

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET



INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de

**Docteur Vétérinaire**

SOUS LE THÈME

**Physiopathologie des affections bactériennes d'intérêt  
vétérinaire**

**Présenté par** : Mr : Bared tahar

Mr: Abed Meraim housseyn

**Encadrés par** : Dr AHMED MOUSSA

Année universitaire 2018-2019

# Dédicaces

**Au nom de dieu clément et miséricordieux**

**Au prophète de la paix et de la miséricorde.**

**A ceux qui ont fait de moi ce que je suis et qui sont toujours présents pour me soutenir à tout moment.**

**A nos chères mamans**

**A nos chers pères**

**A nos chers grandes mères**

**A nos amis et nos collègues mohamed yacine absi  
abdelkader boutaitel meziane abde rahmene abdelkader**

**kaaboure lakehal abde rahemene nezreg samir nezreg  
kheirdine kaabour AEK ahnou boualam zenati salah**

**haid rachid**

**A toute la famille abed meraim , bared et à nos proches.**

**A tous ceux que nous aimons**

## Remerciements

Je remercie en premier lieu **le grand dieu** de nous avoir aidés à réaliser ce travail.

Louange à vous dieu jusqu'à ce que vous soyez satisfait et louange à vous êtes satisfait.

Je tiens remercier sincèrement Monsieur **Ahmed Moussa**, qui, en tant qu'Encadreur de mémoire, s'est toujours montré à notre écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour l'inspiration.

Je n'oublie pas mes enseignants et enseignantes et tout le personnel de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Tiaret

Un merci spécial à **DERBAL Saïd**.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis qui nous ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	<b>08</b>
<b>Chapitre 1 : physiopathologie des infections bactériennes des intestins (chez le veau)</b> .....	<b>09</b>
1. La contamination par la microflore banale et pathogène chez le veau nouveau-né .....	<b>10</b>
2. Les agents étiologiques des entérites du veau .....	<b>12</b>
2.1. Les colibacilles entéropathogènes .....	<b>12</b>
2.1.1. Généralités sur les colibacilles entéropathogènes .....	<b>12</b>
2.1.2. Facteurs de virulence et modes d'action .....	<b>13</b>
2.1.2.1. Adhésion des E.coli entérotoxinogènes .....	<b>14</b>
2.1.2.2. Mode d'action des bactéries : les entérotoxines .....	<b>15</b>
2.2. Les salmonelles. ....	<b>17</b>
2.2.1. Généralités sur les salmonelles .....	<b>17</b>
2.2.2. Facteurs de virulence et modes d'action .....	<b>18</b>
2.2.2.1. Îlots de pathogénicité de <i>Salmonella</i> .....	<b>18</b>
2.2.2.2. Plasmides de virulence .....	<b>19</b>
2.2.2.3. Survie intracellulaire .....	<b>19</b>
2.2.2.4. Lipopolysaccharides .....	<b>19</b>
2.2.2.5. Fibrilles .....	<b>19</b>
2.2.2.6. Flagelles .....	<b>20</b>
2.3. Clostridium perfringens .....	<b>20</b>
2.3.1. Généralités sur les clostridies .....	<b>20</b>
2.3.2. Facteurs de virulence et modes d'action : les toxines .....	<b>22</b>

## **Chapitre 2 : physiopathologie des infections bactériennes respiratoires**

<b>(chez les ruminants) .....</b>	<b>26</b>
<b>1. Physiopathologie de la tuberculose .....</b>	<b>27</b>
1.1. Généralités sur les mycobactéries .....	27
1.2. Transmission des mycobactéries .....	28
1.2.1. Transmission directe .....	28
1.2.2. Transmission indirecte .....	30
1.3. Conditions de l'infection .....	31
1.3.1. Conditions qualitatives .....	31
1.3.2. Conditions quantitatives .....	33
1.4. Les étapes de l'infection .....	33
1.4.1. Étape primaire ou primo-infection .....	33
1.4.2. Tuberculose secondaire .....	34
1.5. Interactions avec le système immunitaire .....	34
1.5.1. Le développement d'une immunité exclusivement cellulaire .....	34
1.5.2. Le développement de l'hypersensibilité retardée ou hypersensibilité de type IV .....	36
1.5.3. Apparition d'anticorps anti <i>M. bovis</i> .....	37
<b>2. physiopathologie des mycoplasmoses respiratoires .....</b>	<b>37</b>
2.1. Généralités sur les mycoplasmes .....	37
2.2. Transmission des mycoplasmes .....	39
2.3. Interactions avec le système immunitaire .....	40
2.4. Facteurs de virulence et modes d'action .....	41

2.4.1. Etude des facteurs de virulence .....	41
2.4.2. Variabilité antigénique et variabilité de surface .....	42
2.4.3. Adhésion aux surfaces épithéliales .....	43
2.4.4. Invasion de la cellule hôte .....	44
2.4.5. Subversion de la réponse immunitaire .....	44
2.4.6. Production de toxines et de métabolites toxiques .....	45
2.4.7. Perturbations du cycle cellulaire .....	46

### **Chapitre 3 : physiopathologie des infections bactériennes de l'appareil génital**

#### **(chez les ruminants) .....**

1. Physiopathologie de la brucellose .....	48
1.1. Généralités sur Brucella .....	48
1.2. Sources et modes d'infection .....	48
1.3. Facteurs de réceptivité et de sensibilité .....	49
1.4. Les mécanismes de pathogénicité de Brucella .....	49
1.5. Interactions avec le système immunitaire .....	50
1.6. La diffusion de Brucella dans l'organisme .....	51
2. Physiopathologie des mammites .....	52
2.1. Généralités sur les staphylocoques .....	52
2.2. Origine de la contamination .....	52
2.3. Etapes du processus infectieux .....	53
2.3.1. Adhésion de <i>S. aureus</i> aux cellules du tissu mammaire .....	53
2.3.2. Internalisation de <i>S. aureus</i> aux cellules du tissu mammaire .....	54
2.3.3. Vie intracellulaire de <i>S. aureus</i> et persistance intramammaire .....	55
2.3.3.1. Effet cytopathique .....	55

2.3.3.2. Persistance intracellulaire et « Small Colony Variant »..	55
2.3.3.3. Induction de la mort cellulaire .....	56
2.4. Les facteurs de virulence et modes d'action .....	56
2.4.1. Les MSCRAMMs : « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules » .....	57
2.4.2. Les SERAMs : « Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules » .....	57
2.4.3. Les toxines .....	58
2.4.4. Les entérotoxines .....	58
2.5. Interactions avec le système immunitaire .....	58
<b>Bibliographique .....</b>	<b>61</b>

## INTRODUCTION

Les bactéries sont de répartition mondiale et ne cessent de progresser. Elles constituent aujourd'hui, dans les pays en voie de développement dont l'Algérie, la première cause des problèmes sanitaires chez l'homme et chez l'animal : les bactéries font donc l'objet d'une étude approfondie sur la physiopathologie des infections induites par ces agents infectieux.

Au sein du vaste problème posé par ces bactéries à la fois dans les différentes productions animales et pour la santé publique, les ruminants occupent une position particulière dans la mesure où ils sont eux-mêmes victimes d'infections bactériennes cliniquement graves et économiquement lourdes.

Chez les ruminants, ces infections bactériennes se caractérisent par une grande diversité dans la physiopathologie : on parle de la physiopathologie des maladies infectieuses bactériennes chez les ruminants.

Compte tenu de la gravité de l'infection tant sur le plan vétérinaire que du point de vue hygiénique, la connaissance des conséquences fonctionnelles sur les différents organes de l'être vivant doivent être pris pour établir le meilleur traitement.

Ainsi, il nous a semblé intéressant de faire le point sur la situation immunitaire et clinique de l'être vivant et la situation épidémiologique de ces bactéries. Mon travail décrit tout d'abord les connaissances actuelles en terme de bactériologie et de pathogénie. Puis, les multiples aspects cliniques seront abordés. L'étude de l'épidémiologie de ces bactéries nous permettra de conclure les moyens de lutte les plus efficaces.

# **Chapitre 01 :**

## **Physiopathologie des infections bactériennes des intestins (Chez le veau)**

## 1. La contamination par la microflore banale et pathogène chez le veau nouveau-né

Le nouveau-né, dont le tube digestif est stérile et dépourvu d'immunité à la naissance, a de grandes chances de ne pouvoir résister à l'agression des bactéries pathogènes. Mis en présence de plusieurs écosystèmes bactériens différents tels que le vagin et les fèces de la mère puis le sol et l'atmosphère, il doit établir très rapidement un système de défense contre cet environnement hostile. La microflore digestive, associée à l'immunité colostrale, va jouer dans ce domaine un rôle capital.[01]

La microflore digestive va ainsi se développer très rapidement dans le tube digestif du nouveau-né et on peut affirmer que, dans les 24 heures au plus qui suivent la naissance, le nombre total de bactéries aura atteint sa valeur maximale ( $10^9 - 10^{10}$ /g de fèces) qui restera constante tout au long de la vie de l'individu.

Par ailleurs, la colonisation du tube digestif se fait nullement au hasard. Elle résulte au contraire d'une très ancienne et très étroite adaptation des espèces bactériennes aux différentes niches du tube digestif, l'hôte nouveau-né étant à même d'effectuer directement ou indirectement un tri parmi les espèces qui se présentent.

Parmi les bactéries qui contaminent le nouveau-né, certaines seront incapables de s'implanter et les premières espèces qui s'établissent ne sont pas nécessairement celles qui sont les plus abondantes dans les différents écosystèmes rencontrés puisque certaines seront définitivement éliminées par d'autres qui se présenteront plus tard.

Alexander [02] considère d'ailleurs que, pour pouvoir coloniser le tube digestif, les espèces bactériennes doivent être autochtones, c'est à dire à même de se développer, s'implanter dès la naissance, être toujours présentes chez les adultes normaux, coloniser des zones particulières du tube digestif, rester stable chez l'adulte ; enfin être intimement associées à l'épithélium.

A l'opposé, on doit considérer que les bactéries pathogènes sont des allochtones puisqu'elles ne s'implantent pas dès la naissance et qu'elles ne sont présentes dans le tube digestif qu'à l'occasion d'événements anormaux et pour une durée limitée.

