-6mois / 6-12mois B= taux de séropositifs entre 0-6mois / 12-18mois, C= taux de séropositifs entre 0-6mois /18-24mois, D= taux de séropositifs entre 6-12mois/ 12-18mois, E = taux de séropositifs entre 6-18mois / 18-24 mois F = taux de séropositifs entre 12-18mois /18-24mois.

Les résultats exprimés dans le tableau 16 montrent qu'en hiver chez les animaux malades âgés entre 0-6 mois et 6 mois-12 mois que le taux des séropositifs est très grand avec une différence significative ($p=0,014$), de même que le taux des séropositifs est très différent (hautement significatif, $p<0,001$) entre les animaux de 0-6mois et 12 mois-18 mois.

Alors qu'au printemps entre les animaux âgés 0-6 mois / 18mois-24mois et 6mois -12 mois /18mois-24 mois et ceux de 12 mois-18mois /18mois-24mois on observe une très grande différence de séroprévalence qui très hautement significative avec un ($p<0,001$). Par contre entre ceux âgés entre 0-6mois et 12mois-18mois on remarque un taux moins élevé donc une différence significative ($p=0,044$).

Pour la saison d'été on constate aussi que la seroprevalence est un peu moins importante chez les tranches d'âge 0-6mois et 18mois-24mois avec ceux 12mois-18mois /18mois-24mois donc différence significative avec ($p=0,01$) et ($p=0,004$) respectivement.

Animaux Sains :**Tableau 17:** L'influence de la saison sur la séroprévalence chez les animaux sains.

	0-6	6-12	12-18	18-24	Différence significative
Hiver	5,71 ± 9,03	1,71 ± 3,40	0,28 ± 0,48	//	A*,B***,D***
Printemps	7,28 ± 8,73	1,14 ± 2,60	0,71 ± 1,88	//	A*,B**,
Été	1,14 ± 1,67	0,71 ± 0,95	0,28 ± 0,75	0,14 ± 0,37	C**,E*
Automne	//	//	//	//	//

A= taux de séropositifs entre 0-6mois / 6-12mois B= taux d'anticorps entre 0-6mois / 12-18mois, C= taux de séropositifs entre 0-6mois /18-24mois, D= taux de séropositifs entre 6-12mois/ 12-18mois, E = taux de séropositifs entre 6-18mois / 18-24 mois F = taux de séropositifs entre 12-18mois /18-24mois.

Concernant les résultats obtenus dans le tableau 17 on considère qu'en hiver le taux de séropositifs est important surtout chez les tranches entre (0-6mois) et (12mois -18mois) et ceux entre (6mois-12mois) et (12 mois-18mois) avec une différence très hautement significative ($p < 0,001$). D'autre part chez les animaux entre (0-6 mois) et (6mois-12mois) le taux est moins important donc on observe seulement une différence significative ($p = 0,032$).

Alors qu'au printemps il y a une différence significative ($p = 0,010$) pour la tranche de (0-6mois) et (6mois-12mois), pour les tranches d'âge (0-6mois) et (12mois-18mois) on observe un taux remarquable des séropositifs où une différence hautement significative est observée ($p = 0,002$).

De plus pour l'été le taux des séropositifs est nettement plus haut pour les animaux âgés entre (0-6mois) et (18mois-24mois) avec un $p = 0,002$ donc une différence hautement significative. De même pour la tranche entre (6mois-12mois) et (18mois-24mois) on observe seulement une différence significative ($p = 0,041$).

Tableau 18: La prévalence des animaux malades et sains positifs et négatifs par rapport à la tranche d'âge.

	négatifs		positifs		Taux Prélèvements N= 351
	Sain	malade	Sain	malade	
0- 6 mois	13,10	19,84	39,29	27,78	252
6 mois- 12 mois	10	24,29	34,29	31,43	70
12 mois-18 mois	7,7	3,85	34,62	53,85	26
18 mois- 24 mois	0	0	33,33	66,67	3

L'âge de l'animal est aussi un facteur de risque. Selon Gasmi (2011), les jeunes animaux sont plus prédisposés à l'invasion par des agents infectieux, dont *M. bovis*.

Or, nous constatons qu'une séroprévalence très élevée a été rapportée dans la tranche d'âge de 12 mois - 18 mois (88.47%) et de 18 mois - 24 mois (100%). Cela pourrait s'expliquer en partie par le fait que le nombre d'échantillonnage était très faible dans ces deux groupes d'âge avec 26 échantillons et 3 échantillons respectivement. Après une infection par *M. bovis*, les anticorps persistent aussi longtemps (plusieurs mois) chez l'animal, même si la persistance exacte n'est pas connue (Maunsell *et al.* 2009). Les animaux âgés ont donc plus de chances d'être séropositifs. Par contre, on note des taux élevés dans les 2 tranches d'âge de 0-6 mois (252 prélèvements) et de 6 mois - 12 mois (70 prélèvements) (tableau 18) démontrant une importante incidence de cette infection chez les jeunes ce qui rejoint les résultats de Maunsell *et al.* (2009) qui avancent que dans un troupeau infecté, les veaux peuvent être colonisés très tôt dans leur vie. Lekeux (1997) a également constaté que les maladies respiratoires chez les jeunes bovins sont le plus souvent liées à l'environnement et à la conduite de l'élevage qui ont un rôle important notamment par le stress qu'elles engendrent sur l'animal. Ils sont soumis à des stress à différentes étapes de leur vie : dès la naissance, puis au sevrage et pendant le transport. Ces moments cruciaux sont autant de facteurs de risque pour l'animal. Les changements d'alimentation et de l'environnement sont susceptibles également de créer un déséquilibre (Castella, 2003). Les carences en énergie, protéines, vitamines, ou minéraux essentiels peuvent induire un déficit de l'immunité chez le jeune veau qui seraient favorables à l'apparition de pathologies respiratoires. Certains paramètres liés à la naissance du veau (dystocie, lieu de naissance) sont également des facteurs de risque d'apparition de MRB (Francoz, 2006).

Maunsell *et al.* (2012) incriminent le lait maternel contaminé qui pourrait être une source d'infection suffisante pour l'établissement de la colonisation des voies supérieures. La forte prévalence dans ces 2 tranches d'âge, s'explique également par la contamination qui se produit directement *in utero*, par les sécrétions vaginales et utérines sur les muqueuses du veau (Thomas *et al.*, 2003). Elle constitue une voie de transmission des plus importantes et explique la rapidité de la contamination lors des épisodes respiratoires (Pfüzner *et al.*, 1996).

II.2. Prévalence Globale des animaux Malades en fonction de la culture et de la rt-PCR

Sur les 351 veaux prélevés pour la sérologie, nous n'avons pris en considération que les 176 animaux malades afin de rechercher la présence spécifique de *M. bovis* en ayant recours à l'isolement de cet agent pathogène par culture et à la technique de la rt-PCR. 57,95% des échantillons de LBA se sont révélés positifs par la technique de la rt-PCR et 47,73 % par la culture.

II.2.1. Détection par rt-PCR

La PCR est devenue progressivement un outil de diagnostic très sûr grâce à sa spécificité et à la rapidité de l'obtention des résultats (Thomas *et al.*, 2003 ; Hayman *et al.*, 2003).

A notre connaissance très peu d'études ont été entreprises afin d'estimer la situation sanitaire des troupeaux algériens par rapport à l'infection par *Mycoplasma spp* en Algérie. Deux études ont été menées sur les mycoplasmes aviaires (Aimeur, 2011; Heleili, 2011) et les deux autres sur l'agalactie contagieuse chez les petits ruminants (Belaid *et al.*, 1990 ; Kabouia, 2005) comme déjà précisé mais jamais sur *M. bovis*. La rt-PCR utilisée ici pour détecter *M. bovis* dans les échantillons de lavage broncho-alvéolaire, alternative intéressante dans l'identification de *M. bovis*, a montré une prévalence relativement élevée (57,95%). Ce résultat ne corrobore pas avec ceux de Akan *et al.* (2014) en Turquie avec 12,16%, de Tortorelli *et al.* (2017) au Brésil avec uniquement 5% et Fanelli *et al.* (2021) en Italie qui avancent une prévalence de 16.16%. La prévalence relativement élevée de *M. bovis* dans nos élevages semble être liée à plusieurs facteurs, entre autres :

- La mauvaise gestion des élevages par un défaut de gestion des troupeaux ; l'absence de la détection et de la séparation des porteurs sains et des excréteurs permettant de limiter les infections bovines à *M. bovis* (Thomas *et al.*, 2003).
- Le manque d'hygiène dans la quasi-totalité des élevages algériens. Ce facteur est très important pour arriver à minimiser le taux d'infection par les mycoplasmes.
- La persistance des mycoplasmes dans l'environnement des animaux (Ganter, 2019). La présence et la persistance de *M. bovis* sont directement influencées par la température et l'humidité de la litière (Justice-Allen *et al.*, 2010). La litière est une source de persistance d'infection à Mycoplasmes, il faut donc la traiter avec des désinfectants appropriés avant de s'en débarrasser pour limiter la propagation de cet agent pathogène (Marouf *et al.*, 2021).
- L'absence de vaccination contre les mycoplasmes en raison de l'hypervariabilité antigénique qui existe entre les différentes espèces (Heleili, 2010). Il n'existe pas de vaccination efficace contre ce germe. Soehlnen *et al.*, (2011) rapportent que le vaccin n'a pas réduit de façon significative le nombre total de lésions pulmonaires spécifiques à *M. bovis*. De plus, en Afrique, ces campagnes de vaccination sont difficiles à mettre en œuvre aussi bien pour des raisons économiques que sociales.

Cependant, nos résultats étaient similaires à ceux d'autres études : 51% et 60% des veaux en France souffraient de maladies respiratoires à *M. bovis* (Becker *et al.*, 2020). Dans un petit échantillon en Espagne (n = 23), le pourcentage était plus élevé (86,9 %) (García-Galán *et al.*,

2021) mais peut ne pas être représentatif de la prévalence dans ce pays.

Au début de notre étude, la détection par la PCR en temps réel de divers pathogènes a été entreprise sur 26 échantillons à l'aide d'un kit de dépistage commercial (multi pathogène) afin de s'assurer de la présence de *M. bovis* et d'autres agents pathogènes éventuels. Le kit a montré la co-détection de certains agents infectieux tels *H. somni* (n=4), *P. multocida* (n=20), *M. haemolytica* (n=7), *Bovine Coronavirus* (n=3), *RSV* (n=1), *PI3* (n=0) *BVDV* (n=1), *M.bovis* (n=10) (Tableau.19). Ces agents sont habituellement isolés lors de MRB et ont été tous co-isolés lors de diverses études antérieures (Grissett *et al.*, 2015 ; Doyle *et al.*, 2017 ; Cirone *et al.*, 2019 ; Becker *et al.*, 2020).

Tableau 19: La détection par rt-PCR de divers pathogènes autre que *M.bovis* .

Identification animal	<i>M. bovis</i>	<i>Hist. somni</i>	<i>Past mult</i>	<i>Mannh. Haem</i>	<i>Corona</i>	<i>RSV</i>	<i>Pi3</i>	<i>BVDV</i>
A/M1	+							
B/M1			+					
B/M2			+					
B/M3			+					
3/M1			+	+				
3/M2			+	+				
3/M3			+					
4/M1			+					
4/M2			+	+				
4/M3	+							
5/M1	+		+		+			
6/M1		+	+		+			
6/M2			+					
7/M1	+							
7/M2	+		+					
7/M3	+		+	+				
7/MORT								+
8/M1	+	+	+					
8/M2			+	+				
8/M3	+		+					
8/M4	+	+	+	+				
9/M1		+	+			+		
10/M1			+	+				
10/M2					+			
10/M3			+					
10/M4	+							

PI3 /Non détecté

II.2.1.1. Résultats de la rt-PCR selon les régions

Tableau 20: La prévalence de *M. bovis* chez les animaux malades détectés par rt-PCR dans les différentes régions d'étude.

rt-PCR	positifs	négatifs	Total
Setif	63(75,90%)	20 (24,10%)	83
Khenchla	1(100%)	0,00	1
Batna	15 (30,61%)	34 (69,39%)	49
M'sila	4 (30,77%)	9 (69,23%)	13
Constantine	10 (55,56%)	8 (44,44%)	18
Oum El Bouaghi	4 (66,67%)	2 (33,33%)	6
Biskra	5 (83,33%)	1 (16,67%)	6
Total	102	74	176

Les effectifs étant très faibles, les résultats de la région de Khenchla ne sont pas considérés. Il est clair que pour les régions de Sétif, Constantine, Biskra et Oum El Bouaghi, la prévalence des animaux malades montre des pourcentages élevés avec plus de la moitié, voire très élevés avec plus de 75% des animaux positifs en rt-PCR (Tableau 20). Cette valeur est beaucoup plus élevée que dans les wilayas de Batna et M'sila.

II.2.1.2. Influence de la saison sur la prévalence de la rt-PCR de *M. bovis*

Les données se rapportant à l'influence de la saison sur les résultats de la rt-PCR chez les animaux malades sont indiqués dans le tableau 21.

Nous avons collecté un plus grand nombre d'échantillons en hiver et au printemps, car davantage de veaux malades ont été signalés par les vétérinaires (voir tableau 21), ce qui est corrélé aux conditions environnementales favorisant les maladies associées à *M. bovis* et la MRB (Maunsell et Donovan, 2009 ; Pardon *et al.*, 2020).

Tableau 21 : Influence de la saison sur les résultats de la rt-PCR chez les animaux malades.

Classes d'âge	Hiver	Printemps	Été	Automne	Différence significative
0-6	4,71 ± 9,53	5,00 ± 6,37	0,57 ± 0,78	//	B***,D***
6-12	1,28 ± 2,21	2,85 ± 4,01	0,14 ± 0,37	0,14 ± 0,37	B***,C***,D***,E***
12-18	0,57 ± 1,13	0,42 ± 1,13	0,14 ± 0,37	//	B*,D*
18-24	//	//	//	//	//

A= présence de *M. bovis* entre hiver / printemps, B= présence de *M.bovis* entre hiver / Eté, C= présence de *M.bovis* entre hiver /automne , D= présence de *M.bovis* entre printemps/ Eté , E = présence de *M.bovis* entre printemps / automne , F = présence de *M.bovis* entre Eté / automne.

Les résultats relatifs au tableau 21 sur la présence de *M. bovis* chez les animaux malades appartenant à la tranche d'âge de 0-6mois démontrent que l'infection par *M. bovis* est dominante en hiver et au printemps par rapport à l'été. Cette différence est hautement significative ($p < 0,001$). En outre, pour les animaux âgés de 6mois-12mois on observe que la présence de *M. bovis* est très supérieure en hiver et au printemps, avec des différences très hautement significatives ($p < 0,001$) par rapport à l'été et à l'automne. Pour la tranche d'âge 12mois-18mois la présence de *M. bovis* est moins importante avec des différences seulement significatives entre les saisons ($p = 0,017$).

II.2.1.3. Influence de l'âge sur la prévalence de la rt-PCR de *M. bovis*

Les résultats de la rt-PCR par rapport à l'influence de l'âge chez les animaux malades sont illustrés dans le tableau 22.

Tableau 22: Influence de l'âge sur la rt-PCR chez les animaux malades.

	0-6	6-12	12-18	18-24	Différence significative
Hiver	4,71 ± 9,53	1,28 ± 2,21	0,57 ± 1,13	//	A**,B***
Printemps	5,00 ± 6,37	1,42 ± 2,57	0,42 ± 1,13	0,14 ± 0,37	A*,B***,C***,F***
Été	0,57 ± 0,78	0,14 ± 0,37	0,14 ± 0,37	//	//
Automne	//	//	//	//	//

A= la présence de *M.bovis* entre 0-6mois / 6-12mois B= la présence de *M.bovis* entre 0-6mois / 12-18mois, C= la présence de *M.bovis* entre 0-6mois /18-24mois, D= la présence de *M.bovis* entre 6-12mois/ 12-18mois, E = la présence de *M.bovis* entre 6-18mois / 18-24mois F = la présence de *M.bovis* entre 12-18mois /18-24mois.

Les résultats relatifs au tableau 22 montre une présence de *M. bovis* en hiver chez les animaux malades chez la tranche d'âge de 0-6mois et 12mois-18mois très supérieure (différence très hautement significative, $p < 0,001$). En outre pour les animaux âgés de 0- 6mois et 6mois-12mois on observe que la présence de *M. bovis* est moins forte avec une différence hautement significative ($p = 0,002$).

Pour le printemps la présence de *M. bovis* est plus importante chez les tranche d'âge 0-6mois, puis 6-12 mois et nettement inférieure chez les 12mois-18mois et 18mois-24mois (différences hautement significatives, $p < 0,001$). Par contre la différence est moins marquée entre les animaux âgés entre 0-6mois et ceux de 6mois-12mois (différence significative).

II.3. Culture

II.3.1 Détection de mycoplasmes en culture

Les résultats de culture montrent les échantillons qui ont été positifs en culture, seulement par observation d'une croissance de mycoplasmes en milieu liquide (bouillon trouble) sans identification. Mais plusieurs espèces de mycoplasmes peuvent avoir poussé dans les milieux liquides, nos résultats ne donnent pas une prévalence de *M. bovis* seul, mais de *Mycoplasma* spp. La figure 15 illustre le taux des cultures positives et qui est proche des taux de cultures négatives avec 47,73% et 42,61% respectivement, les cultures douteuses quant à elles sont de 9,66%.

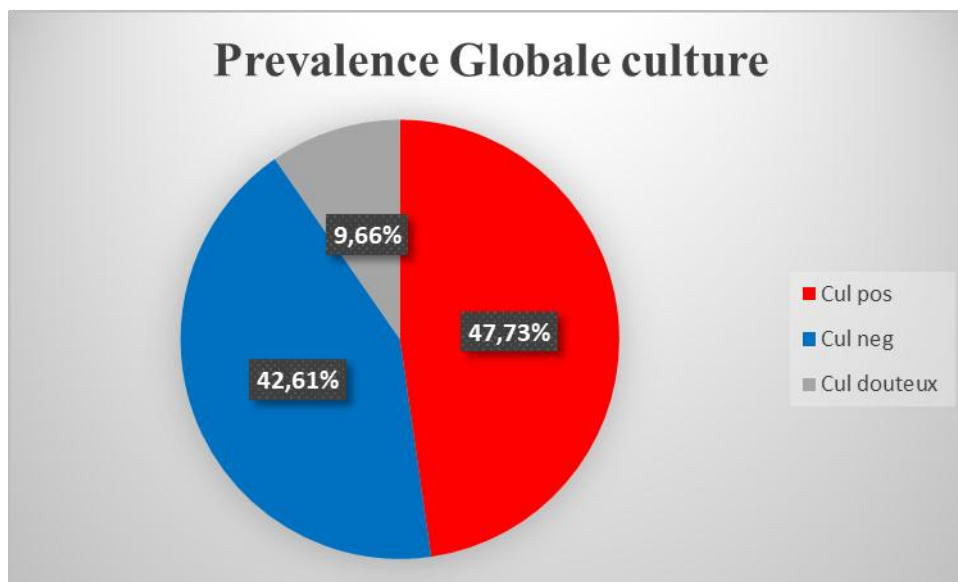
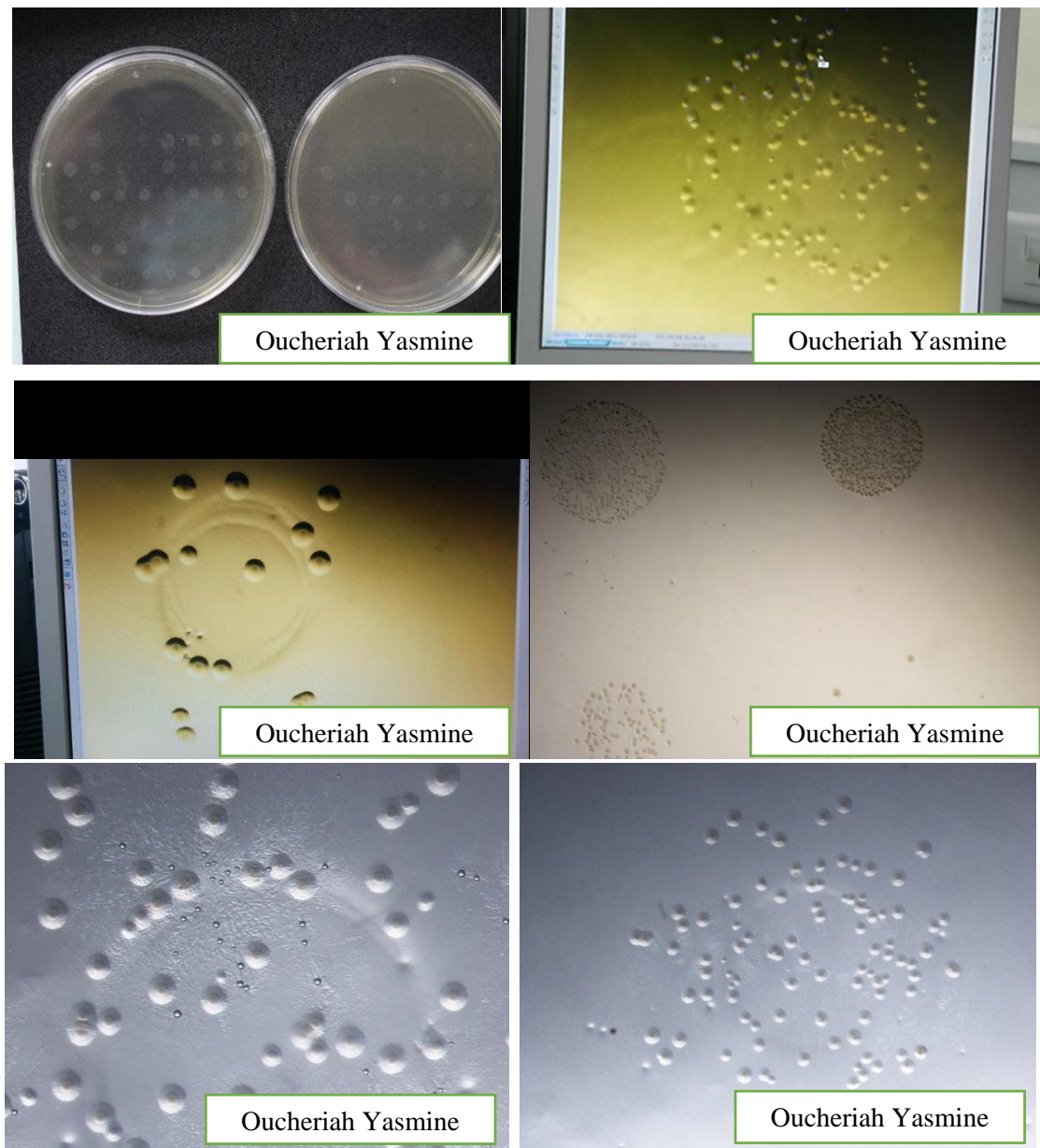


Figure 14: prévalence globale de la culture des mycoplasmes chez les animaux malades.

Lors de cette étude, tous les échantillons de LBA récoltés ont été cultivés en bouillon et sur agar et soumis également à la rt-PCR. Malgré la présence d'agents sélectifs, les risques de la croissance d'autres bactéries telle *M. bovirhinis* ne sont pas négligeables vue la richesse de ces milieux de cultures. L'utilisation du Tween 80 dans le milieu gélosé a permis de limiter la

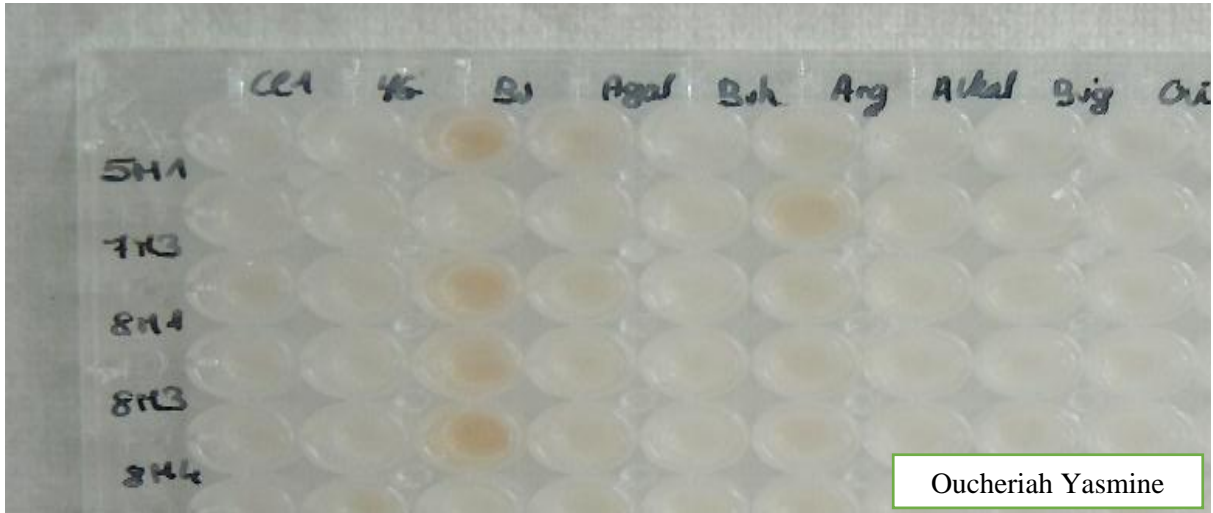
croissance de ces bactéries et de faciliter l'identification des colonies de *M. bovis* (Photo 22) par leur aspect en œufs sur le plat, (Shimizu, 1983).



Photos 22 : Taille et aspect des colonies.

Les échantillons pris en considération pour l'isolement des clones furent ceux pour lesquels le test rt-PCR fut positif. 47,73% des cultures étaient positives sur milieu gélosé tandis que 9,66% correspondaient à des cultures douteuses pouvant correspondre à la croissance de différentes souches appartenant au genre *Mycoplasma*. Ainsi, 75 bouillons pour lesquels on a observé un trouble en bouillon PPLO et présentant une rt-PCR positive ont été ensemencés sur milieu gélosé. 52 géloses (correspondant à 52 LBA de veaux différents) ont montré une

croissance :156 clones de *Mycoplasma spp* ont été isolés, soit 3 clones par veau sur chaque gélose. Les clones ont été identifiés par la technique MF-Dot (Photo 23 et 24). Lorsque l'un des 3 clones était identifié comme étant *M. bovis*, les deux autres n'ont pas été identifiés. Au total, 53 clones de *M. bovis* a été étudiés, provenant de 43 veaux différents.



Photos 21: plaque pour MF-Dot, exemple de 5 souches.

Sérums Echantillons	1: CL1 2µl	2: YG2019 D38 LP1 4µl <small>Op. mycoides</small>	3: Bovis 4µl	4: Agalactiae 4µl	5: Bovirhinis 2µl	6: Arginini 2µl	7: Alkaescens 1µl	8: Bovigenitalium 2µl	9: Ovipneumoniae 2µl
A: 5H1.c1			++	+	<i>M. bovis</i>				
B: 7H3.c1						++	<i>M. arginini</i>		
C: 8H1.c1			++	} <i>M. bovis</i>					
D: 8H3.c1			++						
E: 8H4.c1			+++						

Photos 22: Lecture de la plaque pour MF- Dot pour les 5 souches en exemple.

Le taux d'isolement des mycoplasmes réalisé est nettement inférieur à celui de Doyle *et al.* (2017) qui rapportent une prévalence de 98.9% de *Mycoplasma spp* à partir de 88 LBA prélevés sur des animaux souffrant de maladie respiratoire aiguë en Californie. Hirose *et al.* (2003) ont réussi à isoler 81 souches de mycoplasmes à partir de 293 veaux âgés de 1 à 8 mois atteints de maladies respiratoires correspondant à 27.6%. En 2022, Hashem *et al.* ont également avancé un taux d'isolement nettement plus faible (10.83%). Cet écart pourrait être expliqué par le fait que ces deux études ont procédé à un échantillonnage de l'appareil respiratoire supérieur

(écouvillonnage nasal). Il s'avère qu'il est plus propice d'isoler les mycoplasmes et essentiellement *M. bovis* à partir de LBA qu'au niveau des autres sites anatomiques dans les infections naturelles (Becker *et al.*, 2015 ; Wisselink *et al.*, 2017). Selon les mêmes auteurs, les LBA peuvent également héberger plusieurs autres mycoplasmes tel que *M. bovirhinis* connu pour sa croissance rapide pouvant conduire à des résultats faussement négatifs (Wisselink *et al.*, 2019). Et c'est pour cette raison que notre protocole a inclus une méthode permettant l'inhibition de la croissance de *M. bovirhinis* par l'ajout du tween 80 dans le milieu de culture. La forte prévalence de mycoplasmes enregistrées lors de la présente étude témoigne de la présence de facteurs de risque important dans la gestion de nos élevages. Gonzalez *et al.* (1992) et Aebi *et al.* (2015) avancent que le moyen le plus courant d'introduire *M. bovis* dans un élevage est l'achat d'un animal cliniquement sain excréant l'agent pathogène. Ainsi dans nos élevages d'engraissement, que ce soit le regroupement d'animaux venant de nombreux élevages différents ou l'importation de bovins, les risques sont importants. La production bovine en Algérie dépend fortement du commerce international, 80 à 85 % des bovins étant importés principalement de France et d'Espagne données disponibles sur (Anonyme 4 ; MADR, 2021). Cela peut expliquer la forte présence de *M. bovis* en Algérie par le commerce de bovins qui a sans doute un fort impact sur la hausse des maladies respiratoires. L'absence de contrôle des animaux introduits et des analyses non faisables en pratique au niveau des frontières visant à rechercher *M. bovis* et toutes autres espèces causant des MRB renforcent les problèmes.

II.3. 2. Identification des clones de *M. bovis*

Tableau 23: Les méthodes utilisées pour la sélection et l'isolement des clones.

	bouillon culture +		bouillon culture -		bouillon douteux culture		culture NR	Total PCR
	nombre	Clones de <i>M. bovis</i> isolés/culture gélose	Nombre	Clones isolés/culture gélose	nombre	Clones isolés/culture gélose		
rt-PCR +	65	42/65	27	0/6	8	1/8		102
rt-PCR -	19	0/15	46	0/15	8	0/4	2	73
rt-PCR NR					1			1
Total pré-culture	84		73		17		2	176

NR : Non Réalisés

Dans notre étude, on a procédé à 2 séries d'analyses, la première série (n= 26) nous a permis d'analyser de manière globale toutes les cultures en bouillon par MF-Dot. Lors des premières analyses, les cultures montraient des mélanges de *M. bovis* avec différentes espèces ;

M.bovis (n=5), *M.arginini* (n=1), *M.alkalescens* (n=3) et enfin *M.bovirinis* (n=1).

La culture en bouillon laisse pousser de nombreuses espèces différentes, et même des mélanges. Avec notre objectif d'isoler des clones de *M. bovis*, nous avons refait une manipulation d'isolement de clones à partir de ces premiers prélèvements, en bouillon ou sur gélose, où un signal positif à *M. bovis* avait été identifié par MF-Dot sur la première série. Ces nouveaux clones sur les mêmes premiers prélèvements ont alors été traités de la même manière que la 2e série de prélèvements, avec un milieu gélosé empêchant la croissance de *M.bovirinis* (Shimizu, 1983), cette espèce n'a donc jamais été isolée parmi les clones identifiés par la suite.

Dans un second temps, seuls les prélèvements positifs en rt-PCR ont été mis en culture pour isolement. Pour les échantillons présentant une PCR négative (n = 73), seule la moitié des bouillons (n = 34) ont été ensemencés pour évaluer la croissance sur milieu gélosé. Aucun bouillon n'a permis d'isoler un clone de *M. bovis*.

Sur les 43 veaux qui ont permis l'isolement de clones, 42 étaient positifs à la fois en PCR et en bouillon de culture pour *Mycoplasma spp.* (trouble visible en culture liquide), le dernier étant positif en PCR et douteux en culture. Nous avons utilisé ici une méthode adaptée pour remplir notre objectif, à savoir isoler des clones de *M. bovis*. La rt-PCR est donc bien un indicateur fort pour choisir les échantillons à privilégier pour l'isolement de *M. bovis*.

Ensuite, pour chaque culture, les clones ont été identifiés en utilisant des tests de détection par anticorps sur membrane de filtration (MF-Dot) comme décrit précédemment par Poumarat *et al.* (1991) (Photo.23). Au final, 53 clones de *M. bovis* ont été obtenus à partir de 43 veaux issus de 26 fermes réparties sur 7 wilayas de l'Est Algérien.

Tableau 24: Tableau récapitulatif des différentes espèces de mycoplasmes isolées.

Veaux	clones	MF-Dot	Veaux	clones	MF-Dot
05M1	05M1_bouillon_c1	<i>M.bovis</i>	38/M1	38/M1_c1	<i>M.bovis</i>
	05M1_bouillon_c2			38/M1_c2	
	05M1_bouillon_c3			38/M1_c3	
07M3	07M3_bouillon_c1			39/M1_c1	<i>M. arginini</i>
	07M3_bouillon_c2			39/M1_c2	
	07M3_bouillon_c3			39/M1_c3	
	07M3_gélose_c1	<i>M. arginini</i>	39/M2	39/M2_c1	<i>M.bovis</i>
	07M3_gélose_c2	<i>M. arginini</i>		39/M2_c2	
	07M3_gélose_c3	<i>M. arginini</i>		39/M2_c3	
8M1	08M1_bouillon_c1	<i>M.bovis</i>	39/M3	39/M3_c1	<i>M. bovis</i>
	08M1_bouillon_c2			39/M3_c2	
	08M1_bouillon_c3			39/M3_c3	<i>M. bovis</i>
8M3	08M3_bouillon_c1	<i>M.bovis</i>		40/M2_c1	<i>M. arginini</i>
	08M3_bouillon_c2			40/M2_c2	
	08M3_bouillon_c3			40/M2_c3	

8M4	08M4_bouillon_c1	<i>M.bovis</i>	42/M2	42/M2_c1	<i>M. bovis</i>
	08M4_bouillon_c2			42/M2_c2	
	08M4_bouillon_c3			42/M2_c3	
27/M1	27/M1_c1	<i>M. bovis</i>	44/M1	44/M1_c1	<i>M.bovis</i>
	27/M1_c2			44/M1_c2	<i>M. alkalescens</i>
	27/M1_c3			44/M1_c3	
34/M1	34/M1_c1	<i>M.bovis</i>	44/M2	44/M2_c1	<i>M. canadense</i>
	34/M1_c2			44/M2_c2	<i>M. canadense</i>
	34/M1_c3			44/M2_c3	<i>M.bovis</i>
34/M2	34/M2_c1	<i>M.bovis</i>	44/M3	44/M3_c1	<i>M.bovis</i>
	34/M2_c2			44/M3_c2	
	34/M2_c3			44/M3_c3	
35/M1	35/M1_c1	<i>M.bovis</i>	46/M3	46/M3_c1	<i>M. bovis</i>
	35/M1_c2			46/M3_c2	
	35/M1_c3			46/M3_c3	
35/M2	35/M2_c1	<i>M.bovis</i>	49/M1	49/M1_c1	<i>M. bovis</i>
	35/M2_c2			49/M1_c2	
	35/M2_c3			49/M1_c3	
37/M1	37/M1_c1	<i>M. bovis</i>	50/M2	50/M2_c1	<i>M. bovis</i>
	37/M1_c2			50/M2_c2	
	37/M1_c3			50/M2_c3	
37/M3	37/M3_c1	<i>M.bovis</i>	50/M3	50/M3_c1	<i>M. bovis</i>
	37/M3_c2			50/M3_c2	
	37/M3_c3			50/M3_c3	
	55/M2_c1	<i>M. arginini</i>	63/M1	63/M1_c1	<i>M. bovis</i>
	55/M2_c2	<i>M. arginini</i>		63/M1_c2	
	55/M2_c3	<i>M. arginini</i>		63/M1_c3	
57/M2	57/M2_c1	<i>M. bovis</i>		63/M2_c1	<i>M. bovis + M. arginini</i>
	57/M2_c2			63/M2_c2	<i>M. bovis + M. arginini</i>
	57/M2_c3			63/M2_c3	<i>M. bovis + M. arginini</i>
57/M3	57/M3_c1	<i>M. bovis</i>	64/M2	64/M2_c1	<i>M. bovis</i>
	57/M3_c2			64/M2_c2	
	57/M3_c3			64/M2_c3	
58/M1	58/M1_c1	<i>M. bovis</i>		65/M1_c1	<i>M. bovis + M. arginini</i>
	58/M1_c2			65/M1_c2	<i>M. bovis + M. arginini</i>
	58/M1_c3			65/M1_c3	<i>M. bovis + M. arginini</i>
	59/M1_c1	<i>M. alkalescens</i>		67/M1_c1	<i>M. arginini</i>
	59/M1_c2	<i>M. alkalescens</i>		67/M1_c2	<i>M. arginini</i>
	59/M1_c3	<i>M. alkalescens</i>		67/M1_c3	<i>M. arginini</i>
	59/M2_c1		70/M2	70/M2_c1	<i>M. bovis</i>
	59/M2_c2			70/M2_c2	
59/M2	59/M2_c3	<i>M. bovis</i>		70/M2_c3	
59/M3	59/M3_c1	<i>M. bovis</i>	71/M1	71/M1_c1	<i>M. bovis</i>
	59/M3_c2			71/M1_c2	
	59/M3_c3			71/M1_c3	
60/M1	60/M1_c1	<i>M. bovis</i>	72/M1	72/M1_c1	<i>M. bovis</i>
	60/M1_c2			72/M1_c2	

	60/M1_c3			72/M1_c3	
60/M2	60/M2_c1	<i>M. bovis</i>	72/M3	72/M3_c1	<i>M. bovis</i>
	60/M2_c2			72/M3_c2	
	60/M2_c3			72/M3_c3	
60/M3	60/M3_c1	<i>M. bovis</i>	73/M1	73/M1_c1	<i>M. bovis</i>
	60/M3_c2			73/M1_c2	
	60/M3_c3			73/M1_c3	
61/M1	61/M1_c1	<i>M. bovis</i>	73/M2	73/M2_c1	<i>M. bovis</i>
	61/M1_c2			73/M2_c2	
	61/M1_c3			73/M2_c3	
61/M2	61/M2_c1	<i>M. bovis</i>			
	61/M2_c2				
	61/M2_c3				
	62/M1_c1	<i>M. bovis</i>			
non exploité	62/M1_c2				
	62/M1_c3				
62/M2	62/M2_c1	<i>M. bovis</i>			
	62/M2_c2				
	62/M2_c3				
62/M3	62/M3_c1	<i>M. bovis</i>			
	62/M3_c2				
	62/M3_c3				

Le tableau 24 nous montre les résultats de l'analyse MF-Dot des clones isolés. Lorsqu'un clone par veau a été confirmé comme étant *M. bovis*, les autres clones n'ont pas été analysés davantage. Certains clones appartenaient à d'autres espèces de *Mycoplasma* (n = 17), dont *M.arginini* (11/17), *M. canadense* (2/17) et *M. alkalescens* (4/17), et 7 veaux ont présenté une infection mixte à *M. bovis*. Il s'agit du premier signalement de ces espèces en Algérie. Tous ces mycoplasmes ont été isolés dans des études précédentes lors de MRB ailleurs dans le monde (Gagea *et al.*, 2006 ; Hirose *et al.*, 2003 ; Cornelissen *et al.*, 2017; Vigimyc, 2020). Enfin, un total de 53 clones de *M. bovis* a été étudié.

II.3.3 La spécificité et la sensibilité des tests utilisés dans l'étude

La sensibilité et la spécificité de la sérologie et de la culture par rapport à la rt-PCR pour *M. bovis* ont été calculées et sont présentées dans le tableau.25

Tableau 25: Sensibilité et spécificité de sérologie et de la culture par rapport à la rt-PCR pour *M. bovis*.

	rt-PCR				Sensibilité (%)	Spécificité (%)
	Positif		Négatif			
sérologie						
Positif	80	(45%)	27	(16%)	78,43	63,01
Négatif	22	(13%)	46	(26%)		
culture						
Positif	65	(37%)	19	(11%)	69,15	70,77
Négatif	29	(17%)	46	(26%)		
Douteux	8	(5%)	9	(5%)		

Les animaux qui étaient positifs en rt-PCR et en sérologie représentaient 80 animaux tandis que les sujets positifs en rt-PCR et négatifs en sérologie étaient au nombre de 22 soit une sensibilité de 78,43% et une spécificité de 63,01% (tableau 25).

65 animaux étaient positifs en rt-PCR et en culture (37%) alors que ceux positifs en rt-PCR et négatifs en culture représentaient 29 animaux (17%). Ceci correspondait à une sensibilité de 69,15% et une spécificité de 70,77% (tableau 25).

Face à l'importance des pertes économiques engendrées par les infections mycoplasmaïque et à cause de l'importance et de la multiplicité des voies de transmission de l'agent pathogène, il est essentiel de connaître le statut mycoplasmaïque des troupeaux et celui de leurs origines. L'établissement des stratégies de contrôle des mycoplasmes est difficile sur la seule constatation des signes cliniques afin de poser un diagnostic fiable de *M. bovis*. Cependant, le diagnostic sérologique ou bactériologique constitue un moyen sûr mais discutable, pour sa mise en évidence. Le dépistage sérologique se trouve lié à des imperfections dans l'interprétation des résultats (Kempf *et al.*, 1991 ; Yamamoto, 1991). La sérologie est plutôt le reflet d'un statut de troupeau, à savoir si *M. bovis* a circulé dans l'ensemble des animaux (Arcangioli *et al.*, 2021). Des problèmes peuvent exister et résultent essentiellement de la multiplicité des sérotypes des souches isolées, de leur coexistence dans le même isolat. Concernant le diagnostic bactériologique, l'isolement sur milieu de culture suivi de l'identification permet de déceler spécifiquement l'agent pathogène en question, au moment de la maladie, ce qui concorde avec nos résultats sur la spécificité de la culture par rapport à la sérologie. Cette méthode est plus adaptée en vue de pouvoir éradiquer la bactérie. Sur le plan pratique, cette méthode idéale nécessite toutefois des délais de réponse longs, étant fastidieuse

et de ce fait onéreuse.

L'introduction de techniques basées sur la biologie moléculaire a fait progresser la recherche d'un grand pas, grâce à l'apparition de techniques d'amplification génique. La réaction d'amplification en chaîne s'est aussi avérée être une technique puissante et innovatrice pour l'identification de séquences d'acides nucléiques spécifiques de *M. bovis* (Wisselink *et al.*, 2019).

Kempf *et al.* (1993) ainsi que Clothier *et al.* (2010) rapportent que le test de PCR est plus sensible que la culture car ce dernier a la capacité de détecter les organismes morts après traitement antibiotique, ce qui concorde avec notre étude où nous avons observé également que les résultats de la rt-PCR (102/176) sont supérieurs à ceux de la culture (84/176) (tableau 23). La méthode rt-PCR est plus sensible que la culture (Callison *et al.*, 2006 ; Raviv et Kleven, 2009). En effet, si l'isolement des mycoplasmes requiert la présence de microorganismes vivants cultivables, la PCR est basée sur la détection de l'acide nucléique quel que soit son état. Elle peut donc donner des résultats positifs plus fréquemment que la culture (Kempf, 1994). Le principal inconvénient de la PCR est sa capacité à amplifier de l'ADN provenant de mycoplasmes non viables et donc à détecter positifs des animaux qui ne sont pas potentiellement contagieux alors que seuls les mycoplasmes viables sont une source potentielle d'infection (Kempf, 1998 ; Marois *et al.*, 2001).

Les animaux positifs en sérologie et négatifs en culture et rt-PCR étaient au nombre de 12. L'existence d'animaux négatifs en rt-PCR et séropositifs peut être expliquée par différentes raisons :

- Le test ELISA prend en compte les anticorps développés depuis un certain temps et non la bactérie, ce qui permet d'expliquer la possible absence de *M. bovis* au moment du prélèvement de sang. En effet, la présence d'anticorps anti mycoplasmes reste détectable pendant une longue période alors que la présence de mycoplasmes au niveau de la trachée diminue. Les chances d'obtenir un résultat positif sont plus élevées dans les 8 mois suivant une infection (Parker *et al.*, 2017). Il n'est donc guère surprenant de trouver des animaux séropositifs avec une PCR négative et une culture négative (Salich *et al.*, 1998).
- Il peut y avoir des agglutinations non spécifiques avec des souches non pathogènes de mycoplasmes (Kempf *et al.*, 1997)
- L'utilisation des antibiotiques qui sert à tuer l'agent pathogène mais qui laisse persister les anticorps anti *M. bovis* (Nicholas *et al.*, 2016).

- La PCR négative peut être liée à la présence de certains inhibiteurs, entraînant ainsi des résultats faussement négatifs (Kahyia, 2010).

Au contraire, les animaux peuvent être séronégatifs mais positifs en rt-PCR. Les anticorps anti-*M. bovis* peuvent être détectés, par méthode ELISA indirect, les anticorps dans le sérum n'apparaissent que 9 à 21 jours après l'infection (Caswell et Archambault, 2007), le passage de *M. bovis* ne peut pas être détecté par cette technique lors de la phase d'incubation ou en début d'infection. Donc les animaux malades pourraient ne pas être encore tous séropositifs au moment du prélèvement.