L'hôte agit sur l'équilibre de la microflore microbienne qu'il héberge grâce à un certain nombre de mécanismes. Le péristaltisme, la température, le potentiel d'oxydo-réduction, les sécrétions digestives exercent en effet une influence déterminante. Un dérèglement de ces mécanismes pourrait alors accompagner un accroissement important de certaines bactéries de la microflore dans un des compartiments donnés du tube digestif et provoquer ainsi un déséquilibre ou l'apparition de bactéries pathogènes. On peut en effet voir ce phénomène lors d'hypomotricité de l'intestin grêle chez le veau atteint de diarrhée avec l'apparition des *Escherichia coli* pathogènes.

En fait, on peut voir différents types d'infestation du tractus digestif du jeune veau dus à des bactéries :

- les salmonelloses, induites par *Salmonella dublin* et *Salmonella typhimurium*, atteignant des veaux souvent âgés de plus de trois semaines, et provoquant des septicémies rapidement mortelles. Les agents pathogènes sont des bactéries à Gram négatif, non sporulée. Ce sont des parasites intracellulaires facultatifs,
- les entérotoxémies, provoquées par *Clostridium perfringens*,
- les colibacilloses, dues à *Escherichia coli*, bactérie gram négatif.

Si la prévalence des *Escherichia coli* dans les diarrhées néonatales des veaux est basse [03], les colibacilloses représentent encore une des principales causes de pertes économiques de l'élevage chez les jeunes veaux.

L'étude se portera donc principalement sur cet agent bactérien, cependant, il est quand même important de souligner certains détails :

- tout d'abord, contrairement à des espèces fortement pathogènes comme *Salmonella*, la pathogénicité d'*Escherichia coli* ne peut être liée à sa seule présence dans l'intestin du veau malade puisqu'*Escherichia coli* est un hôte normal du côlon et du cæcum, s'implantant dès la naissance chez le jeune. Smith[04], Contrepois et Gouet [05], en suivant l'évolution des genres bactériens dominants (*E. coli*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*) chez des veaux sains âgés de quelques heures à une douzaine de jours, ont en effet montré qu'*E. coli* apparaît chez l'animal âgé de 8 heures et que c'est à 24 heures que les dénombrements sont les plus élevés ; dans la caillette, le duodénum et le jéjunum, ils peuvent être absents ou ne dépassent généralement pas quelques milliers par gramme. Ils apparaissent nettement à partir de l'iléon ( $10^4$ - $10^8$ /g) et c'est dans le cæcum et le côlon qu'ils atteignent  $10^9$ /g et parfois plus.

Au plan qualitatif, il s'avère en premier lieu que les souches d'*E. coli* isolées des veaux sains (*E. coli* saprophytes) possèdent des caractères tout à fait différents de ceux des veaux malades (*E. coli* pathogènes), ce qui sera étudié plus précisément plus loin dans cet exposé ;

- d'autre part, comparativement aux animaux sains, la microflore des veaux atteints de diarrhée se caractérise par une augmentation générale du nombre de bactéries anaérobies facultatives, principalement des *E. coli* mais également des streptocoques et des lactobacilles. Cette augmentation est particulièrement prononcée dans la caillette et l'intestin grêle puis s'estompe dans le cæcum et les fèces où la population bactérienne, y compris *E. coli*, est normalement élevée.

## **2. Les agents étiologiques des entérites du veau**

### **2.1. Les colibacilles entéropathogènes**

#### **2.1.1. Généralités sur les colibacilles entéropathogènes**

Les colibacilles sont décrits très tôt, en 1885, par Théodor Escherich sous le vocable de *Bacterium coli commune* qui deviendra plus tard *Escherichia coli*. De nombreuses classifications sont proposées, les unes se rapportant aux symptômes, les autres aux lésions ou aux toxines. [06] propose un schéma de classification reposant sur les différents facteurs de virulence.

Parmi les *E. coli* dont l'intervention dans les entérites néonatales des veaux a été démontrée, on peut distinguer :

- les *E. coli* entérotoxigènes ou ETEC qui possèdent des adhésines (de nature protéique) grâce auxquelles les bactéries colonisent l'intestin, et produisent des entérotoxines.
- les *E. coli* vérotoxigènes ou VTEC qui produisent une ou des vérotoxines ou shiga liketoxines et possèdent des adhésines qui ne sont, à l'heure actuelle, pas encore bien définies et le gène "eae" responsable de l'attachement aux microvillosités des entérocytes et de leur effacement.
- les *E. coli* CNF 1 et CNF 2 qui produisent une cytotoxine nécrosante respectivement de type 1 ou 2 (CNF pour Cytotoxic Necrotizing Factor). Ces bactéries produisent également une aérobactine et résistent à l'action du complément ou aux effets antibactériens du sérum.

D'autres catégories d'*E. coli* (*E. coli* entéropathogènes EPEC, *E. coli* entéro-invasives EIEC, *E. coli* septicémique) sont envisagées par POHL mais soit ces bactéries ne disposent pas de pouvoir entéropathogène dans l'espèce bovine, soit elles sont associées à d'autres entités pathologiques.

La classification décrite ci-dessus ne tient pas compte de la complexité de certaines souches qui possèdent une mosaïque de facteurs de virulence. Par exemple on observe chez les veaux des colibacilles qui simultanément produisent la toxine CNF 2, l'entérotoxine LT IIa, une adhésine fonctionnelle de type F17, sécrètent une aérobactine et résistent au sérum .

*Escherichia coli* est un bacille Gram négatif, non encapsulé et mobile par ciliature péritriche.

### **2.1.2. Facteurs de virulence et modes d'action**

La colibacillose recouvre deux grands syndromes : un syndrome diarrhéique avec déshydratation (entérototoxicose colibacillaire) provoqué par les colibacilles « entérotoxinogènes » (E.C.E.T.) et un syndrome septicémique (septicémie colibacillaire) provoqué lui par les colibacilles « invasifs ». Cet exposé développera uniquement le syndrome diarrhéique.

ont permis de comprendre la cause du pouvoir pathogène de ces bactéries entérotoxinogènes. Ils ont en effet d'abord établi chez le porc, puis chez le veau, qu'un colibacille doit posséder deux caractéristiques fondamentales pour être pathogènes :

- posséder des antigènes capsulaires lui permettant de se fixer à la paroi intestinale ;
- posséder la capacité de sécréter une ou plusieurs entérotoxines, c'est à dire des exotoxines[07] capables de stimuler fortement la sécrétion des cellules intestinales, donc de produire le liquide diarrhéique.

Les informations génétiques codant pour les antigènes capsulaires et les toxines sont portées par des plasmides[08].

### 2.1.2.1. Adhésion des *E.coli* entérotoxigènes

En général, les épithéliums en contact avec une microflore sont équipés de mécanismes de défense efficaces contre la colonisation de leur surface par les bactéries : cils vibratiles, synthèse de mucus, flux liquides débarrassent, dans la plupart des cas, les surfaces épithéliales des micro-organismes du milieu. La manifestation du pouvoir pathogène des *E. coli* nécessite leur attachement à la surface des entérocytes. Ainsi, les E.C.E.T. possèdent une structure d'attachement leur permettant d'adhérer aux membranes cellulaires des entérocytes sans être gênées par la couche de mucus[10].

Il a été décrit pour les E.C.E.T. bovins trois adhésines différentes, représentant chacune une structure particulière des enveloppes bactériennes (*pili*). Ces différentes structures peuvent coexister chez un même E.C.E.T.

Les études de l'attachement *in vitro* [11] ont présenté l'antigène K99 en microscopie électronique comme un fin filament protéique. Le diamètre des fibres a pu être estimé à 3 nm, alors que la longueur dépasse largement les dimensions de la bactérie, soit 2 à 3000 nm.

Quand à l'antigène FY, il se rapproche en microscopie électronique de l'Ag K99, bien plus dense avec formation de gros paquets de fibres par auto-agglutination.

Il faut souligner que l'étude des structures à très haut poids moléculaire (plusieurs millions) présente de nombreuses difficultés techniques liées à l'instabilité de ces extraits, celle-ci étant à l'origine des contradictions observées entre les différentes équipes étudiant les propriétés de l'antigène K99.

Suite à leur étude *in vitro* et après extraction et purification, ont obtenu un antigène K99 cationique avec un pH iso-électrique compris entre 10 et 10,2, caractéristique intéressante pouvant jouer un rôle dans le déroulement de l'attachement. En effet, à pH physiologique du tube digestif (6,5 à 7), l'antigène K99 présente une forte charge positive susceptible d'être attirée par les charges négatives des mucopolysaccharides du mucus couvrant l'épithélium intestinal. Ils ont confirmé cette hypothèse par la sensibilité au pH de l'attachement *in vitro* sur villosité intestinale de lapin et de veau.

Par ailleurs, ont pu mettre en évidence une inhibition de l'attachement de souches Y par la N-acétyl glucosamine sur des villosités de veau. Une inhibition par la lectine de blé est également montrée, celle ci est due à la reconnaissance de l'antigène Y avec une structure stéréospécifique de nature protéique sur le site récepteur ; pour cette raison, certains auteurs associent ce type d'antigène d'attachement à des lectines spécifiques de sites récepteurs glucosidiques. Ainsi, il y a fixation entre les pili et le glycosalyx (« fuzz ») avec mise en jeu de récepteurs saccharidiques ou peptidiques.

Toutes ces structures d'attachement vont donc permettre aux colibacilles de couvrir la surface épithéliale intestinale, de s'y fixer et de s'y multiplier activement sans être entraînés par le transit intestinal. Les bactéries vont ainsi pouvoir manifester leur pouvoir pathogène ; l'attachement permettant en effet de délimiter un espace confiné dans lequel la toxine est libérée de sorte qu'elle va, sans dilution dans le milieu intestinal, se lier directement à des récepteurs membranaires des entérocytes.

#### **2.1.2.2. Mode d'action des bactéries : les entérotoxines**

*E. coli* synthétisent des toxines.

Certaines sont des endotoxines : substances faisant parties de la paroi des bactéries et libérées lors de leur lyse. Les réactions qu'elles provoquent sont très variables selon les espèces et l'individu [12]. Ces endotoxines pourraient jouer un rôle dans la diarrhée néonatale des veaux non pas en tant que responsable de la sécrétion des fluides par l'intestin, mais en induisant des perturbations circulatoires et métaboliques générales.

D'autres, les exotoxines sont des substances élaborées par les bactéries pendant leur croissance [13] que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Leur libération ne dépend pas de la lyse des bactéries mais est le fait d'une diffusion ou d'un transport au travers de la paroi bactérienne.