De même, nous avons constaté dans notre étude l'existence d'animaux positifs en rt-PCR et négatifs en culture. Cela pourrait être dû à ;

- La coexistence et la compétition avec d'autres mycoplasmes par exemple car *M. dispar*, *M. argini* et *M. bovirhinis* peuvent être présents surtout dans la première série de prélèvement ou ce dernier n'était pas inhibé (Shimizu, 1983 ; Wisselink *et al.*, 2019).
- La rt-PCR peut détecter *M. bovis* même non viable ; elle permet d'amplifier l'ADN provenant de mycoplasmes viables ou non viables alors que seuls les mycoplasmes viables sont une source potentielle d'infection : on peut détecter un mycoplasme alors qu'il n'est plus un problème pour l'élevage (Kempf *et al.*, 1993 ; Kempf, 1998).
- La culture de *M. bovis* se révèle être très difficile avec des conditions extrêmement rigoureuses (Parker *et al.*, 2017).
- La conservation des prélèvements dans de mauvaises conditions, contamination par d'autres bactéries et traitement antibiotique récent des animaux (Moalic *et al.*, 1997 in Aimeur, 2011).
- Ley *et al.* (1993) attribuent l'échec de l'isolement de mycoplasmes à leur extrême sensibilité à une diminution du pH.

En comparaison, le diagnostic des Mycoplasmoses aviaires est en général basé sur la culture et la sérologie. Mais la culture est longue et fastidieuse et l'isolement des mycoplasmes peut souffrir de la contamination des suspensions bactériennes par des microorganismes à croissance rapide. Le test sérologique le plus utilisé est l'ELISA mais ce dernier est très sensible et manque souvent de spécificité. Il constitue néanmoins un outil de screening des mycoplasmes dans les élevages en Algérie afin d'évaluer l'état sanitaires des troupeaux. Pour toutes ces raisons, l'orientation vers les méthodes moléculaires pour la détection et la caractérisation des mycoplasmes aviaires est primordiale. La PCR a l'avantage d'être rapide et précoce et peut être utilisée pour la confirmation d'un diagnostic sérologique pour le contrôle sanitaire de routine de Mycoplasmoses et en particulier *M. bovis*.

II.3.4. Isolement des clones par rapport à la saison

Tableau 26: Le nombre de clones isolés en fonction de la saison.

	Hiver	Printemps	Eté	Automne	Total
Veaux échantillonnés	72	79	22	3	176
Veaux pour lesquels au moins un clone a été isolé	10	11	2	1	24
Clones isolés	17	20	5	1	43

Les prélèvements ont été réalisés à différentes saisons (tableau 26). En été et en automne, le nombre de veaux malades puis prélevés était beaucoup plus faible, qu'en hiver et au printemps. Les clones isolés ont donc été logiquement beaucoup plus nombreux sur les veaux prélevés en hiver et au printemps.

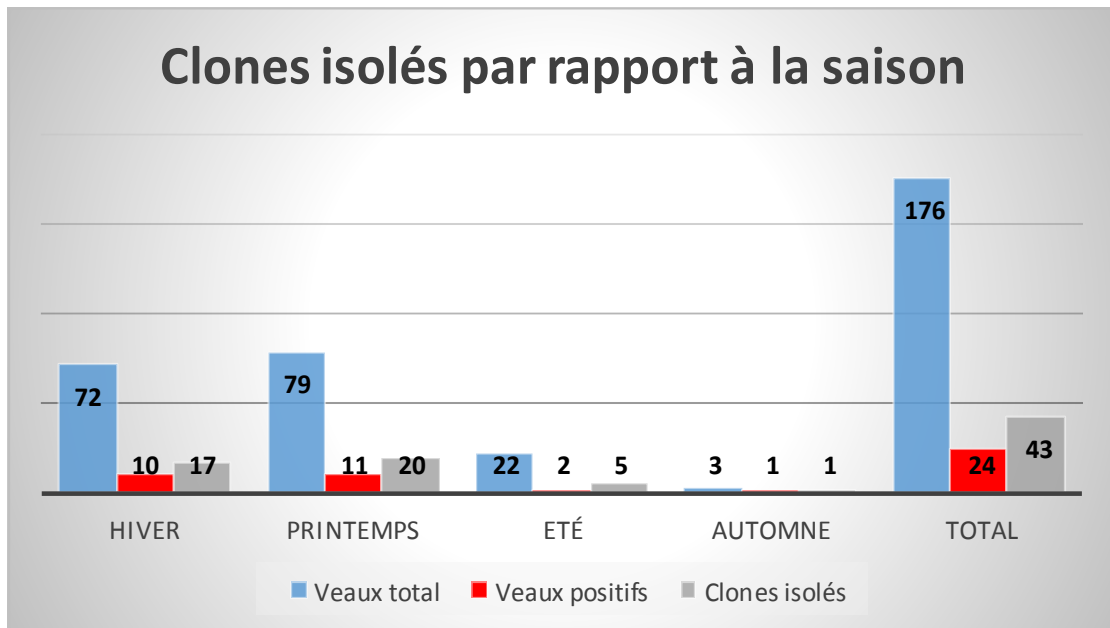


Figure 15: Le nombre des clones isolés en fonction de la saison.

II.4. Caractérisation génétique des clones algériens de *M. bovis*

II.4.1. Détermination du sous-type *polC*

La fréquence des sous-types *polC* des clones étudiés est présenté dans le tableau 27 :

Tableau 27: fréquence des sous-types *polC* des clones étudiés.

	Nombre de sous-type <i>polC</i>	%
st1	22	41,51%
st2	12	22,64%
st2 modifié	2	
st3	17	32,08%
Total	53	

53 clones ont été sous-typés en utilisant la séquence *polC* (Becker *et al.*, 2015). Leurs séquences ont été comparées avec les séquences de souches de référence françaises, correspondant à chacun des sous-types : PG45 pour le st1, 15711 pour le st2 et 15527 pour le st3. Il n'y avait pas de sous-type prédominant ; nous avons observé 42 % (n=22/53) de st1, 23 % (12/53) de st2 et 32 % (17/53) de st3. Deux clones avaient un sous-type indéterminé, différent de st2 par un seul SNP (single nucléotide polymorphism) (voir figure 17).

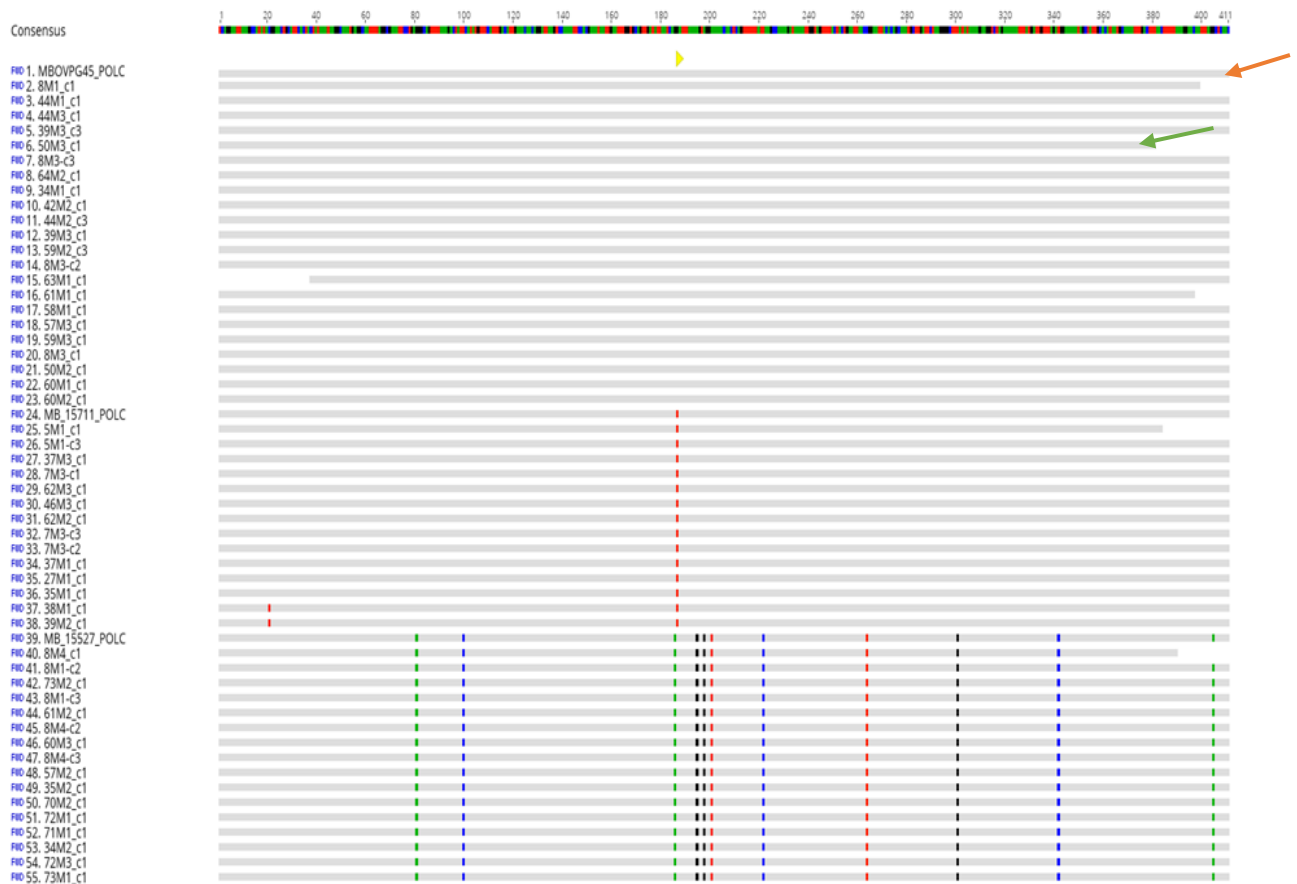


Figure 16: Alignement des séquences *polC* des clones algériens avec les souches de référence françaises (PG45, 15711 et 15527) pour la détermination des sous-types sur 411 bases.

Légende : chaque séquence est représentée par une ligne grise. Les différences entre les clones sont surlignées en couleur : T, rouge, A, vert, C, bleu et G, noir. La première ligne consensus correspond aux bases majoritaires pour la totalité des séquences selon le code couleur indiqué. Flèche orange, séquence de référence st1 PG45 ; flèche verte : séquence manquante ; flèche rouge, mutations ponctuelles pour 2 souches.

Les clones ne montrant aucune base surlignée sont de sous-type 1 comme la souche de référence (PG45, 1^e ligne sur la figure 17, flèche orange) : souches de 8M1 jusqu'à 60 M2. Celles ayant juste une base de différence au niveau du triangle jaune sont de st2, la souche de référence correspondante étant la 15711 : entre 5M1 et 35M2. Le reste des souches sont des st3 avec 16 mutations par rapport au st1 et leur souche de référence, 15527. Les 2 clones 38M1 et 39M1 sont des souches ayant une séquence très proche du sous type 2 mais ils ont une base modifiée à la position 1188 du gène *polC* de la souche de référence (flèche rouge sur la figure 17).

Pour analyser le sous-type *polC*, la taille du fragment doit être de 486 paires de base (Becker *et al.*, 2015). Mais dans notre étude, certaines portions étaient de mauvaise qualité quand on a fait le séquençage, malgré plusieurs passages. On voit en haut sur la figure 17 (flèche verte) qu'il y

a des zones en blanc car la séquence n'était pas en entier pour certaines souches et le fragment analysé était alors seulement de 411 bases (voir figure 17). Donc on a perdu une partie des séquences pour quelques souches. Malgré cela, les analyses ont été conduites car le reste des séquences s'alignaient parfaitement. Ces séquençages nous ont permis de montrer les sous types *polC* présents en Algérie, leur fréquence, et même la présence de nouvelles mutations.



Figure 17: l'arbre phylogénique des clones algériens réalisé à partir des séquences d'une portion du gène *polC*.

Légende : les 3 souches de référence françaises ayant servi pour cet arbre sont : PG45 (st1), 15711 (st2) et 15527 (st3). Arbre réalisé avec Geneious, par le modèle Tamura-Nei et la méthode de construction UPGMA. La figure 18 montre un arbre phylogénique réalisé à partir de l'alignement précédent des séquences *polC* (voir Figure 18) à l'aide du logiciel Geneious.

II.4.2 : Analyse par MLST

Un panel sélectionné de 14 clones, englobant une diversité temporelle et géographique (au moins un clone dans chaque wilaya), a ensuite été caractérisé par MLST (Register *et al.*, 2015 ; Register *et al.*, 2020).

Les PCR ont été réalisées pour chacun des 7 gènes de la MLST. Les fragments amplifiés ont été visualisés sur Qiaxcel. Par exemple, les fragments amplifiés pour le gène *pta2* sont visibles sur la Figure.19. Ici on remarque que toutes les bandes étaient à la même hauteur sauf pour le clone 34M2 (3e colonne sur la figure 19), pour laquelle le fragment était d'une taille un peu plus grande. Le séquençage des différents fragments a permis de déterminer le sous-type pour chacun des gènes pour chaque clone.

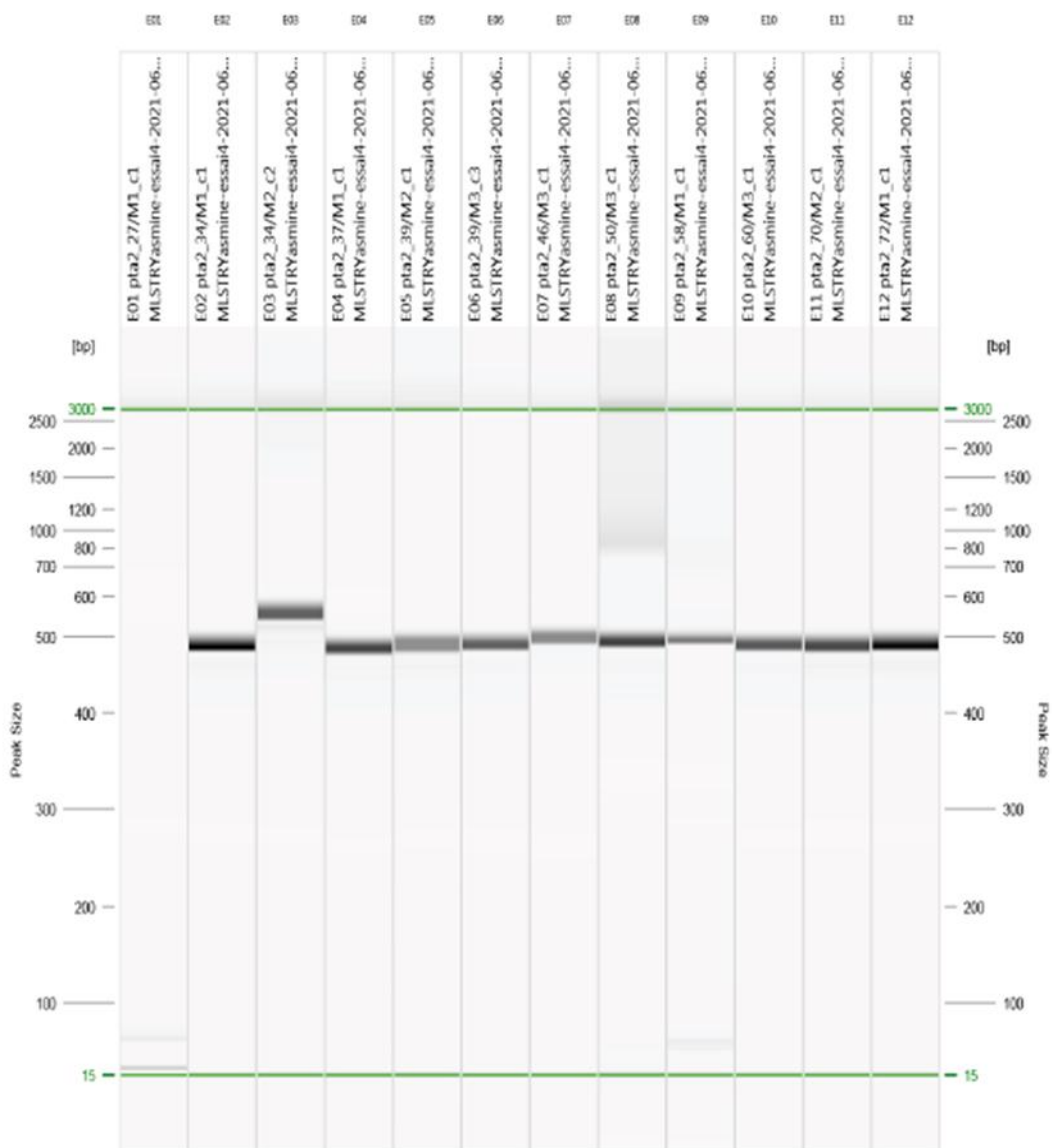


Figure 18: PCR *pta2* visualisé sur QIAxcel.

Dans la plupart des cas, les clones algériens ont montré des séquences similaires à des allèles déjà existants dans la base PubMLST. Leur sous-type a ainsi pu être déterminé.

Dans quelques cas, les séquences ont montré des différences importantes, ce qui a permis de créer de nouveaux allèles. C'est le cas pour le gène *gyrB*.

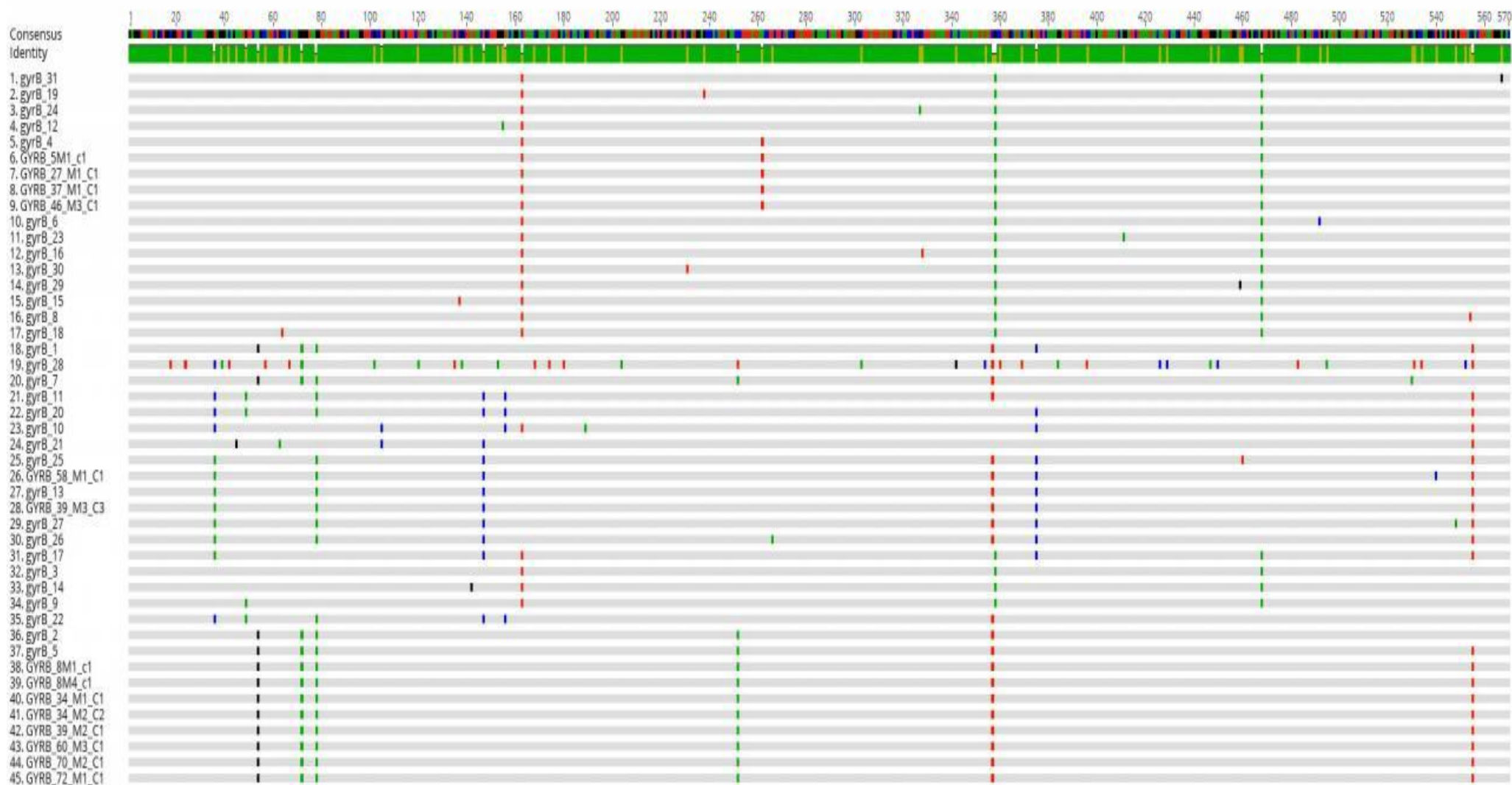


Figure 19: Alignement des séquences des 14 clones algériens et des allèles de la base PubMLST (1 à 31) pour la portion du gène *gyrB*,

Légende : chaque séquence est représentée par une ligne grise. Les différences entre les clones sont surlignées en couleur : T, rouge, A, vert, C, bleu et G, noir. La première ligne « consensus » correspond aux bases majoritaires pour la totalité des séquences selon le code couleur indiqué et la ligne verte « identity » indique le pourcentage d'identité dans l'alignement pour chacune des positions.

Cet alignement a permis ensuite de construire l'arbre phylogénétique suivant (figure 21).