Dans le mécanisme de la diarrhée des veaux, ce sont en fait les exotoxines à tropisme intestinal : les entérotoxines qui jouent un rôle important. Chez certaines bactéries, il existe deux entérotoxines : l'une thermolabile (TL) qui agit par l'intermédiaire de l'AMPc comme la toxine du choléra, l'autre thermostable (TS) qui ne fait pas intervenir l'AMPc.

Chez *Escherichia coli* entérotoxigène bovin, seule l'entérotoxine thermostable (Sta) est rencontrée [14]. ont démontré que l'entérotoxine thermostable est responsable de l'ensemble des symptômes observés chez le veau diarrhéique. En effet, on a pu voir la même évolution clinique (mort en 24 - 48 heures en état de déshydratation) après administration de  $10^{10}$  *E. coli* entérotoxigène (K99+, TS+) et par perfusion directe de la toxine Ts dans l'intestin du veau. Ainsi, la souche la plus virulente connu de nos jours des E.T.E.C. chez le veau est la souche (K99) ST [15].

En fait, les entérotoxines induisent une sécrétion nette d'eau et d'électrolytes (sodium, chlorure et potassium) vers la lumière intestinale, après contact avec la muqueuse intestinale par un mécanisme indépendant des lésions cellulaires structurales. [16] a en effet montré que ces pertes étaient les plus importantes dans la partie distale de l'intestin grêle.

La réponse aux exotoxines est locale ; ces substances n'agissant que dans les segments inoculés et non dans les segments adjacents. Des résultats expérimentaux convergents font penser que la toxine thermostable (TS) active un système enzymatique qui provoque l'augmentation de la guanosine monophosphate cyclique dans les cellules de la muqueuse, et ensuite induit la sécrétion d'eau et d'ions  $\text{HCO}_3^-$ . Par ailleurs, la toxine pourrait agir comme un sécrétagogue, lequel se liant à la bordure en brosse des cellules épithéliales, entraîne une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur des cellules. A partir d'une certaine concentration, le  $\text{Ca}^{2+}$  forme un complexe avec la calmoduline ou « calcium-dependent-regulator » [17]. Le complexe activé qui en résulte stimule les protéines kinases qui activent les transports membranaires d'eau et d'ions. En fait, on peut voir une fuite de NaCl au niveau des espaces intercellulaires d'où la sécrétion. Ces mécanismes n'altèrent pas la muqueuse elle-même, mais entraînent un « dys-métabolisme hydrominéral » éventuellement mortel [18].

Par ailleurs, dans ces diarrhées, la perte d'eau et d'électrolytes est due à un processus sécrétoire sans modification apparente de l'absorption. Ainsi, certains substrats pourraient toujours permettre l'augmentation de l'absorption. En fait, a montré que bien qu'il y ait une réduction apparente de l'absorption du glucose et de la glycine lors de ces diarrhées, celle-ci est relativement faible, et n'est dans aucun cas statistiquement significative. Cette absorption du glucose et de la glycine chez ces veaux diarrhéiques justifie l'utilisation, pour la réhydratation par voie orale, de solutions contenant ces substrats, puisque leur absorption s'accompagne

d'une absorption de sodium et d'eau, ce qui permettra de compenser ou sinon d'abolir les pertes nettes d'eau et d'électrolytes engendrées par les toxines [19] .

## 2.2. Les salmonelles

### 2.2.1. Généralités sur les salmonelles

WHITE en 1925 et KAUFFMANN à partir de 1930 établirent un système de classification basé sur l'identification antigénique des Salmonelles. Dans les années cinquante, une centaine de sérovars était déjà connue. Aujourd'hui, il est démontré que le genre *Salmonella* comprend 3 espèces [20] :

- *Salmonella enterica* composée de 6 sous-espèces : [21]

I- *Salmonella enterica* subsp *enterica*

II- *Salmonella enterica* subsp *salamae*

IIIa- *Salmonella enterica* subsp *arizonae*

IIIb- *Salmonella enterica* subsp *diarizonae*

IV- *Salmonella enterica* subsp *hautenae*

VI- *Salmonella enterica* subsp *indica*

99.8% des souches isolées appartiennent à la sous-espèce I.

- *Salmonella bongori* qui correspond à l'ancienne sous-espèce V bongori de *S. enterica*.

- *Salmonella subterranea*

Les sous-espèces sont subdivisées en sérovars ou sérotypes dont la liste constitue le schéma de KAUFFMANN-WHITE.

D'après cette nomenclature, les noms de sérovars qui nous sont familiers ne sont plus des noms d'espèces mais des surnoms : ils ne doivent donc pas être écrits en italique. La nomenclature du sérovar Typhimurium conforme au code international est *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser. Typhimurium.

Comme le propose , nous conserverons les noms uniquement pour les sérovars de la sous-espèce I et nous les écrirons avec une majuscule et en caractère romain. Par exemple, *S.* sérovar Typhimurium sera noté *S.* Typhimurium.

Les salmonelles sont des bacilles Gram négatif, intracellulaires facultatifs, de dimensions moyennes (0.8 mm de large sur 3.5 mm de long), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche. Quelques sérovars sont cependant immobiles comme *S. Gallinarum-Pullorum* ainsi que certains mutants.

### **2.2.2. Facteurs de virulence et modes d'action**

Plusieurs facteurs de virulence ont été identifiés pour les salmonelles. Les plus importants seront brièvement décrits ci-dessous.

#### **2.2.2.1. Îlots de pathogénicité de *Salmonella***

Les îlots génomiques sont des zones du chromosome bactérien possédant des caractéristiques différentes du reste du génome. Certains îlots génomiques ne codent pour aucun phénotype connu, mais la plupart d'entre eux codent pour des informations biochimiques ou des facteurs de pathogénicité (îlots de pathogénicité). Par définition, les îlots de pathogénicité sont porteurs de gènes qui codent pour des facteurs de pathogénicité.

Ils ont été décrits dans de nombreuses espèces bactériennes à Gram négatif, mais aussi dans certaines espèces de bactéries à Gram positif [22]. Les déterminants de pathogénicité et de virulence bactériennes qui peuvent être trouvés dans les îlots de pathogénicité incluent le système de sécrétion de type III, les superantigènes, les facteurs de colonisation, le système d'absorption de fer et les entérotoxines [23].

Cinq îlots de pathogénicité ont été identifiées chez *S. Typhimurium* et *S. Typhi* et sont désignés comme îlots de pathogénicité chromosomiques de *Salmonella* (*Salmonella Pathogenicity Islands* ou SPI). SPI-1 est présent chez toutes les salmonelles et il est nécessaire pour l'invasion intestinale mais pas pour l'infection systémique. Il favorise aussi l'inflammation et est important dans l'induction de la diarrhée. La fonction de SPI-2 est essentielle pour la survie dans les macrophages, ce qui conduit à la capacité des bactéries de causer des infections systémiques et de proliférer dans les organes de l'hôte. SPI-3 permet à *Salmonella* de croître dans des conditions limitées en Mg<sup>2+</sup>, ce qui est également important pour la survie dans les macrophages. Quant à SPI-4, il pourrait jouer un rôle dans l'invasion mais son rôle dans la virulence de *Salmonella* n'a pas été étudié en détails. Enfin, SPI-5 est requis lors de salmonellose entérique mais pas systémique [24].

#### **2.2.2.2. Plasmides de virulence**

La plupart des sérotypes spécifiques à l'hôte et quelques autres moins spécifiques (Dublin, Pullorum, Gallinarum, Choleraesuis, Abortusbovis et quelques souches de Typhimurium et Enteritidis) portent des plasmides de virulence qui codent pour les gènes nécessaires à la capacité de provoquer la maladie systémique. Bizarrement, *S. Typhi* ne possède pas un tel plasmide .

#### **2.2.2.3. Survie intracellulaire**

La capacité de survivre dans le compartiment phagosomal des macrophages est indispensable pour l'établissement de *Salmonella* dans l'intestin et dans les organes systémiques. Sa survie exige que *Salmonella* résiste à la fois aux mécanismes de phagocytose dépendants et indépendants de l'oxygène. De nombreux mécanismes permettent à la bactérie de survivre dans cet environnement hostile: changement de la composition des lipopolysaccharides (LPS) et de la membrane externe afin que celle-ci devienne moins perméable et plus résistante aux peptides antimicrobiens, différentes enzymes (catalases, superoxyde dismutases, glutathion réductase) permettant de se protéger des divers oxydants lysosomiaux et expression des gènes codant pour entre autres pour SPI-2 et jusqu'à 60 autres gènes .

#### **2.2.2.4. Lipopolysaccharides**

Les LPS de *Salmonella* sont un composant majeur de la membrane externe de la bactérie et agissent comme une toxine importante, qui interagit avec le système immunitaire de l'hôte pour débiter l'inflammation et produire un choc septique, de la fièvre et éventuellement la mort. Les LPS les plus externes portent les polysaccharides O, hautement antigéniques.

#### **2.2.2.5. Fibrilles**

Pour établir une infection, *Salmonella* doit coloniser le tractus intestinal de l'hôte. Il a été démontré *in vitro* que *Salmonella* peut utiliser différentes flagelles afin d'adhérer à différents types de cellules. De plus, la perte de deux opérons fibrillaires (*lpf* et *pef*) qui sont utilisés pour l'adhérence aux plaques de Peyer ainsi qu'aux villosités intestinales, diminue la capacité de *Salmonella* d'y adhérer .

### 2.2.2.6. Flagelles

Le rôle des flagelles dans la virulence des salmonelles n'est pas clair, et il y aurait des différences entre les infections systémiques et intestinales. La plupart des salmonelles pathogènes sont biphasiques et peuvent alterner entre deux types de flagelles, ce qui leur permettrait de se soustraire au système immunitaire de l'hôte .

## 2.3. Clostridium perfringens

### 2.3.1. Généralités sur les clostridies

Le genre *Clostridium* est considéré comme l'un des plus riche dans le monde bactérien [25]. On recense en effet plus de 150 espèces de *Clostridium* parmi lesquelles un nombre limité est retrouvé dans les prélèvements biologiques et est à l'origine de pathologie chez l'homme et les animaux ; [26] en dénombraient moins d'une vingtaine au début des années 90.

Le séquençage des gènes codant l'ARN ribosomal 16s par méthode PCR a permis à [27] de confirmer l'extrême hétérogénéité du genre.

Initialement décrit en 1880 par [28] les *Clostridium* spp. sont des bacilles sporulés, anaérobies stricts voire aéro-tolérants pour certaines espèces, apparaissant habituellement Gram positif et généralement mobiles.

La tolérance à l'oxygène varie selon les espèces de *Clostridium* [29] ; certaines d'entre elles sont anaérobies très strictes tel *C. novyi* ou *C. haemolyticum* alors que d'autres sont aérotoleérantes tel *C. tertium* et *C. histolyticum* ; de nombreuses espèces ont des exigences intermédiaires.

Certaines espèces ne sporulent que très difficilement comme *Clostridium ramosum* . La coloration de Gram est le plus souvent positive mais il existe de rares exceptions, certaines espèces pouvant apparaître Gram négatif ou variable (*C. clostridioforme*, *C. symbiosum* ou *C. ramosum*).

Certains auteurs proposent de séparer les *Clostridium* spp. en deux groupes de signification clinique différente [30]. Le premier comporte des espèces telluriques qui pénètrent accidentellement dans l'organisme et sécrètent des exotoxines responsables de la pathogénicité.

Le deuxième regroupe les autres *Clostridium* spp. qui appartiennent à la flore endogène et peuvent engendrer des infections souvent mixtes en association avec d'autres anaérobies voire avec des bactéries anaérobies facultatives.

Cette classification a cependant des limites puisque l'on peut mettre en évidence dans certains prélèvements des espèces de *Clostridium* non toxigènes d'origine exogène et qu'il existe des espèces de *Clostridium* toxigènes dans le tube digestif; c'est le cas par exemple de *Clostridium perfringens* et *Clostridium difficile* qui sont tous deux sécréteurs de toxines et survivent dans l'environnement sous forme sporulée mais peuvent aussi se multiplier dans le tube digestif.

Les *Clostridium* spp. sont des bacilles fins (0,2 à 0,6 µm) ou épais (1-2 µm), de longueur variable, à extrémité carrées, arrondies ou en fuseau ; certaines espèces peuvent être coccoïdes ou filamenteuses (*Clostridium septicum*) [31].

Ils forment des spores ovoïdes ou sphériques, en position subterminale ou terminale souvent déformantes comme *Clostridium tetani*. Ces spores sont à l'origine de la thermotolérance des *Clostridium* spp. Certains *Clostridium* spp. ne sporulent que très difficilement comme *Clostridium ramosum*. Les spores entièrement constituées sont très réfringentes. Elles peuvent être sélectionnées après traitement de l'isolat par la chaleur (10 minutes à 80°C) puis inoculation de milieux solides ou liquides avec l'isolat chauffé ; seules les cultures contenant des spores permettront le développement des bactéries après chauffage.

La majorité des *Clostridium* spp. sont mobiles, du fait d'une ciliature péritriche ; cette mobilité est inhibée au contact de l'air. Elle doit être recherchée à partir de cultures en phase exponentielle de croissance [32]. Certaines espèces comme *Clostridium perfringens*, *C. innocuum*, *C. ramosum* sont immobiles.

Certains *Clostridium* spp. dont *Clostridium perfringens* possèdent une capsule. La plupart des espèces prennent bien la coloration de Gram sauf quelques exceptions (*C. symbiosum*, *C. clostridioforme*, *C. ramosum*.. ).

### 2.3.2. Facteurs de virulence et modes d'action : les toxines

Parmi tout l'éventail de toxines produites par *C. perfringens*, la toxine  $\alpha$  est l'une des plus importantes. Le gène codant pour cette toxine, *cpa*, est présent dans tous les toxinotypes, ce qui rend cette toxine très prévalente [33]. Par contre, ce ne sont pas toutes les souches qui produisent la toxine  $\alpha$  même si le gène correspondant est présent [34]. Cette toxine a une activité enzymatique par l'entremise de la phospholipase C et de la sphingomyélinase [35].

Ainsi, elle hydrolyse les phospholipides des membranes cellulaires et la lécithine pour causer la mort des cellules affectées [36]. L'activité biologique de cette toxine est cytolytique, hémolytique, dermonécrotique et létale . De plus, l'hydrolyse de la lécithine conduit à la relâche de médiateurs inflammatoires comme les leukotriènes, le thromboxane, le facteur d'activation des plaquettes et la prostacycline [37]. Il en résulte une vasoconstriction, une augmentation de la perméabilité vasculaire, une agrégation plaquettaire et une dysfonction du myocarde. Ces effets peuvent conduire à un choc et même à la mort de l'animal. La toxine  $\alpha$  a longtemps été identifiée comme celle induisant les lésions d'entérite nécrotique chez la volaille. Par contre, une lignée de mutants dont le gène *cpa* a été inactivé et ne produisant pas la toxine  $\alpha$  s'est montrée capable d'induire les mêmes lésions par rapport à la souche originale produisant cette toxine [38]. Son implication dans la pathogénie de la maladie a ainsi été fortement remise en doute et d'autres facteurs comme la toxine NetB pourraient être à l'origine des lésions observées [39]. Finalement, la toxine alpha provoque la gangrène gazeuse chez de nombreuses espèces, dont l'humain .

La toxine  $\beta$  est produite par les toxinotypes B et C de *C. perfringens*. Elle est une composante majeure des entérites nécro-hémorragiques produites par le toxinotype C chez les humains et les animaux [40]. Elle crée des pores sélectifs pour les cations monovalents dans les membranes cellulaires et cela cause un dérèglement de l'équilibre électrolytique normal [41]. Il en résulte la mort rapide des cellules en induisant une nécrose de celles-ci .

Elle peut cibler les cellules endothéliales du système vasculaire car la toxine a été localisée dans l'endothélium des vaisseaux sanguins de lésions d'entérite chez les porcelets et les humains . De plus, un rapport de cas de «enteritis necroticans» chez un adulte japonais diabétique et un enfant diabétique montre grâce à la technique d'immunohistochimie que la toxine  $\beta$  était présente en grande quantité dans les lésions histologiques où des bâtonnets à Gram-positif étaient retrouvés dans un segment d'intestin nécrosé [42]. Un autre rapport de cas de cette maladie a identifié les gènes alpha et bêta, présents chez *C. perfringens* de type C, dans un segment d'intestin nécrotique réséqué d'un enfant diabétique [43].

La toxine  $\beta_2$ , découverte en 1997 [44], peut être identifiée dans le tractus gastro-intestinal de toutes les espèces domestiques et sauvages. Le gène relié à la toxine, *cpb2*, est souvent présent lors de problèmes entériques. Chez les porcelets, sa présence est fortement en corrélation avec des épisodes de diarrhées [45]. Dans ces cas, *C. perfringens* de type A ou C sont majoritairement porteurs du gène *cpb2*. Chez la volaille, *cpb2* est occasionnellement retrouvé dans les isolats de *C. perfringens* provenant des fèces, des coquilles, du duvet ou des carcasses. Il est cependant présent en même proportion chez des oiseaux en santé et chez des animaux atteints d'entérite nécrotique [46]. De ce fait, il a été proposé que la toxine  $\beta_2$  n'ait pas un rôle prépondérant dans la pathogénie de l'entérite nécrotique. Le mode d'action de cette toxine est mal défini à ce jour, mais elle aurait les mêmes effets cytotoxiques que la toxine  $\beta$ . La toxine  $\beta_2$  a d'ailleurs été découverte suite à l'identification d'une protéine de poids moléculaire différent de la toxine  $\beta$ , mais qui induisait les mêmes signes que cette dernière . Par contre, elle possède moins de 15% d'homologie avec la toxine  $\beta$  (Li, *et al.*, 2013).

La toxine  $\epsilon$  (ETX) est produite par les toxinotypes B et D. Elle est une toxine très potente, c'est-à-dire qu'une très petite dose peut être létale . En effet, une dose de 70 ng/kg est mortelle par injection intrapéritonéale chez la souris [47]. Par comparaison, la toxine botulinique, aussi considérée très puissante, a une dose létale de 1.2 ng/kg par injection intrapéritonéale chez la souris. La toxine  $\epsilon$  est même sur la liste des agents et des maladies de bioterrorisme du gouvernement américain, classée dans la catégorie B [48]. Elle est ainsi considérée modérément facile à disséminer, causant une morbidité modérée et une faible mortalité dans la population et elle demande un diagnostic et une surveillance accrue par les instances gouvernementales. La toxine est cytotoxique pour les cellules. Elle forme des pores dans la membrane vasculaire, créant ainsi un efflux de  $K^+$  et un influx de  $Na^+$  et de  $Cl^-$  [49]. Il en résulte un gonflement de la cellule et sa mort. ETX est reconnue pour causer de l'œdème et

la nécrose dans plusieurs organes à la suite d'une entérotoxémie [50]. C'est d'ailleurs ce qui se produit dans la maladie du rein pulpeux chez l'agneau. Ces effets conduisent au choc et ultimement à la mort de l'animal ou de l'humain affecté. La progression de l'entérotoxémie peut être très rapide, allant d'une mort en quelques minutes à quelques heures.

*C. perfringens* de type E est le seul toxinotype à produire la toxine  $\iota$ . Elle fait partie de la famille des toxines binaires, c'est-à-dire qu'elle comporte deux sous-unités nécessaires pour exercer sa toxicité. La sous-unité Ia est la composante enzymatique alors que la sous-unité Ib est la composante permettant l'attachement à la cellule cible. Ia est une NAD<sup>+</sup>-glycohydrolase (NADase) et une ADP-ribosyltransférase (ARTase) [51]. Son effet est de ribolysier l'actine des cellules pour la dépolymériser. Cela provoque une désorganisation des filaments d'actine et par conséquent, il y a perte de la forme de la cellule par destruction du cytosquelette [52]. Ib s'attache aux cellules et forme un pore heptamérique. Cela permet l'efflux de K<sup>+</sup> et l'influx de Na<sup>+</sup>, en plus de permettre l'entrée de la sous-unité Ia dans la cellule. Cliniquement, la toxine est létale, dermonécrotique, cytotoxique, entérotoxique et elle produit des dommages intestinaux visibles en histopathologie. La toxine montre un fort potentiel pour délivrer des composés peptidiques à l'intérieur de cellules, rendant son utilisation très intéressante en pharmacologie [53].