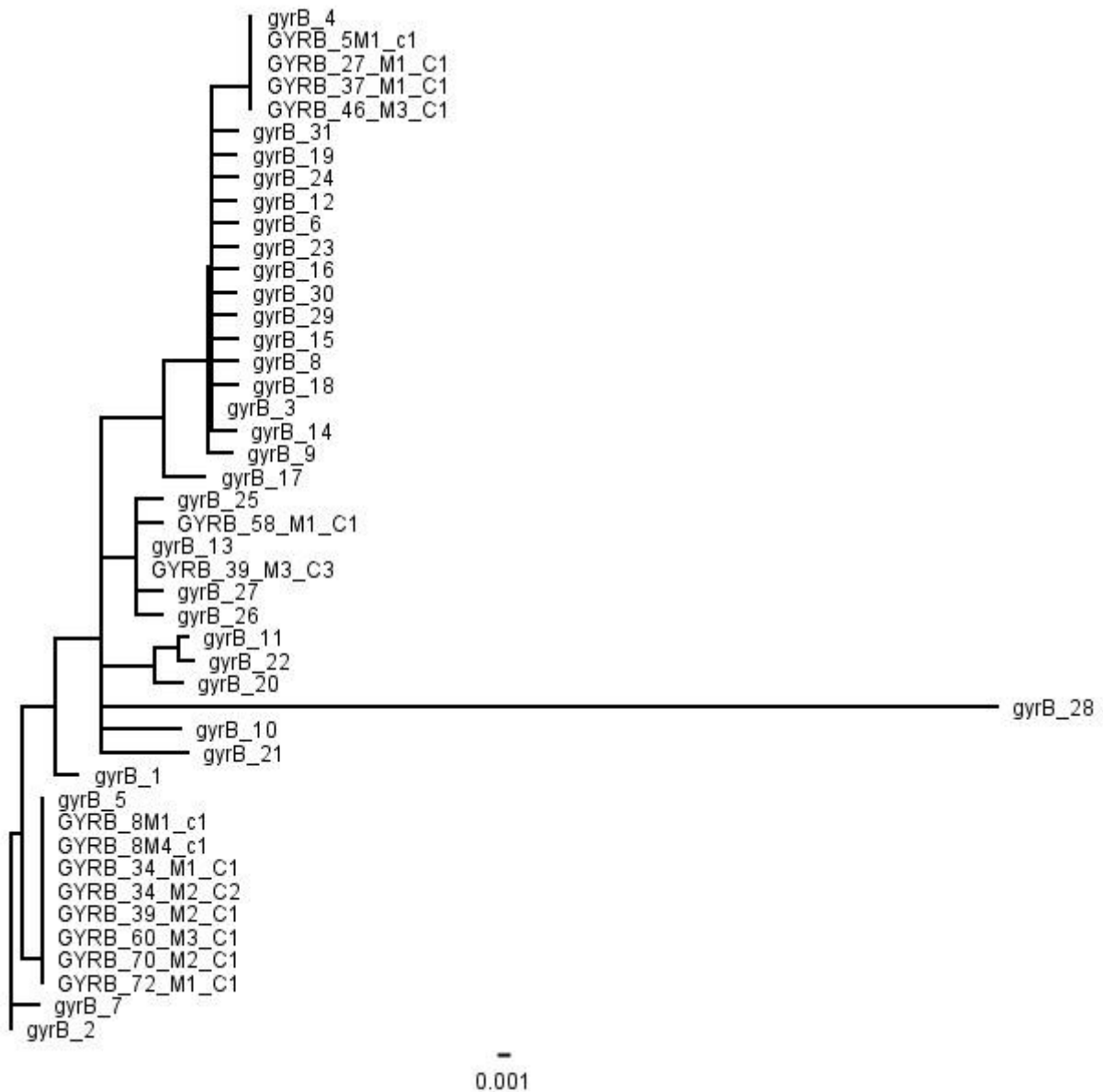


Figure 20: Arbre phylogénétique des 14 clones algériens avec les allèles de Register (de 1 à 31) pour la portion du gène *gyrB*.

Légende : arbre réalisé avec Geneious, par le modèle Tamura-Nei et la méthode de construction Neighbor Joining

On observe qu'un clone, le 58M1_C1, n'est pas identique à un sous-type existant, il est proche de l'allèle 13 par exemple.

La figure 22 nous montre l'alignement de l'allèle 13 pour une portion du gène *gyrB* avec la séquence du clone 58M1. Sur la totalité de la portion analysée, les 2 séquences sont identiques, sauf au niveau de la base 540 (C au lieu d'un T). Cette mutation correspond à la base 1872 sur la totalité du gène pour la souche de référence PG45, c'est une mutation synonyme ou pas. Cette mutation, retrouvée aussi chez le clone 50M3 a permis de créer un nouvel allèle, le 34, déposé dans la base PubMLST.

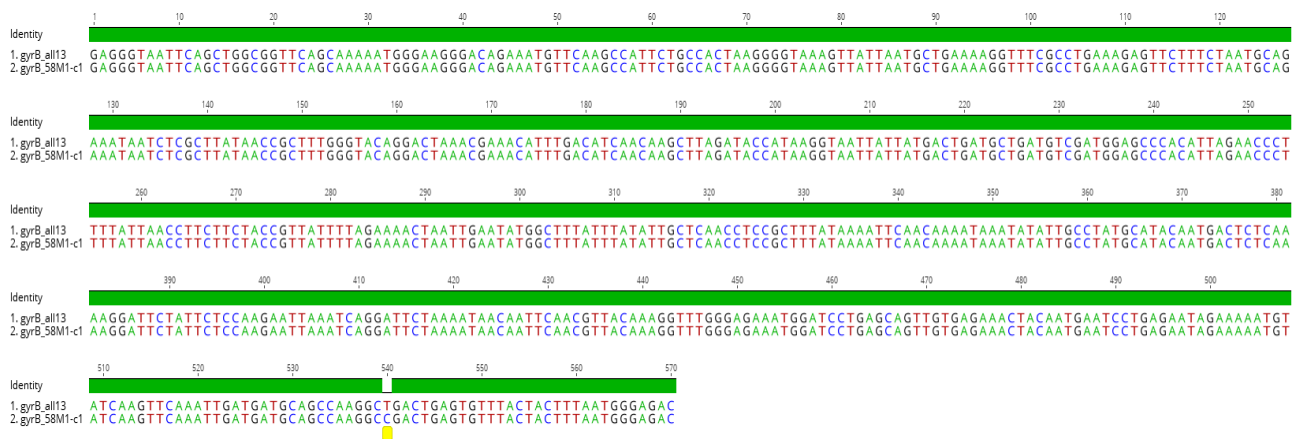


Figure 21: Alignement des séquences d'une portion du gène *gyrB* pour l'allèle 13 et le clone 58M1.

Légende : Les 2 séquences sont représentées repliées. Pour chaque séquence, les bases sont visibles : T, rouge, A, vert, C, bleu et G, noir. La ligne verte supérieure « identity » indique le pourcentage d'identité dans l'alignement pour chacune des positions. Au niveau de la position 540, un repère jaune indique la mutation.

Pour un autre gène, *pta2*, nous avons découvert un nouvel allèle pour le clone 34M2, La figure 23 montre l'alignement de la séquence du clone 34M2 avec tous les allèles *pta2* présents dans la base PubMLST

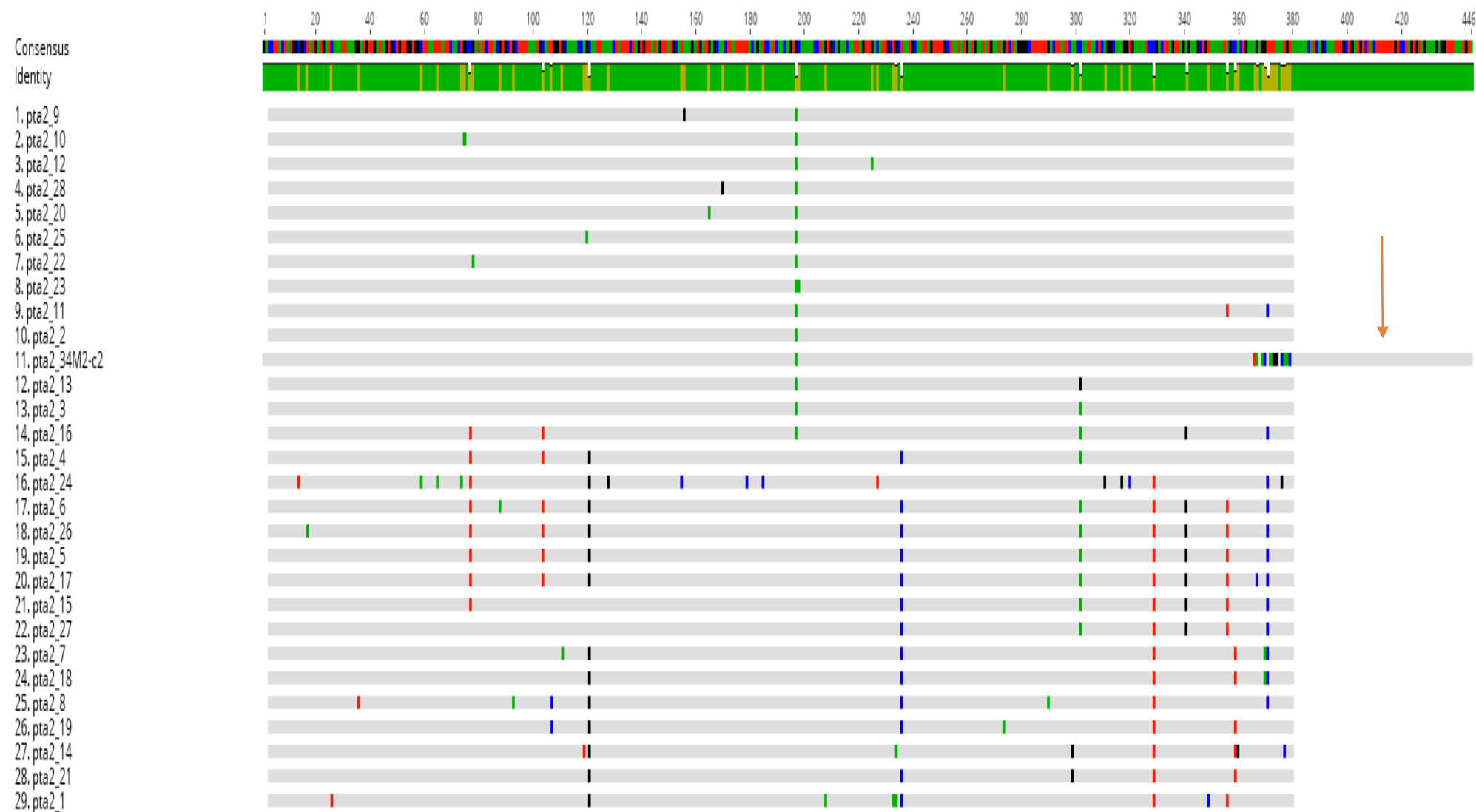


Figure 22 : L'alignement de la séquence du clone 34M2 avec tous les allèles présents dans la base PubMLST (1 à 28) pour une portion du gène *pta2*.

La flèche orange sur la figure 22 nous montre que la séquence du clone 34M2 dépasse les séquences des autres clones, la taille étant un peu plus grande (66 bases). L'insertion montrée en jaune dans la (figure 23) détermine l'augmentation de taille de l'allèle *pta2* de la souche 34M2 par rapport aux autres. Cela correspond au décalage de bande visible après la PCR (voir figure 19). Une analyse manuelle nous a permis de déterminer que la séquence du clone 34M2 était plus proche de l'allèle 2 de *pta2*. Mais il est plus grand de 66 bases : on a observé qu'il existait une insertion.

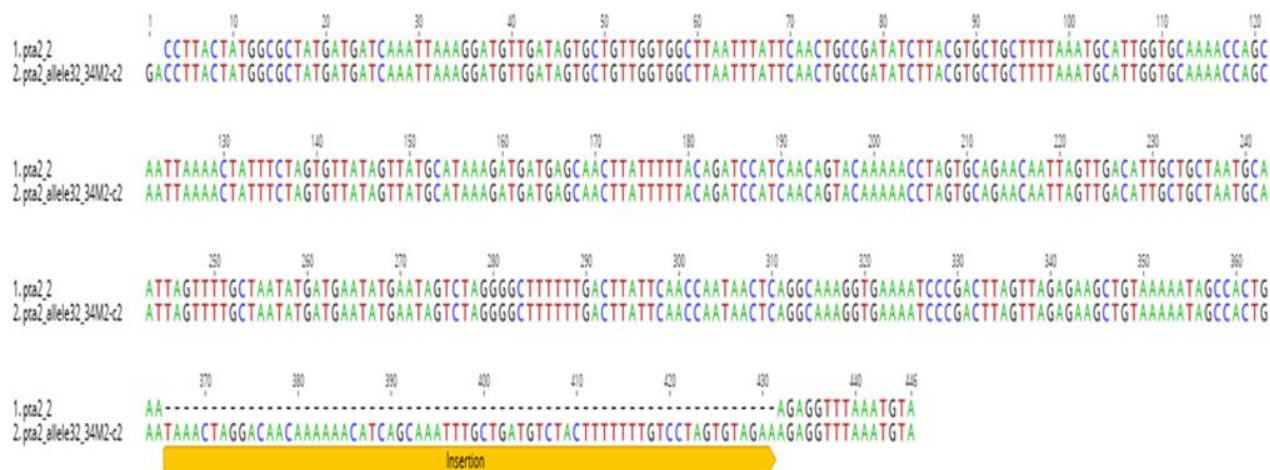


Figure 23: L'alignement des séquences de l'allèle 2 de *pta2* et de la séquence du clone 34M2.

Le Tableau de synthèse 28 montre les allèles identifiés pour chaque gène de chaque clone et les sous-types correspondants.

Tableau 28: Sous-typage MLST selon le schéma de Register pour 14 clones algériens sélectionnés dans les différentes régions de l'étude.

nom	sous-type <i>polC</i>	dnaA	gltX	gpsA	gyrB	pta2	tdk	tkt	sous-type Register
05M1_bouillon_c1	st2	1	2	1	4	5	1	3	ST8
08M1_bouillon_c1	st1	1	3	3	5	2	2	3	ST29
08M4_bouillon_c1	st3	1	3	3	5	2	2	3	ST29
27/M1_c1	st2	1	2	1	4	5	1	3	ST8
34/M1_c1	st1	1	3	3	5	2	2	3	ST29
34/M2_c2	st3	1	3	3	5	32	2	3	ST197
37/M1_c1	st2	1	2	1	4	5	1	3	ST8
39/M2_c1	st2 modifié	1	1	3	5	2	3	3	ST195
39/M3_c3	st1	1	1	3	13	2	15	1	ST4
46/M3_c1	st2	26	2	1	4	5	1	3	ST188
58/M1_c1	st1	1	1	3	34	2	3	3	ST198
60/M3_c1	st3	1	3	3	5	2	2	3	ST29
70/M2_c1	st3	1	3	3	5	2	3	3	ST196
72/M1_c1	st3	1	3	3	5	2	3	3	ST196

Neuf des 14 clones présentaient des combinaisons d'allèles correspondant à des sous-types déjà connus (ST4, 8, 29, 188), tandis que d'autres présentaient soit de nouveaux allèles (allèle 34 pour *gyrB* ou allèle 32 pour *pta2*, en jaune dans le (tableau 28) soit de nouvelles combinaisons d'allèles connus résultant en de nouveaux sous-types 195 à 198 (en orange dans le tableau 28). Les nouveaux allèles et sous-types ont été définis et déposés dans la base PubMLST (Anonyme .5) Les clones algériens, leurs profils, les nouveaux allèles et sous-types sont tous accessibles à la communauté scientifique dans cette base de données.

Ces nouvelles combinaisons d'allèles étaient assez proches de sous-types existants identifiés dans la base PubMLST par une recherche par combinaison de locus par 6 correspondances ou plus, la plupart avaient été récemment ajoutés (ST100, ST148, ST169, ST170, ST172, ST173). Les différences étaient faibles, avec soit un seul gène différent sur les 7 par rapport à un sous-type existant, voire même un seul SNP dans un gène sur tous les gènes.

Une analyse e-BURST des clones algériens et des sous-types identifiés comme étant les plus proches a été réalisée à l'aide de PHYLOViZ (Anonyme 6) (voir figure 25), en ajoutant les données disponibles sur le pays d'origine des isolats de la base. Cela permet de voir la proximité génétique des clones algériens avec ceux présents dans la base PubMLST.

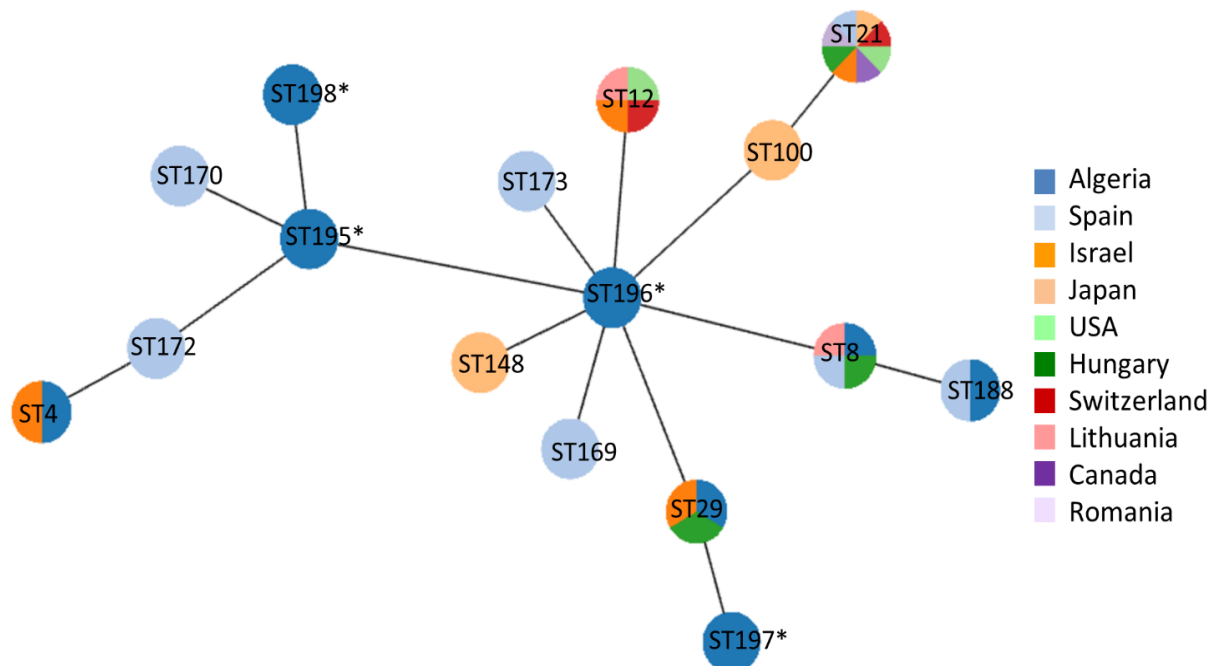


Figure 24: Analyse eBURST des profils alléliques des clones algériens (ST4 ; ST8 ; ST29 ; ST188 ; ST195-198), comparés aux sous-types les plus proches trouvés dans la base de données PubMLST.

Légende : Les numéros de sous-type extraits de la base de données PubMLST sont indiqués dans des cercles et les nouveaux sous-types signalés dans cette étude sont marqués d'un astérisque. Seuls les sous-types proches ou communs aux isolats algériens sont indiqués,

et leur pays d'origine est codé par couleur : bleu foncé, Algérie ; bleu clair, Espagne ; orange, Israël ; orange clair, Japon ; vert clair, États-Unis ; vert, Hongrie ; rouge, Suisse ; rose, Lituanie ; violet, Canada ; lilas, Roumanie.

Caractérisation génétique des clones de *M. bovis* algérien

Les clones identifiés en Algérie ont été comparés aux clones français en utilisant les sous-types *polC* (Becker *et al.*, 2015). Les trois sous-types principaux ont été détectés dans des proportions différentes. Le st1 était le sous-type le plus fréquent dans cette population algérienne, alors qu'il a été décrit comme régressant en France (Becker *et al.*, 2015). Un nouveau sous-type indéterminé avec un SNP dans la portion séquencée a été identifié. Cette première méthode de sous-typage a déjà montré que la diversité de *M. bovis* en Algérie est supérieure à celle de la France.

Le schéma MLST décrit par Register *et al.* (2015, 2020) a été utilisé pour permettre une comparaison plus discriminante et plus large à l'échelle mondiale. Sur les 14 clones, 8 sous-types différents ont été identifiés dont 4 nouveaux, ce qui prouve la grande diversité des clones circulant dans l'est algérien.

Un sous-type, le ST29, a été rencontré pour 4 clones appartenant à deux sous-types *polC* différents (st1 et st3), ce qui était possible car différents gènes de ménage étaient ciblés (voir tableau 28). La grande plasticité du génome décrite pour *M. bovis*, avec des éléments génétiques mobiles et un transfert chromosomique mycoplasmique possible, peut également avoir contribué à la diversité observée (García-Galán *et al.*, 2021). Cependant, il reste à déterminer si ces événements sont fréquemment rencontrés ou non sur le terrain.

Nous avons comparé la diversité des clones dans cette étude à la distribution de sous-types similaires dans le monde. Malheureusement, la récente modification du schéma MLST (Register *et al.*, 2015 ; Register *et al.*, 2020) a eu pour conséquence que la communauté scientifique a perdu une grande quantité de données précieuses sur les isolats de *M. bovis*. De nombreux isolats déposés dans le schéma précédent n'ont pas été analysés avec le nouveau schéma. Par ailleurs, comme la base de données contient déjà de nombreux sous-types décrits précédemment, de nouveaux isolats correspondant à ces sous-types, mais avec des origines différentes, peuvent ne pas avoir été déposés par les chercheurs, malgré l'utilisation de ce schéma MLST rapportée dans la littérature.

Nous nous sommes efforcés de compléter la base de données PubMLST, car aucune donnée n'était disponible pour l'Algérie. Nous avons défini de nouveaux allèles et de nouveaux sous-types pour les clones algériens (voir tableau 28), ce qui montre la diversité génétique dans ce pays. Mais 8 clones avaient des sous-types déjà rencontrés ailleurs, à savoir

ST8, ST29, ST4 (décrits en Israël, (Yair *et al.*, 2020) et ST188 (décrit en Espagne, base de données PubMLST). Le ST8 pourrait être considéré comme européen, car il a été décrit en Hongrie et en Lituanie (Yair *et al.*, 2020) et en Espagne (García-Galán *et al.*, 2020) et est le sous-type dominant rencontré en France (Tardy *et al.*, 2020). Dans la base de données, le ST29 ne contient que des isolats d'Israël et un de Hongrie (Yair *et al.*, 2020), alors qu'il a été largement signalé ailleurs dans le monde, dont la Chypre (Liapi *et al.*, 2021), le Danemark, la Finlande, les Pays-Bas et la Suède (Tardy *et al.*, 2020). Les autres sous-types les plus proches (S12, ST21 et ST100) ont également été trouvés dans ces pays nordiques européens (en ajoutant l'Estonie) et en France (Tardy *et al.*, 2020). La proximité des sous-types de ces clones algériens avec des sous-types distribués dans le monde entier prouve une fois de plus que le commerce des bovins doit certainement être responsable de l'épidémiologie de *M. bovis* (Yair *et al.*, 2020 ; Kinnear *et al.*, 2021). La production bovine en Algérie dépend fortement du commerce international, car les bovins sont importés principalement de France et d'Espagne (données disponibles sur (Anonyme 4 ; Simoes et Hidalgo, 2011).

La diversité génétique en Algérie est assez similaire à celle observée en Espagne, avec des sous-types communs observés entre ces deux pays (à savoir ST8 et ST188). Mais l'Algérie compte également plusieurs autres sous-types qui ont été aussi décrits ailleurs dans le monde ou ont été nouvellement observés dans cette thèse. Il n'est pas possible de déterminer maintenant l'origine de ces nouveaux sous-types. Il est possible qu'ils soient endémiques dans le pays depuis longtemps et aient évolué à partir d'autres sous-types présents, en raison de différentes pressions de sélection. Une autre hypothèse est envisageable : il peut y avoir des introductions régulières de nouveaux sous-types dans le pays, par des importations de bovins par exemple, entraînant une diversité importante des souches, comme en Israël (Yair *et al.*, 2020). On pourrait également imaginer que le st1 *polC* avait été introduit depuis la France, où il était largement présent dans le passé (Becker *et al.*, 2015), et est resté depuis et a évolué en Algérie (puisqu'il appartient désormais à trois sous-types différents de MLST, à savoir ST4, ST29 et ST198) contrairement à la France où sa présence a régressé. Une large approche de séquençage de génomes entiers et d'analyses phylogénomiques serait utile pour aider à décrypter l'évolution des isolats algériens.