L'entérotoxine (CPE) peut être produite par tous les toxinotypes existant, sauf le toxinotype B où la production de cette toxine n'a pas été rapportée. Contrairement à la plupart des autres toxines qui sont produites pendant la phase de croissance de *C. perfringens*, CPE est seulement produite pendant la phase de sporulation [54]. Elle s'accumule dans de larges corps d'inclusions dans la cellule et elle est relâchée en grande quantité par lyse à la fin de la sporulation. C'est ce qui conduit aux toxi-infections alimentaires chez les humains. Elle est parmi les causes de toxi-infections alimentaires les plus communes dans les pays industrialisés. Par contre, la prévalence de ce gène dans la population de *C. perfringens* est généralement faible, de l'ordre de moins de 5% [55]. De plus, CPE cause de la diarrhée chez la plupart des espèces animales, dont les oiseaux. L'entérotoxine exerce sa toxicité par la formation de pores de type  $\beta$  [56], comme les autres toxines formatrices de pores précédemment décrites. La fixation de l'entérotoxine à la cellule est permise par les claudines, qui sont des éléments importants des jonctions serrées. Cette toxine cause donc un dérèglement de l'équilibre électrolytique et conduit à la mort des cellules affectées par une élévation du Ca<sup>2+</sup> intracytoplasmique et une diminution du K<sup>+</sup> intracellulaire. Au niveau intestinal, elle cause une

perte de liquide et une nécrose de l'épithélium atteint. Elle a une activité létale, cytotoxique et entérotoxique .

La toxine NetB (Necrotic Enteritis Toxin B-like) a été récemment découverte suite à la création d'un mutant ne produisant pas la toxine  $\alpha$  . La toxine est possiblement impliquée dans la pathogénie de l'entérite nécrotique chez le poulet à cause de sa forte association avec la maladie . La protéine a été purifiée et elle a pu induire des changements pathologiques reliés à l'entérite nécrotique *in vitro* et *in vivo* . La toxine comporte 38% d'homologie avec la toxine  $\beta$  de *C. perfringens* . Comme cette dernière, elle forme des pores menant à l'efflux de  $K^+$  et à l'influx de  $Na^+$ , de  $Ca^{2+}$  et de  $Cl^-$  conduisant à la lyse osmotique de la cellule [57].

La toxine TpeL a été récemment découverte dans des souches de *C. perfringens* de type A, B et C . Elle est une protéine faisant partie de famille des larges cytotoxines produites par des clostridies. Contrairement aux autres toxines produites par *C. perfringens*, TpeL est produite en petite quantité pendant la phase végétative [58]. La toxine est plutôt produite en phase de sporulation car le gène *tpeL* est exprimé en plus grande quantité pendant cette phase [59]. Elle s'est révélée cytotoxique pour les souris et les cellules, mais à un degré moindre que les toxines  $\beta$  et  $\beta_2$ . Selon des travaux récents, la toxine est une glucosyltransférase qui glycosyle les sous-familles de protéines RAS et RAC . Elle a des effets cytotoxiques menant à l'apoptose des cellules cibles [60]. Plus récemment, il a aussi été montré que la toxine TpeL est capable d'induire des fibres de stress *in vitro* dans des cellules rénales de chiens par l'activation de la voie de signalment Rhoa/Rock [61]. Jusqu'à présent, une seule étude portant sur le rôle de la toxine TpeL dans l'entérite nécrotique a été réalisée en comparant la virulence de souches de *C. perfringens* possédant le gène *tpeL* avec des souches exemptes du gène, mais elle ne permet pas de conclure sur l'implication de la toxine dans la pathogénie de l'entérite nécrotique [62].

# **Chapitre 2 :**

**physiopathologie des infections bactériennes respiratoires  
(chez les ruminants)**

## 1. Physiopathologie de la tuberculose

### 1.1. Généralités sur les mycobactéries

Dans l'historique de la tuberculose, Koch avait considéré comme unique l'agent de la tuberculose à savoir le bacille tuberculeux qu'il avait découvert et mis en évidence en 1882 pour la première fois [63]. Cependant après de multiples recherches, trois nouvelles espèces furent identifiées il s'agit de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*. De nos jours, les bacilles tuberculeux regroupent cinq espèces différentes retrouvées chez l'homme et/ou chez les animaux :

- Mycobacterium tuberculosis* : bacille tuberculeux humain,
- Mycobacterium bovis* : bacille tuberculeux bovin,
- Mycobacterium avium* : bacille tuberculeux aviaire,
- Mycobacterium africanum* : bacille tuberculeux humain trouvé en Afrique Occidentale et Centrale,
- Mycobacterium microti* : bacille tuberculeux du Campagnol.

Toutefois, le genre *Mycobacterium* regroupe aussi d'autres espèces de mycobactéries.

Les bacilles tuberculeux sont classés dans l'ordre des Actinomycetales, famille des *Mycobacteriaceae*, genre *Mycobacterium*. Nous distinguons :

- les mycobactéries pathogènes,
- les mycobactéries saprophytes,
- les mycobactéries opportunistes.

Ces deux derniers groupes, découverts en 1953, sont qualifiés d'atypiques et dénommés bacilles « para tuberculeux ». Ces mycobactéries très répandues sont rencontrées dans le sol (fumier), les eaux usées, certains aliments (lait, végétaux). De nos jours ces bacilles sont à l'origine des affections à mycobactéries tant chez l'homme que chez les animaux, ce qui fait qu'ils intéressent de plus en plus les épidémiologistes. Quelques années plus tard, certains auteurs [64] classent le bacille tuberculeux aviaire *Mycobacterium avium*, dans ce groupe de mycobactéries atypiques.

Les bacilles tuberculeux sont des bactéries immobiles, non capsulées, non sporulées. Ils sont difficilement colorables par le Gram tout en étant des Grams positifs et apparaissent, fins rectilignes ou légèrement incurvés et leur taille variable entre 2 et 5 microns de long sur 0,2 à 0,5 microns de large.

Dans la structure de leur paroi, en plus du peptidoglycane, (structure de base de toute bactérie), des glycolipides (cire D, cord factor, mycosines) et les protéines supports de l'activité tuberculique, il y a une présence abondante de lipides spéciaux les acides mycoliques. Ces derniers représentent 20% du poids sec des bacilles et leur confèrent un caractère tinctorial particulier : l'acido-alcool-résistance qui est la résistance des bacilles à la décoloration par les acides forts et par l'alcool. Par conséquent, cette acido-alcool-résistance est utilisée dans la recherche des bacilles tuberculeux à travers la coloration de Ziehl-Neelsen à chaud : les bacilles y apparaissent rouge vifs sur fond bleu et colorés de façon homogène.

Les bacilles tuberculeux possèdent, en outre, des caractères culturels et biochimiques qui leur sont propres.

## **1.2. Transmission des mycobactéries**

### **1.2.1. Transmission directe**

La transmission directe de *M. bovis* peut se faire par contact rapproché entre animaux, par inhalation, ingestion ou pénétration transcutanée. Des lésions ouvertes (abcès cutané, ou lésions pulmonaires) permettant l'excrétion du *M. bovis* dans le milieu extérieur, favorisent la transmission. Les matières virulentes sont variées : jetage, salive, fèces, lait, urine, pus des lésions cutanées, sperme, sécrétions utérines [65]. L'excrétion de bacilles tuberculeux, souvent intermittente, est précoce (bien avant l'apparition des symptômes) et durable. La transmission directe de la mère au fœtus ou transmission verticale est suspectée et n'a jamais été réellement prouvée. Une transmission pseudo-verticale, par contact étroit entre la mère et le jeune (le lait peut aussi être contaminé), expliquerait la contamination des jeunes animaux.

Toutefois, l'âge et le comportement de l'animal ainsi que les pratiques inhérentes aux systèmes d'élevage peuvent avoir une importante influence sur le mode d'infection. Dans le cas de la TBB, il a été prouvé trois principales voies de transmission du *M. bovis* chez l'animal. Il s'agit de la transmission par inhalation, par ingestion et rarement par voie génitale.

Le concept de transmission du *M. bovis* généralement approuvée est l'inhalation des bacilles tuberculeux (ou d'un seul bacille) contenus dans une gouttelette d'aérosol [66]. L'inhalation est la principale porte d'entrée de *M.bovis* chez les animaux d'élevage dans les fermes mais aussi chez ceux de pâturage libre (Transhumance). L'observation de la distribution naturelle des lésions chez les bovins infectés montre l'implication des ganglions broncho-médiastinaux et ceux de la tête dans le processus d'infection, suggérant ainsi que la principale voie d'entrée des bacilles dans l'organisme est la voie respiratoire [67].

Chez l'animal, le principal mécanisme de l'infection se fait par des gouttelettes d'aérosols qui sont disséminées dans la nature suite à la toux produite par l'animal malade qui sont ensuite inhalés par les animaux en contact. Ces aérosols vont se loger dans la voie respiratoire, si possible sur la surface alvéolaire du poumon [68]. Les bacilles seront phagocytés par les macrophages, qui vont par la suite interagir avec les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée et acquise, dans les tissus ou les ganglions lymphatiques. Plusieurs études faites sur la pathologie et la distribution des lésions chez les bovins ont montré la prédominance des lésions tuberculeuses au niveau des voies respiratoires ainsi qu'au niveau des ganglions lymphatiques correspondants attestant ainsi la thèse d'une infection par inhalation. Il a été de même, des études expérimentales faites sur la transmission par voie nasale et trachéale [69].

L'ingestion directe de *M. bovis* provenant des animaux infectés (lait cru et autre sous produits animaux crus), des pâturages contaminés ou de l'eau est considérée comme une voie secondaire de transmission [70]. En Tanzanie, il a été isolé du *M. bovis* dans deux prélèvements laitiers, montrant ainsi que la consommation du lait frais non pasteurisé constituerait un risque en ce qui concerne la contamination de l'Homme par la TBB [71].

En effet, la transmission de *M. bovis* peut se faire entre animaux, des animaux aux hommes et vice versa et rarement entre les humains. Toutefois, le bétail infecté par *M. bovis* reste une source d'infection pour un autre ou pour l'homme. Cependant, la transmission par voie congénitale et sexuelle est rare dans les régions où le contrôle de la TBB est intensif.

### 1.2.2. Transmission indirecte

Le milieu extérieur peut, également, en assurant la conservation des mycobactéries, permettre la transmission indirecte de la maladie entre animaux sauvages, voire entre réservoirs sauvages et domestiques. Bref l'environnement et le climat peuvent avoir une importante influence sur le mode d'infection du bétail par le *M. bovis* [72].

En effet, le temps de survie du *M. bovis* dans l'environnement diffère d'une étude à une autre. Différents travaux ont montré que le *M. bovis* peut survivre dans la terre pendant six mois et dans le pâturage de 7 à 28 jours selon la température qui a un effet négatif sur la survie quand elle augmente. Dans l'eau courante, qui peut être contaminée par les excréments d'animaux infectés, sa survie peut aller jusqu'à 400 jours. Cependant, d'autres études minimisent le rôle de l'environnement dans la transmission de *M. bovis*.

Ainsi, d'après l'étude réalisée par Jackson *et coll.*, [73], la période de survie de *M. bovis* dans l'environnement est très courte, particulièrement pendant l'été, et donc la contamination des pâtures ne jouerait pas un rôle important dans l'épidémiologie de la tuberculose chez les bovins. Ceci pourrait être le cas dans les pays tropicaux, comme au Tchad où la température à l'ombre pourrait atteindre 40°C durant les périodes les plus chaudes. Par ailleurs, l'effet de la température sur la survie de la bactérie n'est pas univoque puis que des expériences de laboratoire ont permis de montrer que la terre chaude et humide était optimale pour la survie de la bactérie. Dans les îles britanniques, il est généralement admis que la transmission de l'infection des blaireaux aux bovins est indirecte par contact avec du matériel virulent. Morris *et coll.*, [74], conclurent que la transmission à partir du matériel virulent comparée à d'autres mécanismes de transmission serait bien moins efficace qu'une transmission directe.

Chez certaines espèces, le bacille est ingéré lorsqu'un animal consomme la carcasse d'un hôte infecté. C'est le cas en Nouvelle-Zélande, où la présence de l'infection dans certaines populations de furets est attribuée à la contamination de carcasses de possums infectés [75].

En Afrique, il a été mis en évidence la présence du *M. bovis* chez plusieurs espèces d'animaux sauvages qui pourraient être à l'origine d'une transmission indirecte de la maladie aux animaux domestiques. Des travaux effectués en Afrique du sud ont permis d'une part de montrer que le buffle africain (*Syncerus caffer*) constitue un important hôte réservoir du *M.*

*bovis* [76], et d'autre part, de montrer la susceptibilité des autres animaux sauvages à l'agent responsable de la TBB [77]. Il en est de même de la Tanzanie où la présence du *M. bovis* a été mise en évidence chez bon nombre d'animaux sauvages [78]. Cependant, jusqu'à ce jour, aucune étude expérimentale n'a prouvé l'existence d'une transmission indirecte du *M. bovis* chez le bétail en Afrique.

### 1.3. Conditions de l'infection

#### 1.3.1. Conditions qualitatives

Elles dépendent de deux types de facteurs :

- Les facteurs tenant au pouvoir pathogène du bacille (la virulence) dépendent d'abord de l'espèce elle-même. Ainsi, l'infection par le bacille aviaire détermine des lésions peu étendues, rarement caséifiées, évoluant rapidement vers la sclérose contrairement à celles dues au bacille bovin. La souche aviaire est à l'origine des lésions riches en bacilles: ce désaccord entre le grand nombre de bacilles et leur action cytopathogène faible serait dû à leur faible toxicité. Les bacilles peu pathogènes déterminent une tuberculose localisée, souvent limitée au complexe primaire. Ils provoquent plutôt l'apparition des lésions folliculaires, alors que les bacilles très virulents induisent des lésions exsudatives. Cependant, quand bien même une exposition préalable de l'animal à la souche aviaire (*M. avium*) peut lui conférer un certain degré de protection contre la souche bovine (*M. bovis*), celle-ci peut masquer le diagnostic de l'agent causal de la TBB, même lorsque des antigènes spécifiques sont utilisés à cette fin [79]. Ceci a pour conséquence la dissémination de la maladie dans le cheptel.
- Les facteurs tenant à la réceptivité et la sensibilité de l'hôte sont surtout; l'espèce animale hôte elle-même, son âge, son état général, les facteurs tissulaires locaux ainsi que les facteurs environnementaux.

Pour Francis [80], la susceptibilité du bétail à la TBB dépendait de la dose ainsi que de la voie d'infection avec peu d'influence venant des autres facteurs tels que le profil génétique de l'hôte et son état nutritionnel. Ce dernier affecte beaucoup plus l'aptitude de la réponse immunitaire à médiateurs cellulaires. La résistance naturelle du bétail à la tuberculose a été habituellement attribuée à la race Zébu (*Bos indicus*) et son importance dans les pays développés a été largement peu considérée [81]. L'impact du génotype de l'animal hôte sur la résistance (ou la susceptibilité) aux bactéries intracellulaires y compris *M. bovis* BCG a été identifié et profondément étudié chez les souris où la résistance en question était liée au gène

*Bcg* [82] et plus tard rapporté au gène *Nramp1* [83]. Chez le bovin, les gènes homologues du *Nramp1* ont été identifiés [84] mais très peu d'investigations ont été faites en ce qui concerne leurs rôles dans le contrôle de l'infection par les mycobactéries. Il a été aussi constaté que les petits ruminants sont moins sensibles au *M. bovis* que les bovins. Les lésions dues à ce dernier, sont plus fréquentes et plus graves chez les jeunes ou chez les animaux âgés que chez les adultes [85]. Par ailleurs, il a été démontré que la hausse de l'incidence de la TBB était proportionnelle à celle de l'âge de l'animal [86].

La structure du tissu, la richesse de la vascularisation et du système macrophage locale, interviennent dans la morphologie des lésions: les lésions exsudatives sont plus fréquentes et plus sévères dans les tissus lâches (poumons) et les cavités préformées (séreuses). L'existence des lésions préexistantes (lésions pulmonaires, lésions mammaires, lésions locales liées à l'injection de produits irritants...) peut favoriser l'implantation du bacille tuberculeux.

Les facteurs environnementaux (externes) entraînant une diminution de l'état général tels que, les carences, les déficits nutritionnels, le stress chez les animaux ainsi que les conditions d'élevage (extensif ou transhumant), pourraient réduire considérablement la résistance de ces derniers à l'agent causal de la tuberculose [87]. Ils augmentent plutôt la sensibilité de l'hôte au bacille tuberculeux. Des contacts ultérieurs avec d'autres organismes infectieux provenant du milieu extérieur peuvent affecter la résistance du bétail au *M. bovis*. On pourrait s'attendre d'une part que l'exposition aux mycobactéries environnementales pourrait à travers l'induction des réponses immunitaires aux antigènes ordinaires fournir un certain degré de protection acquise contre la tuberculose [88].

D'autre part, il a été aussi démontré que des infections causées par l'agent viral de la diarrhée bovine ont un effet immunosuppresseur en ce qui concerne la résistance à la tuberculose [89]. Toutefois, ces contacts avec les agents environnementaux, ne restent pas sans effet sur la mise en évidence de la TBB par des diagnostics *in vivo* tel que l'IDC.

### 1.3.2. Conditions quantitatives

Elles tiennent à la dose et à la répétition des doses de bacille:

- Des infections expérimentales effectuées sur le bétail avec du *M. bovis*, ont prouvé l'importance de l'effet et de la magnitude de celui-ci en terme du nombre de mycobactéries et de dose seuil . La dose étant le nombre de particules infectieux. La dose minimale est variable selon l'espèce inoculée et l'importance de son action pathogène dépend de sa voie de pénétration. Ainsi, par voie cutanée, il faut 5 à 10 bacilles viables pour infecter un cobaye. Par contre chez les ovins il en faut plusieurs milliers. Chez les bovins, il en faut quelques centaines. Toutefois, il a été montré que, le seul concept généralement accepté, est que l'infection à *M. bovis* peut être établie chez le bétail par inhalation d'un seul bacille contenu dans un aérosol. Une dose infectieuse relativement importante de *M. bovis* administrée par voie nasale se suit d'une infection qui progresse généralement vers la forme extensive de la maladie chez le bétail. Par ailleurs, la dose du *M. bovis* influence également sur la réponse immunitaire de l'animal hôte. Une dose seuil élevée provoque une réponse immunitaire à médiateur cellulaire se développant en quelques semaines, ainsi que l'apparition des anticorps anti-*M. bovis* circulant . Une faible dose seuil, provoque quant à elle un développement graduel de l'immunité à médiateur cellulaire, et peu ou pas du tout, l'apparition d'anticorps .
- Alors que l'inoculation d'une dose unique de bacilles tuberculeux peut n'entraîner que des lésions bénignes évoluant vers la stabilisation, des doses plus faibles mais répétées dans le temps, loin de susciter le développement d'une immunité, favorise l'apparition d'une tuberculose évolutive .

### 1.4. Les étapes de l'infection

Lorsque toutes les conditions sont réunies, l'infection peut progresser et il est possible de différencier schématiquement le déroulement de la tuberculose en deux étapes : l'étape primaire (primo-infection) et l'étape secondaire.

#### 1.4.1. Étape primaire ou primo-infection

Après la pénétration dans l'organisme, les bacilles tuberculeux sont rapidement phagocytés par les macrophages. Une partie est détruite ; l'autre se multiplie dans les cellules qui les ont phagocytés.

Ce qui entraîne la libération locale d'antigène d'où l'hypersensibilité spécifique des protéines, qui est la conséquence, le premier signe diagnostique de l'infection tuberculeuse. La multiplication locale des bacilles conduit en 8 à 15 jours à la formation d'une lésion initiale appelée le Chancre d'inoculation.

Cette lésion se double, à la faveur du drainage lymphatique des bacilles, d'une lésion tuberculeuse du nœud lymphatique loco-régional (loi de l'adénopathie régionale de PARROT). L'association Chancre d'inoculation plus (+) adénopathie satellites constitue le complexe primaire dont la localisation révèle la porte d'entrée de l'agent infectieux: pulmonaire dans 95% des cas chez les bovins et les autres ruminants, digestifs chez les porcs et les volailles, et à part égale entre ces deux voies pour les carnivores .

#### **1.4.2. Tuberculose secondaire**

Elle résulte d'une prolifération de proche en proche des lésions, qui sont groupées dans un seul organe: la tuberculose chronique d'organe. Les lésions les plus souvent caséeuses, peuvent s'ouvrir sur une voie de drainage. C'est la forme ouverte de la tuberculose. Elle peut se stabiliser ou se généraliser.