II.5. Antibiorésistance des clones de *M. bovis*

Les CMI de 5 antimicrobiens ont été déterminées sur un panel de 44 souches algériennes (tableau 29) :

Tableau 29: tableau récapitulatif sur les résultats des CMI ($\mu\text{g/ml}$) des différents clones isolés.

Région	Nom de l'échantillon	sous-type <i>polC</i>	sous-type Register	Spectinomycine	Tylosine	Oxytétracycline	Enrofloxacin	Florfenicol	Traitement du veau
KHANCHELLA	05M1_bouillon_c1	st2	ST8	>128	>64	>8	0,25 < CMI \leq 2	2 < CMI \leq 8	
BATNA	07M3_bouillon_c1	st2		>128	>64	>8	0,25 < CMI \leq 2	2 < CMI \leq 8	
SETIF	08M1_bouillon_c1	st1	ST29	\leq 32	8 < CMI \leq 64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
SETIF	08M1_bouillon_c2	st3		\leq 32	8 < CMI \leq 64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
SETIF	08M3_bouillon_c1	st1		\leq 32	>64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	Marbofloxacin
SETIF	08M4_bouillon_c1	st3	ST29	nd	nd	nd	nd	nd	
M'SSILA	27/M1_c1	st2	ST8	>128	>64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	Enrofloxacin
BATNA	34/M1_c1	st1	ST29	\leq 32	8 < CMI \leq 64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
BATNA	34/M2_c1	st3	ST197	\leq 32	8 < CMI \leq 64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
BATNA	35/M1_c1	st2		>128	>64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
BATNA	35/M2_c1	st3		>128	>64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
BATNA	37/M1_c1	st2	ST8	>128	>64	>8	0,25 < CMI \leq 2	2 < CMI \leq 8	
BATNA	37/M3_c1	st2		>128	>64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
SETIF	38/M1_c1	st2 modifié		\leq 32	8 < CMI \leq 64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	Enrofloxacin
SETIF	39/M2_c1	st2 modifié	ST195	\leq 32	8 < CMI \leq 64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	Oxytetracycline
SETIF	39/M3_c1	st1		\leq 32	>64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	Enrofloxacin
SETIF	39/M3_c3	st1	ST4	\leq 32	>64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
SETIF	42/M2_c1	st1		\leq 32	8 < CMI \leq 64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
SETIF	44/M1_c1	st1		\leq 32	8 < CMI \leq 64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
SETIF	44/M2_c3	st1		\leq 32	8 < CMI \leq 64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	
SETIF	44/M3_c1	st1		\leq 32	8 < CMI \leq 64	>8	\leq 0,25	2 < CMI \leq 8	

SETIF	46/M3_c1	st2	ST188	>128	>64	>8	>2	2< CMI ≤ 8	
SETIF	49/M1_c1	st3		≤ 32	8<CMI ≤ 64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	Oxytetracycline
SETIF	50/M2_c1	st1		≤ 32	8<CMI ≤ 64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
SETIF	50/M3_c1	st1	nd	≤ 32	8<CMI ≤ 64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
SETIF	57/M2_c1	st3		≤ 32	>64	>8	>2	2< CMI ≤ 8	
SETIF	57/M3_c1	st1		≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
CONSTANTINE	58/M1_c1	st1	ST198	≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
SETIF	59/M2_c3	st1		≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
SETIF	59/M3_c1	st1		≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
SETIF	60/M1_c1	st1		≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
SETIF	60/M2_c1	st1		≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
SETIF	60/M3_c1	st3	ST29	≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
SETIF	61/M1_c1	st1		≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
SETIF	61/M2_c1	st3		≤ 32	8<CMI ≤ 64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
SETIF	62/M2_c1	st2		>128	>64	>8	>2	2< CMI ≤ 8	
SETIF	62/M3_c1	st2		>128	>64	>8	>2	2< CMI ≤ 8	
SETIF	63/M1_c1	st1		≤ 32	8<CMI ≤ 64	>8	>2	2< CMI ≤ 8	
CONSTANTINE	64/M2_c1	st1		≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
OUM EL BOUAGHI	70/M2_c1	st3	ST196	≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
BISKRA	71/M1_c1	st3		≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
BISKRA	72/M1_c1	st3	ST196	≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
BISKRA	72/M3_c1	st3		≤ 32	8<CMI ≤ 64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
CONSTANTINE	73/M1_c1	st3		≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	
CONSTANTINE	73/M2_c1	st3		≤ 32	>64	>8	≤ 0,25	2< CMI ≤ 8	

Toutes les souches étaient résistantes à l'oxytétracycline avec une CMI supérieure à 8 µg/ml. Pour le florfénicol, toutes les souches algériennes avaient une valeur de CMI comprise entre 2 et 8 µg/ml, c'est-à-dire intermédiaires ou faiblement résistantes. Les résultats pour ces deux familles d'antimicrobiens sont comparables aux souches françaises durant cette période (Jaÿ *et al.*, 2021). Les résultats pour la spectinomycine, la tylosine et l'enrofloxacin sont présentés à la figure 26. La majorité des souches (34/44) étaient sensibles à la spectinomycine alors qu'elles étaient principalement intermédiaires ou résistantes à la tylosine. La majorité des souches étaient sensibles à l'enrofloxacin (36/44) mais (5/44) des souches étaient résistantes.

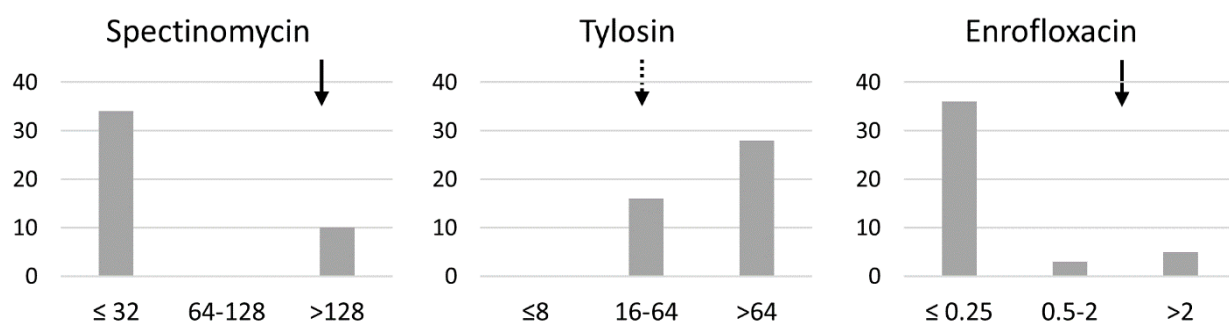


Figure 25: Distribution des profils MIC (µg/ml) de la spectinomycine, de la tylosine et de l'enrofloxacin pour 44 clones de *M. bovis*.

Légende : Une flèche indique la CMI 90 : spectinomycine CMI90 > 64, CMI90 pour la tilmicosine a été utilisée pour la tylosine : CMI90 > 128, enrofloxacin CMI90 = 0,5

Evaluation CMI des clones de *M. bovis* en Algérie

Un autre objectif de cette étude était d'évaluer le niveau de résistance aux antibiotiques des clones isolés en Algérie, en lien avec l'utilisation des antibiotiques dans les élevages. Quarante-quatre clones de *M. bovis* ont été testés contre 5 antimicrobiens correspondant aux molécules les plus fréquemment utilisées pour traiter les maladies respiratoires en Algérie. Tous les clones étaient résistants à l'oxytétracycline, comme décrit partout ailleurs dans la littérature (Lysnyansky et Ayling, 2016 ; Klein *et al.*, 2017 ; Klein *et al.*, 2019). Comparés aux niveaux de résistance des souches européennes (Bokma *et al.*, 2020 ; Jaÿ *et al.*, 2021), les clones algériens ont montré des résultats similaires pour la spectinomycine et le florfénicol.

Il est important de noter que les clones appartenant au ST8 ont montré des niveaux de résistance similaires aux souches isolées de France (résistants à toutes les molécules sauf enrofloxacin), d'où le ST8 aurait pu être importé. Une proportion plus élevée de clones résistants aux fluoroquinolones a été identifiée ici. Cette proportion n'est pas aussi élevée qu'en Espagne, où il n'y a pas de restriction d'usage pour cette famille (García-Galán *et al.*,

2020), mais plus élevé qu'en France (Jaÿ *et al.*, 2021). Sur les 5 clones testés comme résistants à l'enrofloxacin, le seul qui avait été sous-typé appartenait au ST188, un sous-type rencontré auparavant uniquement en Espagne PubMLST (Anonyme 5)

Ce pays montre beaucoup de résistance aux fluoroquinolones (García-Galán *et al.*, 2020) et pourrait être à l'origine d'introduction de souches résistantes en Algérie par le biais du commerce de bovins.

Quelques veaux chez lesquels des clones ont été isolés (n = 6) avaient été traités avec des antibiotiques avant les prélèvements (tableau 29). Nous n'avons pas pu trouver de lien entre les traitements reçus par les veaux et le niveau de résistance aux antibiotiques chez les clones isolés, comme ce qui a été décrit auparavant (Becker *et al.*, 2020). En France les souches circulantes étant déjà largement résistantes, les traitements n'ont pas d'impact sur l'apparition de nouvelles résistances. Les seules molécules qui pourraient encore sélectionner des résistances sont les fluoroquinolones, mais leur usage étant restreint réglementairement, cela n'est pas observé sur le terrain. Comme cette étude est la première concernant l'antibiorésistance de *M. bovis* en Algérie, il n'est pas possible de tirer les mêmes conclusions par l'observation de quelques clones seulement. Le seul impact de l'utilisation des antibiotiques mesurable ici aurait été d'empêcher l'isolement de *M. bovis* chez quelques veaux malades. Sur les 25 veaux traités, 19 ont été testés PCR positifs dont 8 n'ayant montré aucune croissance en culture (moyenne Ct=33, [26-36]). Dans ces cas, la bactérie était probablement présente (PCR positive), mais avec une perte de viabilité due aux traitements antibiotiques.

Les clones trouvés ici se sont avérés résistants à au moins une molécule (oxytétracycline) mais pouvaient également être résistants à diverses combinaisons d'une, deux ou trois molécules supplémentaires (spectinomycine, tylosine et/ou enrofloxacin) (voir tableau 29). Cette diversité phénotypique contraste avec la situation en France (Bouchardon *et al.*, 2014 ; Becker *et al.*, 2015). Au même titre que la diversité génétique observée plus tôt, la grande diversité des niveaux de résistance observée peut nous faire penser qu'une importation régulière de souches de *M. bovis* via le commerce de bovins pourrait être responsable de la diversité observée à tous les niveaux en Algérie.

Il est toujours tentant de faire le lien entre la diversité des sous-types moléculaires et les profils de résistance, mais il n'existe toujours pas de méthode de typage capable de différencier les phénotypes de *M. bovis* (Kinnear *et al.*, 2021). Nous avons ici confirmé qu'il existe un lien non réciproque entre les sous-types et les profils de sensibilité : tous les clones multirésistants (CMI augmentée à l'enrofloxacin et résistants aux 4 autres molécules) appartenaient au st2 (sous-typage *polC*) (comme la majorité des souches circulant en France) ou aux ST8 et ST188 (sous-typage MLST), mais tous les clones st2 algériens n'étaient pas multirésistants. Il n'y a

pas de lien direct entre sous-type et résistance pour les souches en Algérie, contrairement à ce qui a été observé en France (Khalil *et al.*, 2016).

Conclusion et recommandations

Conclusion et recommandations

Cette étude a démontré pour la première fois que *M. bovis* est fortement présent dans les cas de maladie respiratoire bovine dans l'est de l'Algérie. Cette première étude de *M. bovis* a permis de confirmer sa présence dans les élevages bovins de l'est d'Algérie, et d'identifier les facteurs de risque qui lui sont associés (changement climatique, âge, stress, déficit alimentaire...). De plus, la détection sérologique a bien permis de tracer la circulation de ce germe. Mais le recours au dépistage par technique ELISA qui nous montre que la circulation globale de *M. bovis* doit se faire en complément d'autres méthodes de diagnostic au niveau individuel telles que la culture et la rt-PCR.

Les résultats sur des fermes pilotes en Algérie semblent suggérer que l'amélioration des compétences en gestion de la santé bovine est une voie essentielle pour limiter l'impact économique des maladies respiratoires. La prévention d'une infection au sein d'un troupeau est compliquée et doit reposer sur des pratiques de management qui concernent l'ensemble des classes d'âge et les différentes catégories d'animaux. D'autre part, elle doit se baser sur des outils de dépistage et de diagnostic. Cependant, la fiabilité de ces outils n'est pas maximale en raison de divers facteurs propres à eux (niveaux de sensibilité et spécificité des tests) et extérieurs (qualité de prélèvements et conservation) qui peuvent interférer avec leurs efficacités. L'interprétation des résultats est donc délicate et difficile dans certaines situations et demande une démarche raisonnée, qui n'est pas toujours facile et économiquement réalisable en élevage.

L'identification des facteurs de risque associés à l'infection par *M. bovis* est un maillon indispensable pour établir des programmes de prévention et de contrôle des maladies respiratoires chez les bovins. Une solution serait de développer un vaccin mais son développement est difficile et a déjà été source de nombreux échecs et demande de mieux connaître *M. bovis*.

Les clones de *M. bovis* étudiés, isolés de différents élevages et wilayas, présentaient des profils de sous-types et des niveaux d'antibiorésistance variés. Le schéma MLST utilisé ici s'est avéré un outil pratique et puissant pour étudier l'épidémiologie de cette bactérie et ses liens avec le commerce mondial du bétail. Nous espérons que cette étude incitera davantage les scientifiques à compléter la base de données afin que la communauté puisse avoir une meilleure vision de *M. bovis* dans le monde. Après cette première approche, l'épidémiologie de *M. bovis* en Algérie pourrait effectivement bénéficier d'études plus approfondies pour retracer l'histoire phylogénique de *M. bovis* dans le pays.

Toutefois, pour mieux explorer le rôle de *M.bovis* dans la maladie respiratoire bovine en Algérie, des études plus détaillées doivent être menées sur cette bactérie. Il est même recommandé de mener des études sur d'autres germes causant ces maladies respiratoires en association avec *M.bovis* ou seuls.

Annexes

Annexe 1

Fiche descriptive élevage (une fiche remplis par élevage)

Nom, adresse :

Prévention : vaccins éventuels mis en place, antiparasitaires :

Statut sanitaire de l'élevage : tuberculose / brucellose :

Gestion de bâtiment :

- Fréquence du nettoyage :
- Désinfection :
- Vide sanitaire :

Fiche descriptive des cas, à remplir à chaque fois que les prélèvements sont faits

Date de prélèvement :

Taille du lot ou il y avait des malades :

Proportion de malades (en%) :

Descriptions des signes cliniques

-Temperature :

Toux :

Jetage :

Dyspnée :

Identification des animaux :

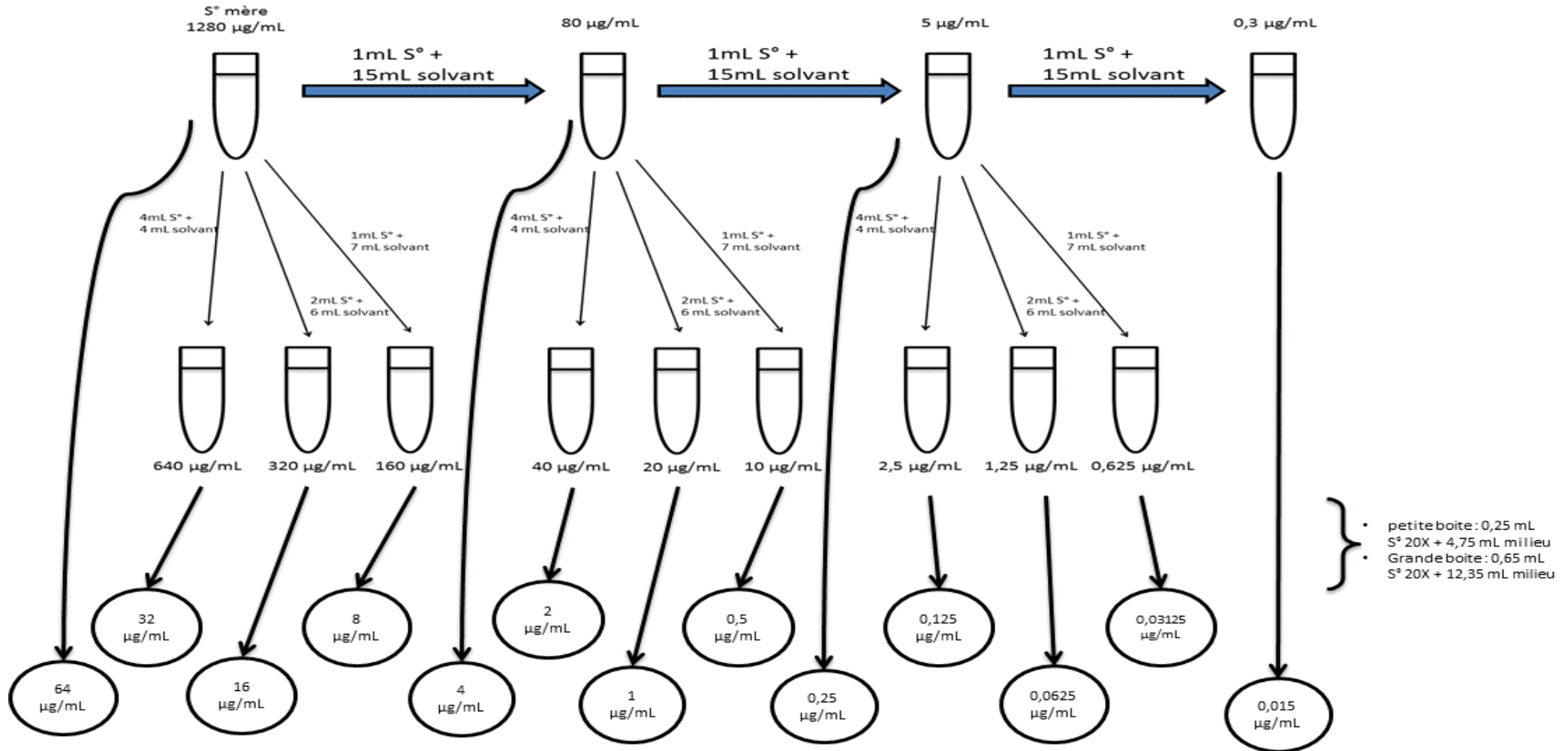
N° prélèvement	N° veau	Date de naissance	Malade / Sain	Durée de la maladie	Statut sanitaire	Prélèvement LBA	Sang
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

Autres analyses faites :

Autres agents pathogènes détecté dans l'élevage :

Annexe 2

Exemple de gamme de dilution d'antibiotiques + Vol et Concentrations des boîtes



Références

Références

- Anonyme 1 :données Molligen (<http://www.molligen.org>).
- Anonyme 2 : (www.fao.org).
- Anonyme3:(https://fr.wikipedia.org/wiki/Liste_des_wilayas_d%27Alg%C3%A9rie_par_suPerficie)
- Anonyme 4: (https://oec.world/en/visualize/tree_map/hs92/import/dza/all/10102/2019).
- Anonyme 5 : PHYLOViZ (<https://online.phyloviz.net/index>).
- Anonyme 6 : PUBMLST (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_mbovis_seqdef).
- Adamu, James Y, Nadeeka K Wawegama, Glenn F Browning, and Philip F Markham. "Membrane Proteins of Mycoplasma Bovis and Their Role in Pathogenesis." *Research in Veterinary Science* 95, no. 2 (2013): 321-325.
- Aebi, Marlis, Michèle Bodmer, Joachim Frey, and Paola Pilo. "Herd-Specific Strains of Mycoplasma Bovis in Outbreaks of Mycoplasmal Mastitis and Pneumonia." *Veterinary microbiology* 157, no. 3-4 (2012): 363-368.
- Aebi, Marlis, Bart HP van den Borne, Andreas Raemy, Adrian Steiner, Paola Pilo, and Michèle Bodmer. "Mycoplasma Bovis Infections in Swiss Dairy Cattle: A Clinical Investigation." *Acta Veterinaria Scandinavica* 57, no. 1 (2015): 1-11.
- Aimeur,. les mycoplasmoses aviaires:pathologies dominantes dans l'est algerien. Université mentouri de constantine. (2011): p172.
- Akan, M., Kaan, H., Tak, M.Ü.,. Diagnosis of Mycopiasma bovis Infection in Cattle by ELISA and PCR Makale Kodu (Article Code): KVF2013-995 Sigirlarda Mycopiasma bovis Infeksiyonunun ELISA ve PCR ile Teşhisi özet 20, (2014): 249–252.
- Amram, E., I. Mikula, C. Schnee, R. D. Ayling, R. A. J. Nicholas, R. S. Rosales, S. Harrus, and I. Lysnyansky. "16s Rna Gene Mutations Associated with Decreased Susceptibility to Tetracycline in Mycoplasma Bovis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59, no. 2 (2015): 796-802 % @ 0066-4804.
- Andersson, Anna-Maria, Anna Aspán, Henk J Wisselink, Bregtje Smid, Anne Ridley, Sinikka Pelkonen, Tiina Autio, *et al.* "A European Inter-Laboratory Trial to Evaluate the Performance of Three Serological Methods for Diagnosis of Mycoplasma Bovis Infection in Cattle Using Latent Class Analysis." *BMC veterinary research* 15, no. 1 (2019): 1-10.
- Apley, Mike. "Bovine Respiratory Disease: Pathogenesis, Clinical Signs, and Treatment in Lightweight Calves." *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 22, no. 2 (2006): 399-411.
- Arcangioli, M-A, T Lurier, K Hauray, and F Tardy. "Large-Size Fattening Calves' Lots Fed with Automatic Milk Feeders May Have an Increased Risk for Mycoplasma Bovis Infection Spread and for Antibiotic Use." *Animal* 15, no. 12 (2021): 100397.
- Arcangioli, Marie-Anne, Arnaud Duet, Gilles Meyer, Ann Dernburg, Pierre Bézille, François Poumarat, and Dominique Le Grand. "The Role of Mycoplasma Bovis in Bovine Respiratory Disease Outbreaks in Veal Calf Feedlots." *The veterinary journal* 177, no.

- 1 (2008): 89-93.
- Askaa, Gerd, and Henning Erno. "Note: Elevation of *Mycoplasma Agalactiae* Subsp. *Bovis* to Species Rank: *Mycoplasma Bovis* (Hale Et Al.) Comb. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 26, no. 3 (1976): 323-325.
- Ayling, R. D., S. E. Baker, R. A. J. Nicholas, M. L. Peek, and A. J. Simon. "Comparison of in Vitro Activity of Danofloxacin, Florfenicol, Oxytetracycline, Spectinomycin and Tilmicosin against Recent Field Isolates of *Mycoplasma Bovis*." *Veterinary Record* 146, no. 26 (2000): 745-747 % @ 0042-4900.
- Ayling, R.D., Bashiruddin, S.E., Nicholas, R.A.J., Papers & Articles *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000; (2004)
- Ayling, R. D., R. S. Rosales, G. Barden, and F. L. Gosney. "Changes in Antimicrobial Susceptibility of *Mycoplasma Bovis* Isolates from Great Britain." *The Veterinary Record* 175, no. 19 (2014): 486 % @ 0042-4900.
- Barre, Aurélien, Antoine de Daruvar, and Alain Blanchard. "Molligen, a Database Dedicated to the Comparative Genomics of Mollicutes." *Nucleic acids research* 32, no. suppl_1 (2004): D307-310.
- Bashiruddin JB, De Santis P, Varga E, et al. Confirmation of the presence of *Mycoplasma bovis* in Hungarian cattle with pneumonia resembling pleuropneumonia. *Vet Rec* (2001); 148:743–6.
- Becker, Claire AM, Chloé Ambroset, Anthéa Huleux, Angélique Vialatte, Adélie Colin, Agnès Tricot, Marie-Anne Arcangioli, and Florence Tardy. "Monitoring *Mycoplasma Bovis* Diversity and Antimicrobial Susceptibility in Calf Feedlots Undergoing a Respiratory Disease Outbreak." *Pathogens* 9, no. 7 (2020): 593.
- Becker, Claire AM, François M Thibault, Marie-Anne Arcangioli, and Florence Tardy. "Loss of Diversity within *Mycoplasma Bovis* Isolates Collected in France from Bovines with Respiratory Diseases over the Last 35 Years." *Infection, Genetics and Evolution* 33 (2015): 118-126.
- Belaïd, B, C Le Goff, and PC Lefèvre. "Epidemiologic Survey and Serodiagnosis of Contagious Agalactia of Small Ruminants in Eastern Algeria." *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 43, no. 1 (1990): 37-41.
- Belaïd, B., Le Goff, C., Lefèvre, P.-C., Epidemiologic survey and serodiagnosis of contagious agalactia of small ruminants in Eastern Algeria. *Elev Med Vet Pays* 43, (1990): 37–41. doi:10.19182/remvt.8892
- Benčina, Dušan, Janet M Bradbury, Laszlo Stipkovits, Zsuzsana Varga, Andrej Razpet, Andrej Bidovec, and Peter Dovč. "Isolation of *Mycoplasma Capricolum*-Like Strains from Chickens." *Veterinary microbiology* 112, no. 1 (2006): 23-31.
- Bey, Ingrid. *Les Ureaplasmes En Pathologie Bovine: Epidemiologie, Diagnostic Et Mesures De Controle*. Universite Claude-Bernard. Lyon. França.[THESE]. vI, (2006): 88.
- Bokma, Jade, Linde Gille, Koen De Bleecker, Jozefien Callens, Freddy Haesebrouck, Bart Pardon, and Filip Boyen. "Antimicrobial Susceptibility of *Mycoplasma Bovis* Isolates from Veal, Dairy and Beef Herds." *Antibiotics* 9, no. 12 (2020): 1-12.

- Brown, Daniel R. "Phylum Xvi. Tenericutes Murray 1984a, 356 Vp (Effective Publication: Murray 1984b, 33.)." In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, (2011) : 567-723:
- Brown MB, Dechant DM, Donovan GA. Association of *Mycoplasma bovis* with otitis media in dairy calves. *IOM Lett* 1998;12:104–5.
- Brown, D. R., May, M., Bradbury, J. M., & Johansson, K.-E.. Mollicutes. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. (2015): 1–8.
- Brscic, M., H. Leruste, L. F. M. Heutinck, E. A. M. Bokkers, M. Wolthuis-Fillerup, N. Stockhofe, F. Gottardo, *et al.* "Prevalence of Respiratory Disorders in Veal Calves and Potential Risk Factors." *Journal of Dairy Science* 95, no. 5 (2012): 2753-2764 % @ 0022-302.
- Bürki, Sibylle, Joachim Frey, and Paola Pilo. "Virulence, Persistence and Dissemination of *Mycoplasma Bovis*." *Veterinary microbiology* 179, no. 1-2 (2015): 15-22 % @ 0378-1135.
- Butler, JA, SA Sickles, CJ Johanns, and RF Rosenbusch. "Pasteurization of Discard *Mycoplasma Mastitic Milk* Used to Feed Calves: Thermal Effects on Various *Mycoplasma*." *Journal of dairy science* 83, no. 10 (2000): 2285-2288.
- Byrne, WJ, R McCormack, HJ Ball, N Brice, SE Baker, RD Ayling, and RAJ Nicholas. "Application of an Indirect Elisa to Milk Samples to Identify Cows with *Mycoplasma Bovis Mastitis*." *Veterinary Record* 146, no. 13 (2000): 368-369.
- Cai, Hugh Y., Rebecca McDowall, Lois Parker, Emily I. Kaufman, and Jeff L. Caswell. "Changes in Antimicrobial Susceptibility Profiles of *Mycoplasma Bovis* over Time." *Canadian journal of veterinary research* 83, no. 1 (2019): 34-41 % @ 0830-9000.
- Callaby, R, P Toye, A Jennings, Sam M Thumbi, JAW Coetzer, IC Conradie Van Wyk, O Hanotte, *et al.* "Seroprevalence of Respiratory Viral Pathogens of Indigenous Calves in Western Kenya." *Research in Veterinary Science* 108 (2016): 120-124.
- Callan, Robert J, and Franklyn B Garry. "Biosecurity and Bovine Respiratory Disease." *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 18, no. 1 (2002): 57-77.
- Callison SA., Riblet SM., Sun SM., Ikura N., Hikt D., Keiting V., Kleven SH. Development and validation of a real time Taqman polymérase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma gallispeticum* on naturally infected birds. *Avian Dis.*, (2006):50, 537-544.
- Castella, Stéphane. Evaluation de l'efficacité de BaytrilND 5% solution injectable dans le traitement d'une infection respiratoire à *Mycoplasma bovis* chez le veau. (2003): 101
- Caswell, Jeff L, and Marie Archambault. "*Mycoplasma Bovis Pneumonia* in Cattle." *Animal Health Research Reviews* 8, no. 2 (2007): 161-186.
- Chalker, Victoria J, Wanda MA Owen, Caren Paterson, Emily Barker, Harriet Brooks, Andrew N Rycroft, and Joe Brownlie. "*Mycoplasmas* Associated with Canine Infectious Respiratory Disease." *Microbiology* 150, no. 10 (2004): 3491-3497.

- Chazel, Myriam, Florence Tardy, Dominique Le Grand, Didier Calavas, and François Poumarat. "Mycoplasmoses of Ruminants in France: Recent Data from the National Surveillance Network." *BMC veterinary research* 6, no. 1 (2010): 1-8.
- Chazel, Myriam, Florence Tardy, Dominique Le Grand, Didier Calavas, and François Poumarat. "Mycoplasmoses of Ruminants in France: Recent Data from the National Surveillance Network." *BMC veterinary research* 6, no. 1 (2010): 32.
- Chopra, Ian, and Marilyn Roberts. "Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance." *Microbiology and molecular biology reviews* 65, no. 2 (2001): 232-260.
- Cornelissen, J.B.W.J., de Bree, F.M., van der Wal, F.J., Kooi, E.A., Koene, M.G.J., Bossers, A., Smid, B., Antonis, A.F., Wisselink, H.J., Mycoplasma detection by triplex real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from bovine respiratory disease complex cases. *BMC Vet Res* 13, (2017) 1–12. doi:10.1186/s12917-017-1023-6
- Cirone, Francesco, Barbara Padalino, Daniele Tullio, Paolo Capozza, Michele Losurdo, Gianvito Lanave, and Annamaria Pratelli. "Prevalence of Pathogens Related to Bovine Respiratory Disease before and after Transportation in Beef Steers: Preliminary Results." *Animals* 9, no. 12 (2019): 1-7.
- Citti, Christine. "Les Mycoplasmes: Stratégies D'adaptation Et De Persistance De Bactéries Minimales." *Le Nouveau Praticien Vétérinaire élevages et santé*, no. 3 (2006): 15-21.
- Clothier KA, Jordan DM, Thompson CJ, Kinyon JM, Frana TS, Strait EL. Mycoplasma bovis real-time polymerase chain reaction assay validation and diagnostic performance. *J Vet Diagn Investig.* (2010);22:956–60.
- C L S I. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 3rd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA. (2015)
- De Briyne, N, J Atkinson, SP Borriello, and L Pokludová. "Antibiotics Used Most Commonly to Treat Animals in Europe." *Veterinary Record* 175, no. 13 (2014): 325-325.
- Del Castillo, Jérôme RE. "Tetracyclines." *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* (2013): 257-268.
- Delabougliše, Alexis, Andrew James, Jean-François Valarcher, Sara Hagglünd, Didier Raboisson, and Jonathan Rushton. "Linking Disease Epidemiology and Livestock Productivity: The Case of Bovine Respiratory Disease in France." *PLoS One* 12, no. 12 (2017): e0189090.
- Euzéby, Jean Paul. "List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: A Folder Available on the Internet." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47, no. 2 (1997): 590-592.
- Fanelli, A., Cirilli, M., Lucente, M.S., Attia, A., Zarea, K., Buonavoglia, D., Tempesta, M., Greco, G., Greco, G., Greco, G., 2021. Fatal Calf Pneumonia Outbreaks in Italian Dairy Herds Involving Mycoplasma bovis and Other Agents of BRD Complex 8, 1–7. doi:10.3389/fvets.(2021).742785
- Fekete SG, Kells RO. Interrelationship of feeding with immunity and parasitic infection: a

- review. *Vet Med (Czech)* (2007): 52:131-143.
- Fodor, L., K. Janosi, L. Makrai, and M. Gyuranecz. 2017. Screening of Hungarian Cattle Herds for Seropositivity to *Mycoplasma bovis*. *Acta Veterinaria Hungarica* 65(2):166-172.
- Foster, A. P., Naylor R. D. , N. M. Howie, R. A. J. Nicholas, and R. D. Ayling. 2009. *Mycoplasma bovis* and otitis in dairy calves in the United Kingdom. *The Veterinary Journal* 179(3):455-457.
- Fostier b. Prévention des maladies respiratoires. In: Comptes rendus du Congrès de la Société Française de Buiatrie. Paris, 24-25 novembre 1988, 147-152.
- Francis, Markus Isa, Mashood Abiola Raji, Haruna Makanjuola Kazeem, and Mohammed Musa Suleiman. "Elisa-Based Serological Survey of *Mycoplasma Bovis* in Cattle in Three Local Government Areas in Adamawa State, Nigeria." *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 2, no. 2 (2015): 170-174.
- Francoz, D., Étude des facteurs de risque associés aux infections respiratoires chez les génisses laitières de remplacement au Québec, in: 30e Symposium Sur Les Bovins Laitiers « La Relève, c'est Notre Avenir! » Le Jeudi 7 Décembre 2006. p. 18.
- Francoz, David, Marie-Anne Arcangioli, and Dominique LE Grand. "Les Mycoplasmoses À *M. Bovis*: Comment Limiter Leur Impact?". *Point vétérinaire* 41 (2010): 101-107.
- Francoz, D., Buczinski, S., Bélanger, A.M., Forté, G., Labrecque, O., Tremblay, D., Wellemans, V., Dubuc, J., Respiratory Pathogens in Québec Dairy Calves and Their Relationship with Clinical Status, Lung Consolidation, and Average Daily Gain. *J Vet Intern Med.* (2015) ;29:381–387. . [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
- Fraser, Claire M, Jeannine D Gocayne, Owen White, Mark D Adams, Rebecca A Clayton, Robert D Fleischmann, Carol J Bult, *et al.* "The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma Genitalium*." *Science* 270, no. 5235 (1995): 397-404.
- Fulton, R. W., Blood, K. S., Panciera, R. J., Payton, M. E., Ridpath, J. F., Confer, A. W., ... Reck, A.. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (2009) , 21, 464–477.
- Gagea MI, Bateman KG, Shanahan RA, Van dreumel T, Mcewen BJ , Carman S, Archambault M and Caswell JL. Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* (2006) 18, 29-40.
- Ganter, Sarah." Le sécrétome des bactéries du genre *Mycoplasma* : focus sur les protéases sécrétées et les vésicules extracellulaires produites chez les mycoplasmes des ruminants."(2019):273
- García-Galán, Ana, Laurent-Xavier Nouvel, Eric Baranowski, Ángel Gómez-Martín, Antonio Sánchez, Christine Citti, and Christian de la Fe. "*Mycoplasma Bovis* in Spanish Cattle Herds: Two Groups of Multiresistant Isolates Predominate, with One Remaining Susceptible to Fluoroquinolones." *Pathogens* 9, no. 7 (2020): 545.
- García-Galán, Ana, Juan Seva, Ángel Gómez-Martín, Joaquín Ortega, Francisco Rodríguez,

- Ángel García-Muñoz, and Christian De la Fe. "Importance and Antimicrobial Resistance of Mycoplasma Bovis in Clinical Respiratory Disease in Feedlot Calves." *Animals* 11, no. 5 (2021): 1470.
- Gasmi, Salima. "ExcrÉTion Nasale Et RéPonse SéRologique à Mycoplasma Bovis Chez Les GéNisses De Remplacement De 0 à 7 Mois D'âGe Dans 4 Troupeaux Laitiers Au QuéBec: ÉTude De Cohortes." (2011):101.
- Gautier-Bouchardon, Anne V., Severine Ferre, Dominique Le Grand, Agnès Paoli, Emilie Gay, and François Poumarat. "Overall Decrease in the Susceptibility of Mycoplasma Bovis to Antimicrobials over the Past 30 Years in France." *PLoS One* 9, no. 2 (2014): e87672 % @ 1932-6203.
- Gharaibeh, Saad, and Mohammad Al-Rashdan. "Change in Antimicrobial Susceptibility of Mycoplasma Gallisepticum Field Isolates." *Veterinary microbiology* 150, no. 3-4 (2011): 379-383.
- Giguère, Steeve, John F Prescott, and Patricia M Dowling. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. John Wiley & Sons, (2013):211-231.
- Giguère, Steeve, and Patricia M Dowling. "Fluoroquinolones." *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* (2013): 295-314.
- Gille, Linde. "Mycoplasma Bovis: Sources of Infection, Prevalence and Risk Factors." Ghent University, Ghent, Belgium, (2018).
- Gille, Linde, J Callens, K Supré, Filip Boyen, Freddy Haesebrouck, Laura Van Driessche, Katharina van Leenen, Piet Deprez, and Bart Pardon. "Use of a Breeding Bull and Absence of a Calving Pen as Risk Factors for the Presence of Mycoplasma Bovis in Dairy Herds." *Journal of dairy science* 101, no. 9 (2018): 8284-8290.
- Giraud, N, M-A Arcangioli, and D Le Grand. "Le Lavage Broncho-Alvéolaire Par Voie Naso-Trachéale Chez Les Bovins." *BULLETIN-GTV*, no. 13 (2002): 9-12.
- Gonzalez, R. N., P. M. Sears, R. A. Merrill, and G. L. Hayes.. Mastitis due to Mycoplasma in the state of New York during the period 1972–1990. (1992) *Cornell Vet.* 82:29–40.
- Gourlay RN, Thomas LH, Howard CJ. Pneumonia and arthritis in gnotobiotic calves following inoculation with Mycoplasma agalactiae subsp bovis. *Vet Rec* (1976);98:506–7.
- Gourlay RN, Thomas LH, Wyld SG. Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of Mycoplasma bovis in a rearing herd. *Vet Rec* 1989;124:420–2.
- Greene, CE, and FW CHANDLER. "Infectious Diseases of the Dog and Cat. 2nd Edn. Ed Ce Greene." Philadelphia, WB Saunders, (1998).
- Greene, CE, and DW Dreesen. "Rabies. Greene, Ce Infectious Diseases of the Dog and Cat." WB Saunders Company, Philadelphia, (1990): 446-454.
- Grissett, GP, BJ White, and RL Larson. "Structured Literature Review of Responses of Cattle to Viral and Bacterial Pathogens Causing Bovine Respiratory Disease Complex." *Journal of veterinary internal medicine* 29, no. 3 (2015): 770-780.
- Grover, Rajesh K., Xueyong Zhu, Travis Nieuwma, Teresa Jones, Isabel Boero, Amanda S. MacLeod, Adam Mark, *et al.* "A Structurally Distinct Human Mycoplasma Protein That

- Generically Blocks Antigen-Antibody Union." *Science* 343, no. 6171 (2014): 656-661 % @ 0036-8075.
- Gruson, D, S Pereyre, H Renaudin, A Charron, C Bébéar, and CM Bébéar. "In Vitro Development of Resistance to Six and Four Fluoroquinolones in *Mycoplasma Pneumoniae* and *Mycoplasma Hominis*, Respectively." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, no. 3 (2005): 1190-1193.
- Gustin P, Bakima M, Art T, Lekeux P, Lomba F, Van DE Woestijne KP. Pulmonary function values and growth in Belgian white and blue double-musled cattle. *Res Vet Sci.*, 1988, 45 (3), 405-10.
- Haapala, Vera, Tarja Pohjanvirta, Nella Vähänikkilä, Jani Halkilahti, Henri Simonen, Sinikka Pelkonen, Timo Soveri, Heli Simojoki, and Tiina Autio. "Semen as a Source of *Mycoplasma Bovis* Mastitis in Dairy Herds." *Veterinary microbiology* 216 (2018): 60-66 % @ 0378-1135.
- Habert, Guillaume. "Comparaison in Vivo De L'effet Agalactogène De Surnageants De Culture De Deux Mycoplasmes." (2002):82
- Hashem, Y.M.; Mousa, W.S.; Abdeen, E.E.; Abdelkhalek, H.M.; Nooruzzaman, M.; El-Askary, A.; Ismail, K.A.; Megahed, A.M.; Abdeen, A.; Soliman, E.A.; Prevalence and Molecular Characterization of *Mycoplasma* Species, *Pasteurella multocida*, and *Staphylococcus aureus* Isolated from Calves with Respiratory Manifestations. *Animals* (2022), 12, 312. <https://doi.org/10.3390/ani12030312>
- Hale Hh, HELMBOLDT CF, PLASTRIDGE WN, and STULA EF. "Bovine Mastitis Caused by a *Mycoplasma* Species." *The Cornell veterinarian* 52 (1962): 582-591.
- Hannan, P. C., G. D. Windsor, A. De Jong, N. Schmeer, and M. Stegemann. "Comparative Susceptibilities of Various Animal-Pathogenic *Mycoplasmas* to Fluoroquinolones." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, no. 9 (1997): 2037-2040 % @ 0066-4804.
- Hannan, Peter C. T. "Guidelines and Recommendations for Antimicrobial Minimum Inhibitory Concentration (Mic) Testing against Veterinary *Mycoplasma* Species." *Veterinary research* 31, no. 4 (2000): 373-395 % @ 0928-4249.
- Hayman B, Hirst R: Development of a semi-nested PCR for the improved detection of *Mycoplasma bovis* from bovine milk and mucosal samples. *Vet Microbiol*, 91, 91-100, (2003).
- Hazelton, MS, JM Morton, KL Bosward, PA Sheehy, AM Parker, CJ Dwyer, PG Niven, and JK House. "Isolation of *Mycoplasma* Spp. And Serological Responses in Bulls Prior to and Following Their Introduction into *Mycoplasma Bovis*-Infected Dairy Herds." *Journal of dairy science* 101, no. 8 (2018): 7412-7424.
- Hazelton, MS, PA Sheehy, KL Bosward, AM Parker, JM Morton, CJ Dwyer, PG Niven, and JK House. "Shedding of *Mycoplasma Bovis* and Antibody Responses in Cows Recently Diagnosed with Clinical Infection." *Journal of Dairy Science* 101, no. 1 (2018): 584-589.
- Heleili, N., "Etude Préliminaire Des Mycoplasmoses Respiratoires Aviaires Dans La Région De Batna".Universuté de Batna 1, (2011):202.