### **1.5. Interactions avec le système immunitaire**

#### **1.5.1. Le développement d'une immunité exclusivement cellulaire**

La réaction d'un organisme infecté par le bacille tuberculeux se manifeste par une mobilité accrue des macrophages, une plus grande activité de phagocytose et une capacité accrue de lyser les corps bactériens phagocytés. Cette réaction est toutefois relative et vaincue à la suite d'une atteinte de l'état générale ou des réinfections massives ou répétées. En effet, des études récentes, faites sur les réactions immunitaires induites par l'agent causal de la TBB ont suggéré qu'il y aurait un balancement de la dominance des cellules T helper de type 1 (Th1) vers la réponse immunitaire induite par les cellules T helper de type 2 (Th2), et l'arrêt de la réponse immunitaire à médiateur cellulaire serait progressivement suivi de la prédominance de la réponse immunitaire humorale [90].

Le *M. bovis* est une mycobactérie intracellulaire pathogène pour les macrophages et autres cellules de type monocyte. Quand bien même le diagnostic de plusieurs autres maladies

infectieuses des animaux se repose sur la détection de la réponse immunitaire humorale (les anticorps) de l'agent infectieux, la prédominante réponse immunitaire chez le bétail infecté par le *M. bovis* est de type cellulaire (mobilisation des lymphocytes T) [91]. Cette réponse immunitaire à médiateur cellulaire est en même temps un mécanisme de défense et souvent, elle est aussi à l'origine d'une inflammation chronique (les granulomes), caractéristique des infections à *M. bovis*. L'examen immunohistologique des premières lésions (granulomes) induites par une infection expérimentale de *M. bovis* chez le bétail, a montré que les lymphocytes-T sont parmi les premières cellules impliquées dans le mécanisme réactionnel [92]. Ce qui démontre l'importance de la réponse immunitaire à médiateur cellulaire dans l'infection tuberculeuse. Ces observations ont conduit les récentes études à mener des recherches beaucoup plus approfondies sur l'implication rapide de la réponse immunitaire à médiateurs cellulaires dans l'infection tuberculeuse [93].

En effet, il a été montré que tous le sous groupe de lymphocyte-T ( $\gamma\delta$  cellules-T, CD4 et CD8  $\alpha\beta$  cellules-T) est impliqué dans la réponse immunitaire anti-mycobactérienne chez le bétail .

L'étude de la dynamique de circulation de ce sous-groupe de cellules chez le bétail infecté expérimentalement par le *M. bovis* a révélé une implication séquentielle des  $\gamma\delta$  cellules-T, suivies des CD4, et plus tard d'une prédominance des CD8 [94]. L'instauration de la réponse immunitaire de type Th1 est d'une importance particulière en ce qui concerne la défense contre les pathogènes intracellulaire et est caractérisée par la production de l'interféron gamma (IFN -  $\gamma$ ), réputés essentiels pour l'activation de la voie microbicides des macrophages. Dans l'infection du bétail par le *M. bovis*, les cellules-T CD4 semblent être les plus dominantes dans la production des IFN- $\gamma$  menant à l'activation du pouvoir anti-mycobactérienne des macrophages tandis que les cellules-T CD8 sont plutôt impliquées dans la lyse des macrophages infectés [95]. Les  $\gamma\delta$  cellules-T sont également une source potentielle de IFN- $\gamma$  sauf que la quantité est inférieure à celle produite par les cellules-T CD4 [96]. Il est aussi évident que les  $\gamma\delta$  cellules-T jouent un rôle de liaison entre les systèmes immunitaires inné et adaptative [97].

### 1.5.2. Le développement de l'hypersensibilité retardée ou hypersensibilité de type IV

Elle est une réaction d'infiltration cellulaire (lymphocytaire) dont la forme clinique la plus classique est l'eczéma avec une infiltration épidermique se manifestant par un érythème avec œdème et prurit.

Dans l'hypersensibilité à médiation cellulaire, ce sont des lymphocytes T qui, par les récepteurs spécifiques de leur membrane cytoplasmique, assurent la reconnaissance de l'antigène et la spécificité de la réaction. Ces lymphocytes T circulent constamment dans les tissus à partir du sang pour traverser les ganglions lymphatiques et rejoindre la circulation sanguine par les vaisseaux lymphatiques. Lorsqu'ils rencontrent l'antigène au niveau d'un tissu, en présence de cellules accessoires (cellules interstitielles présentant l'antigène), ils sont activés et libèrent une série de lymphokines, substances agissant sur différentes catégories de cellules.

Le facteur d'inhibition de la migration des macrophages ou MIF est produit in vitro après incubation des lymphocytes d'un cobaye sensibilisé en présence de l'antigène spécifique. Le surnageant de ces cultures inhibe la migration des macrophages d'un cobaye non sensibilisé hors d'un tube capillaire. La production de MIF implique la reconnaissance spécifique de l'antigène par les cellules T, mais son action sur les macrophages est indépendante de l'antigène.

Le MIF n'est pas encore parfaitement caractérisé; il s'agit d'une ou de plusieurs glycoprotéines acides, de poids moléculaire de 20 000 à 55 000 daltons. Plusieurs catégories de lymphokines interviennent dans la réaction d'hypersensibilité retardée :

- des lymphokines actives présentes sur l'endothélium vasculaire (« skin reactive factor »), qui augmente la perméabilité capillaire;
- des lymphokines chimiotactiques provoquant l'attraction des monocytes, puis des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles;
- des lymphokines provoquant l'immobilisation et l'activation des macrophages (MAF), celles des polynucléaire (LIF), des ostéoclastes (OAF), l'activation des cellules NK (Interphéron), la multiplication et la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques (Interleukine-2 ou TCGF) ou en fin la lyse de certaines cellules cibles (lymphotoxines).

En suite, interviennent les lymphokines régulatrices (facteurs suppresseurs) qui limitent la réaction. Parallèlement aux lymphokines produites par les lymphocytes activés, différents médiateurs issus des macrophages et des monocytes, les monokines participent à la réaction. Les prostaglandines, notamment la PGE<sub>2</sub>, ont une activité inflammatoire mais induisent en outre la différenciation des cellules T suppressives. L'interleukine-1 stimule les lymphocytes T en provoquant notamment l'expression des récepteurs pour l'interleukine-2; elle agit sur les centres thermorégulateurs pour déclencher la fièvre et stimule la production d'une protéine de l'inflammation, la protéine C-réactive, par les hépatocytes.

L'hypersensibilité retardée peut être révélée chez le bovin par injection de bacilles (vivants ou morts) ou mieux encore d'extrait bacillaires appelés tuberculine.

### **1.5.3. Apparition d'anticorps anti *M. bovis***

Les anticorps apparaissent plus tardivement après l'hypersensibilité retardée. Ils seraient surtout les témoins d'une tuberculose active. Ils présentent des fluctuations plus ou moins importantes rendant très relatives le diagnostic sérologique. En plus, ils manquent de spécificité. Toutefois, il a été montré que chez les animaux présentant un état généralisé de la maladie, le titre d'anticorps sériques est élevé [98]. Par ailleurs, des analyses plus poussées sur l'équilibre immunitaire chez le bétail infecté par le *M. bovis*, ont également révélé un lien entre l'évolution de la pathologie et l'éminente profile immunitaire Th0 (IFN- $\gamma$  et la réponse d'IgG1). Chez ces animaux, le développement d'anticorps anti mycobactérienne par les cellules de type B (Isotype partiel d'IgG1) correspond au développement de la pathologie. Il a été aussi montré que le taux d'isotype IgG1 anti-*M. bovis* est proportionnel à l'importance des lésions tuberculeuses alors qu'il n'existe aucune relation entre ces dernières et la réponse immunitaire à médiateur cellulaire .

## **2. physiopathologie des mycoplasmoses respiratoires**

### **2.1. Généralités sur les mycoplasmes**

Les mycoplasmes font partie de la classe des Mollicutes (mollis, mon : cutis : peau, en latin), qui s'oppose à celle des Schyzomycètes, ou bactéries à paroi rigide. La classe des Mollicutes comporte aujourd'hui 5 ordres : les Mycoplasmatales, les Entomoplasmatales. les

Acholeplasmatales, les Anaeroplasmatales et un dernier ordre regroupant les organismes incertae sedis, dont la position dans la classification n'est pas encore totalement définie [99].

L'ordre des Mycoplasmatales définit une famille unique - les Mycoplasmatacae - qui réunit les genres Mycoplasma, Ureaplasma et depuis récemment les genres Eperythrozoon et Haemobartonella, bactéries parasites des érythrocytes de nombreuses espèces animales, auparavant apparentés aux Rickettsies [100]. Ce travail portera uniquement sur les genres Mycoplasma et Ureaplasma, qui regroupent les principaux mycoplasmes pathogènes des ruminants.

L'ordre des Entomoplasmatales regroupe des bactéries retrouvées notamment chez les Insectes. L'ordre des Anaeroplasmatales est composé de bactéries anaérobies strictes, qui sont uniquement présentes dans le rumen.

Ce sont les analyses successives des séquences d'ARN ribosomique 16S qui ont permis de caractériser l'évolution des différentes familles. Les Acholeplasmatales et les Anaeroplasmatales sont considérés comme les premiers Mollicutes à s'être différencié de leurs ancêtres bactériens GRAM+ par la perte de matériel génétique (évolution dégénérative). Les Spiroplasmatacae se sont ensuite séparés de la branche des Acholeplasmatacae, certaines souches ayant vraisemblablement évolué pour former les Mycoplasmatacae [101].

La classe des Mollicutes regroupe environ 200 espèces identifiées à ce jour, dont 102 du genre Mycoplasma. Elles sont actuellement classées selon leur spécificité d'hôte et leurs capacités de croissance. Environ 40 espèces ont été isolées chez les ruminants. Classiques ou occasionnelles, leur importance médicale et économique est extrêmement variable.

Les mycoplasmes sont des bactéries de petite taille (0.3 à 0.8 µm de diamètre), dont la particularité essentielle est l'absence de paroi rigide. Elles peuvent donc revêtir des formes très variées selon les conditions du milieu. Leur capacité à se déformer leur permet de traverser des filtres biologiques de porosité 0.2 à 0.4 µm.

Pour la plupart des espèces, les colonies ont un aspect typique en « œufs sur le plat ». Elles sont donc très reconnaissables sur milieu de culture lorsqu'on parvient à les isoler.