- Hermeyer, Kathrin, Inka Buchenau, Anne Thomasmeyer, Berit Baum, Joachim Spersger, Renate Rosengarten, and Marion Hewicker-Trautwein. "Chronic Pneumonia in Calves after Experimental Infection with Mycoplasma Bovis Strain 1067: Characterization of Lung Pathology, Persistence of Variable Surface Protein Antigens and Local Immune Response." *Acta Veterinaria Scandinavica* 54, no. 1 (2012): 1-11.
- Heuvelink, A, Constance Reugebrink, and Jet Mars. "Antimicrobial Susceptibility of Mycoplasma Bovis Isolates from Veal Calves and Dairy Cattle in the Netherlands." *Veterinary microbiology* 189 (2016): 1-7.
- Hirose, K., Kobayashi, H., Ito, N., Kawasaki, Y., Zako, M., Kotani, K., Ogawa, H., Sato, H., Isolation of Mycoplasmas from Nasal Swabs of Calves affected with Respiratory Diseases and Antimicrobial Susceptibility of their Isolates (2003) 351, 347–351.
- Huebschle, Otto JB, Roger D Ayling, Kevin Godinho, Obed Lukhele, Georgina Tjipura-Zaire, Tim G Rowan, and Robin AJ Nicholas. "Danofloxacin (Advocin™) Reduces the Spread of Contagious Bovine Pleuropneumonia to Healthy in-Contact Cattle." *Research in Veterinary Science* 81, no. 3 (2006): 304-309.
- Jaÿ, Maryne, François Poumarat, Adélie Colin, Agnès Tricot, and Florence Tardy. "Addressing the Antimicrobial Resistance of Ruminant Mycoplasmas Using a Clinical Surveillance Network." *Frontiers in Veterinary Science* 8 (2021):1-12.
- Jing Hua, F., Qing You, L., Min Jun, X., De Shun, S., Xian Hui, H., Yan, P., Rui Bin, G., Qi, G., Sheng Xian, Y., Hua Sheng, S., Xing quan, Z., Seroprevalence of Mycoplasma bovis infection in dairy cows in subtropical southern China. *Afr. J. Biotechnol.* (2011).10, 11313–11316.
- Johansson, Karl-Erik, and Bertil Pettersson. "Taxonomy of Mollicutes." In *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. 1-29: Springer, (2002).
- Justice-Allen, A., Trujillo, J., Corbett, R., Harding, R., Goodell, G., Wilson, D.. Survival and replication of Mycoplasma species in recycled bedding sand and association with mastitis on dairy farms in Utah. *Journal of Dairy Science*, 93 (1) (2010) : 192-202.
- Kabouia R., Etude épidémiologique des mycoplasmes des petits ruminants “ Application de l’Immunoblot à l’étude des sérums de moutons infectés expérimentalement par Mycoplasma agalactiae.” Université des Frères Mentouri– Constantine (2005).p116.
- Kahya S., TEMELLI S., EYIGOR A., CARLI T.K. "Real time PCR culture and setology for the diagnosis of Mycoplasma gallisepticum in chicken breeder flocks. *Vet. Microbiol.* Vol 144 n° 3-4 , (2010): 319
- Kempf I. Influence de l’administration d’antibiotiques sur le diagnostic de l’infection à Mycoplasma gallisepticum chez le poulet. *Point Vétérinaire*, 23, 136, (1991): 767-773.
- Kempf I., Blanchard A., Gesbert F., Guittet M., Benneiean G. The Polymeerase chain reaction for Mycoplasma gallisepticum detection. *Avian Pathol.*, 22, (1993): 739-7 50.
- Kempf I., Gesbert F., Guittet M., Bennejean G. *Mycoplasma gallisepticum* in drug treated chickens: comparison of diagnosis methods including polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. B.*, 415, (1994): 597-602.khalil
- Kempf I., GESBERTF. , GUITTET M. Experimentai Infection of chickens with anatypical

- Mycoplasma gallisepticum strain: Comparison of diagnostic methods. *Res. Vet. Sci.*, 63, (1997): 211-213
- Kempf I., DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathol.*, 27, (1998): 7.14.
- Khalil, Dima. "Résistance Aux Antibiotiques Chez Mycoplasma Bovis: Mécanismes Moléculaires Et Évolution En France." Université de Lyon, 2016.p132
- Khalil, Dima, Claire A. M. Becker, and Florence Tardy. "Alterations in the Quinolone Resistance-Determining Regions and Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates and Laboratory-Derived Mutants of Mycoplasma Bovis: Not All Genotypes May Be Equal." *Applied and environmental microbiology* 82, no. 4 (2016): 1060-1068 % @ 0099-2240.
- Khalil, Dima, Claire A. M. Becker, and Florence Tardy." Monitoring the Decrease in Susceptibility to Ribosomal Rnas Targeting Antimicrobials and Its Molecular Basis in Clinical Mycoplasma Bovis Isolates over Time." *Microbial Drug Resistance* 23, no. 6 (2017): 799-811 % @ 1076-6294.
- Kinnear, Andrea, Matthew Waldner, Tim A McAllister, Rahat Zaheer, Karen Register, and Murray Jelinski. "Application of Four Genotyping Methods to Mycoplasma Bovis Isolates Derived from Western Canadian Feedlot Cattle." *Journal of Clinical Microbiology* 59, no. 7 (2021): e00044-21.
- Klein, Alex, Dominique le Grand, Roland Gasnier, Pascal Fanuel, Frédéric Lemarchand, and Sébastien ASSIE. "Mycoplasma Bovis Est Un Agent Pathogène Primaire Et Secondaire." *Point vétérinaire*, no. MARS (2005): 52-63.
- Klein, Ulrich, Anno de Jong, Hilde Moyaert, Farid El Garch, Rocio Leon, Alexandra Richard-Mazet, Markus Rose, *et al.* "Antimicrobial Susceptibility Monitoring of Mycoplasma Hypopneumoniae and Mycoplasma Bovis Isolated in Europe." *Veterinary microbiology* 204 (2017): 188-193.
- klein, Ulrich, Anno de Jong, Myriam Youala, Farid El Garch, Clelia Stevenin, Hilde Moyaert, Markus Rose, *et al.* "New Antimicrobial Susceptibility Data from Monitoring of Mycoplasma Bovis Isolated in Europe." *Veterinary microbiology* 238 (2019): 108432.
- Kong, Ling-Cong, Duo Gao, Bo-Yan Jia, Zi Wang, Yun-Hang Gao, Zhi-Hua Pei, Shu-Ming Liu, and Jiu-Qing Xin. "Antimicrobial Susceptibility and Molecular Characterization of Macrolide Resistance of Mycoplasma Bovis Isolates from Multiple Provinces in China." *Journal of Veterinary Medical Science* 78, no. 2 (2016): 293-296.
- Kroemer, S., D. Galland, V. Guérin- Faublée, H. Giboin, and F. Woehrlé- Fontaine. "Survey of Marbofloxacin Susceptibility of Bacteria Isolated from Cattle with Respiratory Disease and Mastitis in Europe." *Veterinary Record* 170, no. 2 (2012): 53-53 % @ 0042-4900.
- Lam, KM. "Chemotaxis in Mycoplasma Gallisepticum." *Avian diseases* 49, no. 1 (2005): 152-154.
- Langford, EV. "Mycoplasma Species Recovered from the Reproductive Tracts of Western Canadian Cows." *Canadian Journal of Comparative Medicine* 39, no. 2 (1975): 133.

- LeGrand, Dominique, Michel Solsona, Renate Rosengarten, and François Poumarat. "Adaptive Surface Antigen Variation in Mycoplasma Bovis to the Host Immune Response." *FEMS Microbiology Letters* 144, no. 2-3 (1996): 267-275.
- Lekeux P. Impact fonctionnel des pathologies respiratoires bovines. In: Comptes rendus du Congrès de la Société Française de Buiatrie. Paris, 24-25 novembre 1988, 108-115.
- Lekeux P. Physiopathologie pulmonaire et conséquences thérapeutiques. In: Comptes rendus du Congrès de la Société Française de Buiatrie. Paris, 26-27 novembre 1997, 243
- Lerner, Uri, Eytan Amram, Roger D Ayling, Inna Mikula, Irena Gerchman, Shimon Harrus, Dina Teff, David Yogev, and Inna Lysnyansky. "Acquired Resistance to the 16-Membered Macrolides Tylosin and Tilmicosin by Mycoplasma Bovis." *Veterinary microbiology* 168, no. 2-4 (2014): 365-371.
- Ley D. H., AVAKIAN A P., MCLARCEN J , BERKHOFF JE. Diagnosis of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae using DNA probe Polymerase Chain Reaction test kits' Proc. 42'd Western Poultry Disease Conf" Sacramento,CA 1993, PP. (1993):83-85.
- Liapi, Maria, George Botsaris, Costas Arsenoglou, Nikolas Markantonis, Christodoulos Michael, Antonis Antoniou, and Christodoulos Pipis. "Rapid Detection of Mycoplasma Bovis, Staphylococcus Aureus and Streptococcus Agalactiae in Cattle Bulk Tank Milk in Cyprus and Relations with Somatic Cell Counts." *Pathogens* 10, no. 7 (2021): 841.
- Lorin, Blandine. *Prévalence De Mycoplasma Bovis Dans Les Mammites Bovines: Enquête En Région Rhône-Alpes*. Editions universitaires européennes, 2012.
- Lovmar, Martin, Karin Nilsson, Eliisa Lukk, Vladimir Vimberg, Tanel Tenson, and Måns Ehrenberg. "Erythromycin Resistance by L4/L22 Mutations and Resistance Masking by Drug Efflux Pump Deficiency." *The EMBO journal* 28, no. 6 (2009): 736-744.
- Lysnyansky, Inessa, Renate Rosengarten, and David Yogev. "Phenotypic Switching of Variable Surface Lipoproteins in Mycoplasma Bovis Involves High-Frequency Chromosomal Rearrangements." *Journal of bacteriology* 178, no. 18 (1996): 5395-5401 % @ 0021-9193.
- Lysnyansky, Inna, and Roger D. Ayling. "Mycoplasma Bovis: Mechanisms of Resistance and Trends in Antimicrobial Susceptibility." *Frontiers in microbiology* 7 (2016): 1-7.
- Maniloff, JACK, and HAROLD J Morowitz. "Cell Biology of the Mycoplasmas." *Bacteriological reviews* 36, no. 3 (1972): 263-290.
- Marois C. Épidémiologie des mycoplasmoses aviaries : applications et intérêts des méthodes d'amplification génique. Thèse d'Université Claude Bernard Lyon, (2001):p237
- Maunsell, Fiona P, and G Arthur Donovan. "Mycoplasma Bovis Infections in Young Calves." *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 25, no. 1 (2009): 139-177.
- Maunsell, F. P., G. A. Donovan, C. Risco, and M. B. Brown. Field evaluation of a Mycoplasma bovis bacterin in young dairy calves. *Vaccine* 27(21) (2009):2781-2788.
- Maunsell, F. P., A. R. Woolums, D. Francoz, R. F. Rosenbusch, D. L. Step, David J. Wilson, and E. D. Janzen. "Mycoplasma Bovis Infections in Cattle." *Journal of veterinary internal medicine* 25, no. 4 (2011): 772-783 % @ 0891-6640.

- Maunsell, F., Brown, M.B., Powe, J., Ivey, J., Woolard, M., Love, W., Simecka, J.W. Oral inoculation of young dairy calves with *Mycoplasma bovis* results in colonization of tonsils, development of otitis media and local immunity. *Plos one*, 7 (9). doi: 10.1371/journal.pone.0044523. (2012).
- McAloon, C.I., McAloon, C.G., Tratalos, J., O'Grady, L., McGrath, G., Guelbenzu, M., Graham, D.A., O'Keefe, K., Barrett, D.J., More, S.J., Seroprevalence of *Mycoplasma bovis* in bulk milk samples in Irish dairy herds and risk factors associated with herd seropositive status. *J Dairy Sci* 105, 5410–5419. doi:10.3168/jds.2021-21334. (2022)
- Miles, R., & Nicholas, R. A. J. (1998). *Mycoplasma protocols*, Vol. 104. Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0896035255>
- Moalic PI., GESBERT F., KEMPF I. "Mise au point d'une technique PCR pour le dépistage de *Mycoplasma meleagridis*". Deuxièmes journées de la recherche avicole, Tours, (1997): 145-148
- Nagatomo, Hiroshi, Youichi Takegahara, Tomohiro Sonoda, Akiko Yamaguchi, Ryoko Uemura, Shoichi Hagiwara, and Masuo Sueyoshi. "Comparative Studies of the Persistence of Animal Mycoplasmas under Different Environmental Conditions." *Veterinary microbiology* 82, no. 3(2001): 223-232.
- Nascimento, Elmiro Rosendo, VLA Pereira, MGF Nascimento, and ML Barreto. "Avian Mycoplasmosis Update." *Brazilian Journal of Poultry Science* 7, no. 1 (2005): 1-9.
- Nicholas, Robin AJ, Roger D Ayling, and Laszlo P Stipkovits. "An Experimental Vaccine for Calf Pneumonia Caused by *Mycoplasma Bovis*: Clinical, Cultural, Serological and Pathological Findings." *Vaccine* 20, no. 29-30 (2002): 3569-3575.
- Nicholas, RAJ, and RD Ayling. "*Mycoplasma Bovis*: Disease, Diagnosis, and Control." *Research in veterinary science* 74, no. 2 (2003): 105-112.
- Nicholas RA. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. *Vet Rec.* 168.(2011): 459–62.
- Nicholas, Robin AJ, Larry K Fox, and Inna Lysnyansky. "*Mycoplasma Mastitis* in Cattle: To Cull or Not to Cull." *The Veterinary Journal* 216 (2016): 142-147.
- Nicolet, J. "Animal Mycoplasmoses: A General Introduction." *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 15, no. 4 (1996): 1233-1240.
- OIE. Contagious bovine pleuropneumonia (infection with *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* SC) :chapter3.4.8. Main Diagnostic Tests Vaccines Terr Anim Paris, Fr OIE–World Organ Anim Heal. (2021): 1–16
- Oļševskis, Edvīns, Vittorio Guberti, Mārtiņš Seržants, Jørgen Westergaard, Carmina Gallardo, Ieva Rodze, and Klaus Depner. "African Swine Fever Virus Introduction into the Eu in 2014: Experience of Latvia." *Research in veterinary science* 105 (2016): 28-30.
- Pancier, R. J., & Confer, A. W. (2010). Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26, 191–214.
- Pardon, Bart, Koen De Bleecker, Jeroen Dewulf, Jozefien Callens, Filip Boyen, Boudewijn Catry, and Piet Deprez. "Prevalence of Respiratory Pathogens in Diseased, Non-Vaccinated, Routinely Medicated Veal Calves." *Veterinary Record* 169, no. 11 (2011): 278-78.

- Pardon, B, J Callens, J Maris, L Allais, W Van Praet, P Deprez, and S Ribbens. "Pathogen-Specific Risk Factors in Acute Outbreaks of Respiratory Disease in Calves." *Journal of Dairy Science* 103, no. 3 (2020): 2556-2566.
- Pardon, Bart, and Sébastien Buczinski. "Bovine Respiratory Disease Diagnosis: What Progress Has Been Made in Infectious Diagnosis?". *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 36, no. 2 (2020): 425-444.
- Parker AM, Sheehy PA, Hazelton MS, Bosward KL, House JK. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *J Vet Intern Med.* (2018);32:1241–52.
- Parker, A. M., J. K. House, M. S. Hazelton, K. L. Bosward, J. M. Morton, and P. A. Sheehy. "Bulk Tank Milk Antibody Elisa as a Biosecurity Tool for Detecting Dairy Herds with Past Exposure to *Mycoplasma Bovis*." *Journal of Dairy Science* 100, no. 10 (2017): 8296-309 % @ 0022-302.
- Peek, S.F , Divers.. Rhebun's disease of dairt cattle. 3Rd Edition. Elsevier(2018) : 704
- Perez-Casal, Jose. "Pathogenesis and Virulence of *Mycoplasma Bovis*." *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 36, no. 2 (2020): 269-278.
- Perez-Casal, Jose, Tracy Prysliak, Teresa Maina, Muhammad Suleman, and Steve Jimbo. "Status of the Development of a Vaccine against *Mycoplasma Bovis*." *Vaccine* 35, no. 22 (2017): 2902-2907 % @ 0264-410X.
- Pereyre, S., P. Gonzalez, B. De Barbeyrac, A. Darnige, H. Renaudin, A. Charron, S. Raheison, C. Bébéar, and C. M. Bébéar. "Mutations in 23s Rrna Account for Intrinsic Resistance to Macrolides in *Mycoplasma Hominis* and *Mycoplasma Fermentans* and for Acquired Resistance to Macrolides in *M. Hominis*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, no. 10 (2002): 3142-3150 % @ 0066-4804.
- Petersen, Mette B., Jeanette Pedersen, Dinah L. Holm, Matthew Denwood, and Liza R. Nielsen. "A Longitudinal Observational Study of the Dynamics of *Mycoplasma Bovis* Antibodies in Naturally Exposed and Diseased Dairy Cows." *Journal of Dairy Science* 101, no. 8 (2018): 7383-7396 % @ 0022-302.
- Pettersson, Bertil, Thomas Leitner, Mostafa Ronaghi, G Bölske, Mathias Uhlen, and Karl-Erik Johansson. "Phylogeny of the *Mycoplasma Mycoides* Cluster as Determined by Sequence Analysis of the 16s Rrna Genes from the Two Rrna Operons." *Journal of Bacteriology* 178, no. 14 (1996): 4131-4142.
- Pfützner, H., and K. Sachse. "Mycoplasma Bovis as an Agent of Mastitis, Pneumonia, Arthritis and Genital Disorders in Cattle." *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 15, no. 4 (1996): 1477-1494 % @ 0253-1933.
- Phillips CJC, Pines MK, Latter M, Muller T, Petherick JC, Norman ST, Gaugan JB. "The physiological and behavioral responses of steers to gaseous ammonia in simulated long-distance transport by ship". *J Anim Sci.* (2010);88(11):3579–3589.
- Porret-Blanc, Camille. "Épidémiologie De *Mycoplasma Bovins* En Élevage Allaitant: Mise Au Point D'un Protocole D'enquête." (2017):p79
- Potter T, Hogan C,"Séroprévalence of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of Bovine respiratory disease from 2015 to 2019 : Word biatrics congress september 4th - 8th

- Madrid.(2022).www.WBC-madrid2022.com.
- Poumarat, F, B Perrin, and D Longchambon. "Identification of Ruminant Mycoplasmas by Dot Immunobinding on Membrane Filtration (Mf Dot)." *Veterinary microbiology* 29, no. 3-4 (1991): 329-338.
- Poumarat, F, D Longchambon, and JL Martel. "Application of Dot Immunobinding on Membrane Filtration (Mf Dot) to the Study of Relationships within "M. Mycoides Cluster" and within "Glucose and Arginine-Negative Cluster" of Ruminant Mycoplasmas." *Veterinary microbiology* 32, no. 3-4 (1992): 375-390.
- Poumarat F," Identification of mycoplasmas by Dot immunobinding on membrane filtration (Mf.Dot). *Méthods in molicular biology* vol.104.(1998): Mycoplasmas protocols.
- Poumarat F, Le Grand D, Philippe S, et al. Efficacy of spectinomycin against *Mycoplasma bovis* induced pneumonia in conventionally reared calves. *Vet Microbiol* (2001);80:23–35.
- Poumarat, F, D Le Grand, and D Bergonier. "Propriétés Générales Des Mycoplasmes Et Hypervariabilité Antigénique." *Point Veterinary* 28 (1996): 761-767.
- Poumarat, F, N Jarrige, and F Tardy. "Purpose and Overview of Results of the Vigimyc Network for the Epidemiological Surveillance of Mycoplasmoses in Ruminants in France." *EuroRéférence* 12 (2014): 24-28.
- Radaelli, E, M Luini, GR Loria, RAJ Nicholas, and E Scanziani. "Bacteriological, Serological, Pathological and Immunohistochemical Studies of *Mycoplasma Bovis* Respiratory Infection in Veal Calves and Adult Cattle at Slaughter." *Research in veterinary science* 85, no. 2 (2008): 282-290.
- Raherison, S, P Gonzalez, H Renaudin, A Charron, C Bébéar, and CM Bebear. "Increased Expression of Two Multidrug Transporter-Like Genes Is Associated with Ethidium Bromide and Ciprofloxacin Resistance in *Mycoplasma Hominis*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, no. 1 (2005): 421-424.
- Raviv Z. et Kleven SH. "The development of diagnostic real- time Taq Man PCRs for pathogenic avian mycoplasmas". *Avian Dis.*, 53, (2009): 103-107.
- Razin, Shmuel. "Mycoplasmas." *Medical Microbiology. 4th edition* (1996).
- Razin, Shmuel, and Leonard Hayflick. "Highlights of *Mycoplasma* Research—an Historical Perspective." *Biologicals* 38, no. 2 (2010): 183-190.
- Razin, Shmuel, David Yogev, and Yehudith Naot. "Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas." *Microbiology and molecular biology reviews* 62, no. 4 (1998): 1094-156 % @ 98-5557.
- Register, Karen B, Inna Lysnyansky, Murray D Jelinski, William D Boatwright, Matthew Waldner, Darrell O Bayles, Paola Pilo, and David P Alt. "Comparison of Two Multilocus Sequence Typing Schemes for *Mycoplasma Bovis* and Revision of the Pubmlst Reference Method." *Journal of clinical microbiology* 58, no. 6 (2020): e00283-20.
- Register, Karen B, Luke Thole, Ricardo F Rosenbush, and F Chris Minion. "Multilocus Sequence Typing of *Mycoplasma Bovis* Reveals Host-Specific Genotypes in Cattle

- Versus Bison." *Veterinary microbiology* 175, no. 1 (2015): 92-98.
- Rérat, M, Sarah Albini, Valentine Jaquier, and Daniela Hüsey. "Bovine Respiratory Disease: Efficacy of Different Prophylactic Treatments in Veal Calves and Antimicrobial Resistance of Isolated Pasteurellaceae." *Preventive veterinary medicine* 103, no. 4 (2012): 265-273.
- Rodrigues, Valérie, Philippe Holzmüller, Carinne Puech, Hezron Wesonga, François Thiaucourt, and Lucia Manso-Silvan. "Whole Blood Transcriptome Analysis of Mycoplasma Mycoides Subsp. Mycoides-Infected Cattle Confirms Immunosuppression but Does Not Reflect Local Inflammation." *PLoS One* 10, no. 10 (2015): e0139678.
- Rosenbusch R. Bovine mycoplasmosis. In: Proceedings of the 34th Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners. Vancouver (BC), September 13-15, (2001). p. 49–52.
- Rottem, Shlomo, and Shmuel Razin. "Electrophoretic Patterns of Membrane Proteins of Mycoplasma." *Journal of bacteriology* 94, no. 2 (1967): 359-364.
- Sachse, K., H. Pfützner, H. Hotzel, B. Demuth, M. Heller, and E. Berthold. "Comparison of Various Diagnostic Methods for the Detection of Mycoplasma Bovis." *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties* 12 (1993): 571-71 % @ 0253-1933.
- Sachse, Konrad, Hala S. H. Salam, Roland Diller, Evelyn Schubert, Bernd Hoffmann, and Helmut Hotzel. "Use of a Novel Real-Time Pcr Technique to Monitor and Quantitate Mycoplasma Bovis Infection in Cattle Herds with Mastitis and Respiratory Disease." *The veterinary journal* 186, no. 3 (2010): 299-303 % @ 1090-0233.
- Salich H., Hinz K H., Graack H D., Ryll M. Comparison of a commercial PCR-based test to culture methods for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in concurrently infected chickens. *Avian Pathol.* 27, (1998): 142-147
- Sato, Toyotaka, Torahiko Okubo, Masaru Usui, Hidetoshi Higuchi, and Yutaka Tamura. "Amino Acid Substitutions in Gyra and Parc Are Associated with Fluoroquinolone Resistance in Mycoplasma Bovis Isolates from Japanese Dairy Calves." *Journal of Veterinary Medical Science* 75, no. 8 (2013): 1063-1065 % @ 0916-7250.
- Schlünzen, Frank, Raz Zarivach, Jörg Harms, Anat Bashan, Ante Tocilj, Renate Albrecht, Ada Yonath, and François Franceschi. "Structural Basis for the Interaction of Antibiotics with the Peptidyl Transferase Centre in Eubacteria." *Nature* 413, no. 6858 (2001): 814-821.
- Shahriar, Farshid M, Edward G Clark, Eugene Janzen, Keith West, and Gary Wobeser. "Coinfection with Bovine Viral Diarrhea Virus and Mycoplasma Bovis in Feedlot Cattle with Chronic Pneumonia." *The Canadian Veterinary Journal* 43, no. 11 (2002): 863.
- Shimizu, T. "Selective Medium for the Isolation of Mycoplasma Bovis from Nasal Discharges of Pneumonic Calves." *Research in veterinary science* 34, no. 3 (1983): 371-373.
- Simoës, Alexander James Gaspar, and César A Hidalgo. "The Economic Complexity Observatory: An Analytical Tool for Understanding the Dynamics of Economic Development." Paper presented at the Workshops at the twenty-fifth AAAI conference

- on artificial intelligence, (2011).
- Soehnlen, M.K., Aydin, A., Murthy, K.S., Lengerich, E.J., Hattel, A.L., Houser, B.A., Fenton, G.D., Lyszczek, H.R., Burns, C.M., Townsend, A.M., Brooks, J.W., Wolfgang, D.R., Jayarao, B.M., 2012. Epidemiology of *Mycoplasma bovis* in Pennsylvania veal calves. *J. Dairy Sci.* 95, 247–254.
- Songer, JG, and KW Post. "Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease." *Veterinary microbiology. St Louis: Elsevier Saunders* (2005): 84-91.
- Stanbridge, ERIC. "Mycoplasmas and Cell Cultures." *Bacteriological reviews* 35, no. 2 (1971): 206-227.
- Stipkovits L, Ripley P, Varga J, et al. Clinical study of the disease of calves associated with *Mycoplasma bovis* infection. *Acta Vet Hung* 2000;48:387–95.
- Stipkovits L, Ripley PH, Varga J, et al. Use of valnemulin in the control of *Mycoplasma bovis* infection under field conditions. *Vet Rec* (2001);148:399–402.
- Subramaniam, S, D Bergonier, F Poumarat, S Capaul, Y Schlatter, J Nicolet, and J Frey. "Species Identification Of *Mycoplasma Bovis* and *Mycoplasma Agalactiae* based on *ThyVrc* Genes by Pcr." *Molecular and cellular probes* 12, no. 3 (1998): 161-169.
- Sulyok, Kinga M, Zsuzsa Kreizinger, Lilla Fekete, Veronika Hrivnák, Tibor Magyar, Szilárd Jánosi, Nóra Schweitzer, et al. "Antibiotic Susceptibility Profiles of *Mycoplasma Bovis* Strains Isolated from Cattle in Hungary, Central Europe." *BMC veterinary research* 10, no. 1 (2014): 1-8.
- Sulyok, Kinga M., Zsuzsa Kreizinger, Lilla Fekete, Veronika Hrivnák, Tibor Magyar, Szilárd Jánosi, Nóra Schweitzer, et al. "Antibiotic Susceptibility Profiles of *Mycoplasma Bovis* Strains Isolated from Cattle in Hungary, Central Europe." *BMC veterinary research* 10, no. 1 (2014): 1-8 % @ 1746-6148.
- SVA Statens Veterinärmedicinska Anstalt. Mastit orsakad av *Mycoplasma bovis* hos nötkreatur. 7/2/2018. <http://www.sva.se/djurhalsa/notkreatur/endemiska-sjukdomar-notkreatur/mastit-notkreatur/mastit-orsakad-av-mycoplasma-bovis-notkreatur> Date of access: 2/08/2018
- Tambuwal, FM, GO Egwu, A Shittu, GH Sharubutu, MA Umaru, and HU Umar. "Vaccination Coverage and Prevalence of Contagious Bovine Pleuropneumonia (1999-2008) in Two Transboundary States of North-Western Nigeria." *Nigerian Veterinary Journal* 32, no. 3 (2011):169-173.
- Tardy, Florence, Anna Aspan, Tiina Autio, Anne Ridley, Agnès Tricot, Adélie Colin, Tarja Pohjanvirta, et al. "*Mycoplasma Bovis* in Nordic European Countries: Emergence and Dominance of a New Clone." *Pathogens* 9, no. 11 (2020): 1–15.
- Taylor-Robinson, David, and Christiane Bebear. "Antibiotic Susceptibilities of *Mycoplasmas* and Treatment of *Mycoplasmal* Infections." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 40, no. 5 (1997): 622-630.
- Taylor, Jared D, Robert W Fulton, Terry W Lehenbauer, Douglas L Step, and Anthony W Confer. "The Epidemiology of Bovine Respiratory Disease: What Is the Evidence for

- Predisposing Factors?". *The Canadian Veterinary Journal* 51, no. 10 (2010): 1095.
- Thomas, Anne, C Nicolas, Isabelle Dizier, Jacques Mainil, and Annick Linden. "Antibiotic Susceptibilities of Recent Isolates of *Mycoplasma Bovis* in Belgium." *Veterinary Record* 153, no. 14 (2003 a): 428-431.
- Thomas, Anne, Isabelle Dizier, K Sachse, H Ball, Jacques Mainil, and Annick Linden. "Mycoplasma Bovis Dans Le Complexe Respiratoire Bovin Et Propriétés De Cyto-Adhesion in Vitro." Paper presented at the Annales de médecine vétérinaire, (2003b): 267-272.
- Thomas, Anne, Jacques Mainil, and Annick Linden. "*Mycoplasma Bovis*: Synthèse Des Connaissances Actuelles." (2003):23-39.
- Thomas, LH, CJ Howard, EJ Stott, and KR Parsons. "*Mycoplasma Bovis* Infection in Gnotobiotic Calves and Combined Infection with Respiratory Syncytial Virus." *Veterinary Pathology* 23, no. 5 (1986): 571-578.
- Timonen, Anri AE, Jørgen Katholm, Anders Petersen, Kerli Mõtus, and Piret Kalmus. "Within-Herd Prevalence of Intramammary Infection Caused by *Mycoplasma Bovis* and Associations between Cow Udder Health, Milk Yield, and Composition." *Journal of dairy science* 100, no. 8 (2017): 6554-6561.
- Thompson, PN, A Stone, and WA Schultheiss. "Use of Treatment Records and Lung Lesion Scoring to Estimate the Effect of Respiratory Disease on Growth During Early and Late Finishing Periods in South African Feedlot Cattle." *Journal of animal science* 84, no. 2 (2006): 488-498.
- Tortorelli, G, N Carrillo Gaeta, BL Mendonça Ribeiro, L Miranda Marques, J Timenetsky, and L Gregory. "Evaluation of Mollicutes Microorganisms in Respiratory Disease of Cattle and Their Relationship to Clinical Signs." *Journal of veterinary internal medicine* 31, no. 4 (2017): 1215-1220.
- Uemura, Ryoko, Masuo Sueyoshi, and Hiroshi Nagatomo. "Antimicrobial Susceptibilities of Four Species of *Mycoplasma* Isolated in 2008 and 2009 from Cattle in Japan." *Journal of Veterinary Medical Science* (2010): 1661-1663.
- Uhaa IJ, Riemann HP, Thurmond MC, Franti CE. "The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in serological diagnosis of *Mycoplasma bovis* in dairy cattle". *Vet Res Commun.*, (1990), 14 (4), 279-85.
- Vähänikkilä, N, Tarja Pohjanvirta, V Haapala, H Simojoki, T Soveri, GF Browning, Sinika Pelkonen, NK Wawegama, and Tiina Autio. "Characterisation of the Course of *Mycoplasma Bovis* Infection in Naturally Infected Dairy Herds." *Veterinary microbiology* 231 (2019): 107-115.
- Vojinovic D, Vasic A, Zutic J, Djuricic B, Ilic Z, Jovicic D, Elezovic Radovanovic M. "Determination of *Mycoplasma bovis* specific antibodies in blood sera of asymptomatic carriers-calves in three farms in the Republic of Serbia by using indirect ELISA assay." *J Hell Vet Med Soc* 65(2014):779-822.
- Vigimyc, Le reseau d'épidémiologie des Mycoplasmoses des ruminants Anses, RApport d'activité (2020):03-32.

- Waites, Ken B, Inna Lysnyansky, and Cécile M Bébéar. *Emerging Antimicrobial Resistance in Mycoplasmas of Humans and Animals*. Caister Academic Press Norfolk, United Kingdom, (2014): 289-322.
- Wang, Min, Liesel G Schneider, Kristina J Hubbard, and David R Smith. "Cost of Bovine Respiratory Disease in Preweaned Calves on Us Beef Cow–Calf Operations (2011–2015)." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 253, no. 5 (2018): 624-631.
- Wikse SE, Baker JC. The bronchopneumonias. In: BRADFORD P, SMITH. Large Animal Internal Medicine. 2nd edition: 633-648.
- Wisselink HJ, Cornelissen J, van der Wal FJ, Kooi EA, Koene MG, Bossers A, Smid B, de Bree FM, Antonis AFG. Evaluation of a multiplex real-time PCR for detection of four bacterial agents commonly associated with bovine respiratory disease in bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Vet Res*. (2017);13:221.
- Wisselink, Henk J, Bregtje Smid, Jane Plater, Anne Ridley, Anna-Maria Andersson, Anna Aspán, Tarja Pohjanvirta, *et al*. "A European Interlaboratory Trial to Evaluate the Performance of Different Pcr Methods for *Mycoplasma Bovis* Diagnosis." *BMC veterinary research* 15, no. 1 (2019): 1-12.
- Yair, Yael, Ilya Borovok, Inna Mikula, Rama Falk, Larry K. Fox, Uri Gophna, and Inna Lysnyansky. "Genomics-Based Epidemiology of Bovine Mycoplasma Bovis Strains in Israel." *BMC genomics* 21, no. 1 (2020): 1-11 % @ 1471-2164.
- Yamamoto R. "Mycoplasma meleagridis infection", In : B. W. Calnek, C. W. Beard, H. J. Barnes, M. W. Reld and H. W. Yolder, J. R. Eds, Diseases of poultry, 9th ed. Iowa. State. University Press, Ames. Iowa, (1991): p. 212-223.

RAPPORTS ADMINISTRATIFS

- [1] Direction de la Programmation et du Suivi Budgétaire -D.P.S.B. Oum El Bouaghi (2020) : Monographie de la Wilaya de Oum El Bouaghi.
- [2] Direction de la Programmation et du Suivi Budgétaire -D.P.S. B- de la Wilaya de Batna (2020) : Monographie de la Wilaya de Batna.
- [3] Direction de la Programmation et du Suivi Budgétaire -D.P.S. B- de la Wilaya de Biskra (2020) : Monographie de la Wilaya de Biskra.
- [4] Direction de la Programmation et du Suivi Budgétaire -D.P.S. B- de la Wilaya de setif (2020) : Monographie de la Wilaya de Setif.
- [5] Direction de la Programmation et du Suivi Budgétaire -D.P.S. B- de la Wilaya de constantine (2020) : Monographie de la Wilaya de Constantine.
- [6] Direction de la Programmation et du Suivi Budgétaire -D.P.S. B- de la Wilaya de M'sila (2020) : Monographie de la Wilaya de M'sila.
- [7] Direction de la Programmation et du Suivi Budgétaire -D.P.S. B- de la Wilaya de Khenchla (2020) : Monographie de la Wilaya de Khenchla.
- [8] Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural-M.A.D. R- (2020/2021) : Rapport sur la situation du secteur agricole.

Publication

Résumé

Résumé

À ce jour, aucune infection à *Mycoplasma bovis* n'a été signalée chez les veaux en Algérie. Il est important de surveiller sa séroprévalence sur le terrain. La présence d'anticorps spécifiques contre *M. bovis* dans le sérum des veaux est étudiée dans la présente étude. Au total 351 échantillons de sérum de veaux malades et cliniquement sains ont été examinés. Un kit commercial ELISA (ID Screen® ELISA) pour le diagnostic des anticorps de *M. bovis* dans des échantillons de sérum, a été utilisé. Des anticorps spécifiques contre *M. bovis* ont été identifiés dans 241 des 351 échantillons (69%). La séroprévalence observée est la preuve de la présence de *M. bovis* chez les veaux dans différents élevages de l'est Algérien. Le second objectif de la présente étude est de déterminer la présence de *M. bovis* et de caractériser les souches isolées. Des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été recueillis chez 176 veaux malades dans 60 troupeaux pour la détection de *M. bovis* par PCR en temps réel et culture. *M. bovis* a été détecté dans 102 LBA (58%) par rt-PCR et dans 84 cultures (48%). À partir des cultures positives, 53 clones ont été identifiés et sous-typés avec 2 méthodes : le schéma *polC* utilisé en France et la MLST internationale. Une très large diversité génétique a été observée parmi les clones. Aucun sous-type n'était prédominant. De nouveaux allèles et sous-types ont été déterminés, prouvant ainsi la grande diversité de *M. bovis*, en particulier en Algérie. La CMI de 5 antibiotiques a été déterminée sur un panel de 45 clones algériens. La totalité des clones étaient résistants à l'oxytétracycline et intermédiaires au florfénicol, la majorité des clones (32/45) étaient sensibles à la spectinomycine alors qu'elles étaient principalement intermédiaires ou résistantes à la tylosine. La majorité des souches étaient sensibles à l'enrofloxacin (33/45), mais un nombre non négligeable de clones étaient résistants. En conclusion, *M. bovis* circule chez les veaux souffrant de bronchopneumonies en Algérie et montre une diversité génétique et phénotypique plus importante que dans d'autres pays.

Mots clés : Maladies respiratoires bovines, antibiorésistance, Algérie, *Mycoplasma bovis*.

Abstract

To date, no *Mycoplasma bovis* infection has been reported in calves in Algeria. It is important to monitor seroprevalence in the field. The presence of specific antibodies against *M. bovis* in calf serum is investigated in this study. A total of 351 blood serum samples from diseased and clinically healthy calves were examined. A commercial ELISA kit (ID Screen® ELISA) for the diagnosis of *M. bovis* antibodies in blood serum samples was used. Specific antibodies against *M. bovis* were identified in 241 of 351 samples (69%). The seroprevalence revealed is an evidence of the presence of *M. bovis* in calves in various herds in eastern Algeria. The second interest of this study was to determine the presence of *M. bovis* and to characterize the isolated strains. Broncho alveolar lavage fluids (BALF) were collected in 176 diseased calves in 60 herds for the detection of *M. bovis* by real time-PCR and culture. *M. bovis* was detected in 102 BALF (58%) by rt-PCR and in 84 cultures (48%), From the positive cultures, 53 *M. bovis*' clones were identified and characterized. Two subtyping methods were used: the *polC* scheme used in France and the international MLST. A great genetic diversity was observed between clones. There was no predominant subtype. New alleles and new subtypes were defined, proving the large diversity of *M. bovis*, especially in Algeria. The MIC of 5 antimicrobials was determined on a panel of 45 Algerian clones. All the clones were resistant to oxytetracycline and intermediate to florfenicol. The majority of the strains (32/45) were susceptible to spectinomycin while they were mainly intermediate or resistant to tylosin. The majority of strains were susceptible to enrofloxacin (33/45), but a significant number of strains were resistant. In conclusion *M. bovis* circulates in calves suffering from bronchopneumonia in Algeria and shows a greater genetic and phenotypic diversity than elsewhere in the world.

Keywords: Bovine respiratory diseases, antimicrobial resistance, Algeria, *Mycoplasma bovis*.

لحد الآن ، لم يتم الإبلاغ عن أي إصابة بميكوبلازما الأبقار لدى العجول في الجزائر . من المهم مراقبة الانتشار المصلي في هذا المجال . تم في هذه الدراسة التحقق من وجود أجسام مضادة محددة ضد *M. bovis* في مصل العجل . تم فحص 351 عينة مصل من عجول مريضة وصحية سريريًا . تم استخدام مجموعة ELISA التجارية (ID Screen® ELISA) لتشخيص الأجسام المضادة لـ *M. bovis* في عينات المصل . تم تحديد أجسام مضادة محددة ضد *M. bovis* في 241 عينة من 351 (69%). الانتشار المصلي الذي لوحظ هو دليل على وجود *M. bovis* في العجول في مزارع مختلفة في شرق الجزائر .

الهدف الثاني من هذه الدراسة هو تحديد وجود *M. bovis* وتمييز السلالات المعزولة . تم جمع غسيل القصبات الهوائية (BALs) من 176 عجولاً مريضة في 60 قطعاً للكشف عن *M. bovis* عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) في الوقت الحقيقي و الزرع . تم الكشف عن *M. bovis* في 58102 BAL % (بواسطة rt-PCR) وفي 84 مزرعة (48%). من الأوساط الزراعية الموجبة ، تم تحديد 53 استنساخاً وفرزها بطريقتين: مخطط *poIC* المستخدم في فرنسا و MLST الدولي . لوحظ تنوع جيني واسع للغاية بين الحيوانات المستنسخة . لم يكن هناك نوع فرعي سائد .

تم تحديد أليلات وأنواع فرعية جديدة ، مما يثبت التنوع الكبير في *M. bovis* ، خاصة في الجزائر . تم تحديد MIC المكون من 5 مضادات حيوية على لوحة من 45 مستنسخة جزائرية . كانت جميع الحيوانات المستنسخة مقاومة للأوكسيتتراسيكلين والوسيطه للفلورفينيكول ، وكانت غالبية الحيوانات المستنسخة (45/32) حساسة للسبكتينومييسين ، بينما كانت في الأساس نسبياً أو مقاومة للتيلوزين . كانت غالبية السلالات حساسة للإينروفلوكساسين (45/33) ، لكن عدداً كبيراً من الحيوانات المستنسخة كانت مقاومة . في الختام ، ينتشر *M. bovis* في العجول التي تعاني من الالتهاب الرئوي القصبي في الجزائر ويظهر تنوعاً وراثياً وظاهرياً أكبر مما هو عليه في البلدان الأخرى .

الكلمات المفتاحية : أمراض الجهاز التنفسي البقري ، مقاومة المضادات الحيوية ، الجزائر ، الميكوبلازما البقري .

Résumé

À ce jour, aucune infection à *Mycoplasma bovis* n'a été signalée chez les veaux en Algérie. Il est important de surveiller sa séroprévalence sur le terrain. La présence d'anticorps spécifiques contre *M. bovis* dans le sérum des veaux est étudiée dans la présente étude. Au total 351 échantillons de sérum de veaux malades et cliniquement sains ont été examinés. Un kit commercial ELISA (ID Screen® ELISA) pour le diagnostic des anticorps de *M. bovis* dans des échantillons de sérum, a été utilisé. Des anticorps spécifiques contre *M. bovis* ont été identifiés dans 241 des 351 échantillons (69%). La séroprévalence observée est la preuve de la présence de *M. bovis* chez les veaux dans différents élevages de l'est Algérien. Le second objectif de la présente étude est de déterminer la présence de *M. bovis* et de caractériser les souches isolées. Des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été recueillis chez 176 veaux malades dans 60 troupeaux pour la détection de *M. bovis* par PCR en temps réel et culture. *M. bovis* a été détecté dans 102 LBA (58%) par rt-PCR et dans 84 cultures (48%). À partir des cultures positives, 53 clones ont été identifiés et sous-typés avec 2 méthodes : le schéma *polC* utilisé en France et la MLST internationale. Une très large diversité génétique a été observée parmi les clones. Aucun sous-type n'était prédominant. De nouveaux allèles et sous-types ont été déterminés, prouvant ainsi la grande diversité de *M. bovis*, en particulier en Algérie. La CMI de 5 antibiotiques a été déterminée sur un panel de 45 clones algériens. La totalité des clones étaient résistants à l'oxytétracycline et intermédiaires au florfenicol, la majorité des clones (32/45) étaient sensibles à la spectinomycine alors qu'elles étaient principalement intermédiaires ou résistantes à la tylosine. La majorité des souches étaient sensibles à l'enrofloxacin (33/45), mais un nombre non négligeable de clones étaient résistants. En conclusion, *M. bovis* circule chez les veaux souffrant de bronchopneumonies en Algérie et montre une diversité génétique et phénotypique plus importante que dans d'autres pays.

Mots clés : Maladies respiratoires bovines, antibiorésistance, Algérie, *Mycoplasma bovis*.

Abstract

To date, no *Mycoplasma bovis* infection has been reported in calves in Algeria. It is important to monitor seroprevalence in the field. The presence of specific antibodies against *M. bovis* in calf serum is investigated in this study. A total of 351 blood serum samples from diseased and clinically healthy calves were examined. A commercial ELISA kit (ID Screen® ELISA) for the diagnosis of *M. bovis* antibodies in blood serum samples was used. Specific antibodies against *M. bovis* were identified in 241 of 351 samples (69%). The seroprevalence revealed is an evidence of the presence of *M. bovis* in calves in various herds in eastern Algeria. The second interest of this study was to determine the presence of *M. bovis* and to characterize the isolated strains. Broncho alveolar lavage fluids (BALF) were collected in 176 diseased calves in 60 herds for the detection of *M. bovis* by real time-PCR and culture. *M. bovis* was detected in 102 BALF (58%) by rt-PCR and in 84 cultures (48%). From the positive cultures, 53 *M. bovis*' clones were identified and characterized. Two subtyping methods were used: the *polC* scheme used in France and the international MLST. A great genetic diversity was observed between clones. There was no predominant subtype. New alleles and new subtypes were defined, proving the large diversity of *M. bovis*, especially in Algeria. The MIC of 5 antimicrobials was determined on a panel of 45 Algerian clones. All the clones were resistant to oxytetracycline and intermediate to florfenicol. The majority of the strains (32/45) were susceptible to spectinomycin while they were mainly intermediate or resistant to tylosin. The majority of strains were susceptible to enrofloxacin (33/45), but a significant number of strains were resistant. In conclusion *M. bovis* circulates in calves suffering from bronchopneumonia in Algeria and shows a greater genetic and phenotypic diversity than elsewhere in the world.

Keywords: Bovine respiratory diseases, antimicrobial resistance, Algeria, *Mycoplasma bovis*.

ملخص

لحد الآن ، لم يتم الإبلاغ عن أي إصابة بميكوبلازما الأبقار لدى العجول في الجزائر . من المهم مراقبة الانتشار المصلي في هذا المجال . تم في هذه الدراسة التحقق من وجود أجسام مضادة محددة ضد *M. bovis* في مصل العجل . تم فحص 351 عينة مصل من عجول مريضة وصحية سريريًا . تم استخدام مجموعة ELISA التجارية (ID Screen® ELISA) لتشخيص الأجسام المضادة لـ *M. bovis* في عينات المصل . تم تحديد أجسام مضادة محددة ضد *M. bovis* في 241 عينة من 351 (69%). الانتشار المصلي الذي لوحظ هو دليل على وجود *M. bovis* في العجول في مزارع مختلفة في شرق الجزائر . الهدف الثاني من هذه الدراسة هو تحديد وجود *M. bovis* وتمييز السلالات المعزولة . تم جمع غسيل القصبات الهوائية (BALs) من 176 عجولاً مريضة في 60 قطيعاً للكشف عن *M. bovis* عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) في الوقت الحقيقي و الزرع . تم الكشف عن *M. bovis* في 102 BAL (58%) بواسطة rt-PCR وفي 84 مزرعة (48%). من الأوساط الزراعية الموجبة ، تم تحديد 53 استنساخاً وفرزها بطريقتين: مخطط *polC* المستخدم في فرنسا و MLST الدولي . لوحظ تنوع جيني واسع للغاية بين الحيوانات المستنسخة . لم يكن هناك نوع فرعي سائد . تم تحديد أليلات وأنواع فرعية جديدة ، مما يثبت التنوع الكبير في *M. bovis* ، خاصة في الجزائر . تم تحديد MIC المكون من 5 مضادات حيوية على لوحة من 45 مستنسخة جزائرية . كانت جميع الحيوانات المستنسخة مقاومة للأوكسييتتراسيكلين والوسيطه للفلورفينيكول ، وكانت غالبية الحيوانات المستنسخة (45/32) حساسة للسبكتينومييسين ، بينما كانت في الأساس نسبياً أو مقاومة للتيلوزين . كانت غالبية السلالات حساسة للإينروفلوكساسين (45/33) ، لكن عددًا كبيراً من الحيوانات المستنسخة كانت مقاومة . في الختام ، ينتشر *M. bovis* في العجول التي تعاني من الالتهاب الرئوي القصي في الجزائر ويظهر تنوعاً وراثياً وظاهرياً أكبر مما هو عليه في البلدان الأخرى .

الكلمات المفتاحية : أمراض الجهاز التنفسي البقري ، مقاومة المضادات الحيوية ، الجزائر ، الميكوبلازما البقري .