## 2.2. Transmission des mycoplasmes

La transmission est principalement horizontale, par contact direct entre les mufles, le sphincter des trayons ou le tractus génital. La contamination se produit généralement après l'introduction de nouveaux animaux au sein d'un troupeau, souvent porteurs sains de *M. bovis*. Un animal malade contamine le reste du troupeau par le biais de ses sécrétions (jetage nasal, lait, sperme...). Une étude clinique menée aux Etats-Unis sur des cas de pneumonie endémique dans un troupeau où *M. bovis* et *P. multocida* étaient fréquemment isolés a montré que près de la moitié des veaux laitiers partagent des mycoplasmes à 5 jours d'âge, cette proportion atteignant plus de 90% après 4 semaines [102]. Les cas cliniques sont plus fréquents vers 10-15 jours d'âge, avec plus de 10% de mortalité due à une pneumonie fibrineuse sévère. Une autre étude, menée en France en 2003 sur des veaux de boucherie allotés à 2-3 semaines, révèle 60 à 100% de séroconversion vis-à-vis de *M. bovis* dans les semaines suivant un épisode respiratoire chez les témoins, alors que 2% seulement des veaux présentaient des anticorps anti-*M. bovis* lors de l'allotement [103]. La diffusion du mycoplasme à tropisme respiratoire semble donc rapide et large au sein d'un lot. Les animaux convalescents excrètent ensuite pendant une longue période, et les porteurs chroniques sont en général responsables de la persistance de *M. bovis* au sein d'un troupeau.

L'infection peut ainsi rester latente pendant des mois, puis réapparaître suite à un stress.

Il existe également une transmission verticale mère-veau, principalement par le lait contaminé (42). Ce n'est cependant pas la seule voie possible, puisque des contaminations sont constatées sur des troupeaux utilisant du lait pasteurisé ou de la poudre de lait [104]. La possibilité d'une transmission verticale in utero est également évoquée [105].

L'environnement est à lui seul une source non négligeable de contamination, du fait de la persistance de *M. bovis* sur le matériel de traite et sa résistance aux dessiccations du milieu extérieur par la formation de biofilms [106]. Expérimentalement, la survie est de 59 à 185 jours en milieu liquide, avec des variations suivant la température, la nature du milieu et le pH .

### 2.3. Interactions avec le système immunitaire

Les interactions des mycoplasmes avec le système immunitaire de l'hôte mettent en jeu des mécanismes spécifiques et non-spécifiques. La plupart des études immunologiques s'intéressent aux mycoplasmes pathogènes humains connue *M. pulmonis* ou *M. pneumoniae*. Cependant, une similitude peut être envisagée dans le cadre de l'étude des mycoplasmoses des ruminants.

Deux facteurs de virulence sont reconnus pour entraîner une exacerbation du système immunitaire : les lipoprotéines, dont les nombreux groupements lipidiques possèdent un fort pouvoir immunogène, et la capsule polysaccharidique présente chez quelques espèces de mycoplasmes, notamment *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.

Lors de la colonisation des épithéliums (notamment respiratoires), les mycoplasmes interagissent avec les macrophages et les monocytes et stimulent également la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  pour *M. bovis* et *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC). Ces médiateurs de l'inflammation favorisent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et des neutrophiles. Les lymphocytes sont ensuite attirés sur le site de l'inflammation par les composants cellulaires des mycoplasmes. Ils sont alors activés ou inactivés de manière non-spécifique et polyclonale par l'action combinée des cytokines et des mycoplasmes. Cette activité mitotique concerne les lymphocytes B et ou T selon les souches et semble liée à la présence de certaines lipoprotéines au sein de la membrane. Elle varie énormément d'une souche à une autre [107]. Enfin, les mycoplasmes sont également capables d'augmenter conjointement l'activité des macrophages, des cellules NK (Natural Killers) et des cellules T. Ils peuvent également activer la cascade du complément.

Cette habileté à moduler la réaction immunitaire de l'hôte leur permet d'éviter ou de supprimer les mécanismes de défense de l'hôte et d'établir une infection persistante. Les infections naturelles à mycoplasmes sont généralement caractérisées par un faible nombre d'anticorps, et une réponse immunitaire à médiation cellulaire faible. L'intensité de la réponse à médiation humorale varie selon les publications, de faible [108] à persistante [109].

## 2.4. Facteurs de virulence et modes d'action

Les facteurs moléculaires responsables de la virulence des mycoplasmes présentent, sur la base de l'analyse des génomes, peu ou pas de similitudes avec les facteurs déjà décrits chez d'autres bactéries. Les mycoplasmes semblent avoir développé des mécanismes spécifiques qui leur permettent de faire face aux défenses immunes de l'hôte.

### 2.4.1. Etude des facteurs de virulence

Les premières études comparatives menées sur des souches exprimant différents degrés de virulence ont permis d'identifier quelques-uns des mécanismes d'expression du pouvoir pathogène chez les mycoplasmes. Cette approche a notamment été utilisée sur les espèces *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, *M. bovis* ou *M. pneumoniae* [110].

L'essor de la génomique a ouvert de nouvelles perspectives pour l'étude des facteurs de virulence. L'analyse *in silico* des premières séquences complètes de génomes de mycoplasmes a ainsi permis d'identifier quelques facteurs potentiellement impliqués dans la virulence de ces bactéries, comme le facteur CARDS TX identifié chez *M. pneumoniae* [111]. Toutefois, l'analyse des génomes séquences a rapidement montré les limites de ces études *in silico* chez les mycoplasmes.

La mutagénèse aléatoire et le criblage de banques de mutants sont actuellement les approches les plus utilisées pour étudier les facteurs de virulence bactériens. La mutagénèse physico-chimique a recours à l'irradiation aux ultraviolets ou à l'utilisation d'agents mutagènes. Ces techniques ont été utilisées chez les espèces *M. mobile* et *M. pneumoniae* [112]. Toutefois, le défaut majeur de ces techniques est l'accumulation de mutations ponctuelles difficilement repérables dans le génome. Le développement de techniques de mutagénèse transpositionnelle a permis de contourner ce problème. Les transposons Tn916 et Tn4001, ainsi que leurs dérivés [113], ont été utilisés pour la construction de banques de mutants chez les espèces *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. pulmonis* et *M. arthritidis* [114]. La technique de « Signature-Tagged Mutagenesis » (STM), plus récente, permet d'identifier chaque mutant à l'aide d'une séquence spécifique d'ADN intégrée avec le transposon et de tester des groupes de mutants plutôt que des mutants individuels [115].

La mutagénèse transpositionnelle a largement été utilisée en microbiologie pour la recherche de gènes de virulence [116]. Chez les mycoplasmes, elle a surtout été employée pour l'étude des bases du vivant, mais a permis l'identification de gènes impliqués dans la mobilité, l'adhérence, ainsi que d'autres facteurs associés à la virulence, comme la déshydrogénase dihydrolipoamide chez *M. gallisepticum* [117].

Quelle que soit la technique de mutagénèse utilisée, l'identification de facteurs de virulence repose sur l'utilisation d'un crible de sélection adéquat. L'animal de laboratoire et la culture cellulaire sont les environnements les plus utilisés. Les modèles cellulaires, plus simples à mettre en œuvre, sont une alternative aux études *in vivo* mais les résultats obtenus doivent être confirmés chez l'hôte naturel. Les cellules primaires offrent un environnement proche de l'hôte. Cependant des problèmes de dégénérescence apparaissent souvent après un nombre limité de passages. Le recours à des lignées cellulaires immortalisées permet de contourner le phénomène de dégénérescence mais les cellules de ces lignées sont plus éloignées de l'hôte naturel dont elles conservent peu de caractéristiques.

#### **2.4.2. Variabilité antigénique et variabilité de surface**

Les mycoplasmes ne possèdent pas de paroi et leur membrane plasmique est en contact direct avec l'environnement. Les protéines membranaires assurent donc directement les échanges avec le milieu extérieur et sont la cible de la réponse immune de l'hôte. Afin d'assurer leur survie et d'échapper à la réponse humorale, les mycoplasmes ont développé une stratégie qui repose sur des variations à haute fréquence des protéines de surface ainsi que sur des modifications de leur taille et/ou de leur structure [118]. Différents systèmes sont mis en œuvre par les mycoplasmes pour assurer ces variations aléatoires d'expression des protéines.

Le premier mécanisme, décrit chez *M. hyorhinis*, repose sur l'insertion ou la délétion d'un ou de plusieurs nucléotides dans la région promotrice des gènes codants pour les protéines de surface Vlps [119]. Ces variations affectent directement et de façon drastique la transcription du gène situé en aval du promoteur. Un système similaire a été identifié chez *M. gallisepticum* [120]. Un second mécanisme a été identifié chez *M. agalactiae* (gènes *vpma*), *M. bovis* (gènes *vsp*) et *M. pulmonis* (gènes *vsa*). Une recombinase permet une inversion des brins d'ADN entre des sites de recombinaison spécifiques, positionnant de façon alternative des gènes silencieux

derrière un promoteur actif [121]. Un système identique, basé sur des réarrangements de la région promotrice devant les gènes *mlp*, a été mis en évidence chez *M. penetrans* [122]. Enfin, *M. synoviae* possède un unique gène *vlhA* et de multiples pseudogènes répartis sur l'ensemble du génome [123]. Des recombinaisons entre ces pseudogènes et le gène *vlhA* permettent de remplacer une partie de la séquence du gène *vlhA* par la séquence des pseudogènes.

Des variations de taille et de structure des protéines exprimées sont également possibles. Ainsi chez *M. agalactiae*, des glissements de l'ADN polymérase sur les brins d'ADN provoquent des variations de taille des *Vpmas*, des recombinaisons homologues entraînent des variations de leur structure et des duplications de gènes permettent l'émergence de versions alléliques et de nouveaux produits [124].

Les mécanismes décrits ici et les variations de taille ou de structure peuvent intervenir d'une façon simultanée, générant un répertoire très dynamique des protéines de surface .

### **2.4.3. Adhésion aux surfaces épithéliales**

L'adhésion des mycoplasmes aux surfaces mucoales est une étape importante pour l'infection et la colonisation de l'hôte [125]. Les espèces *M. pneumoniae* et *M. genitalium* possèdent une structure terminale « en pointe » où se concentrent les adhésines et autres protéines impliquées dans l'adhésion [126]. Tous les mycoplasmes ne possèdent pas ce type de structure spécialisée mais sont néanmoins capables d'adhérer aux cellules de l'hôte. La lipoprotéine T (*LppT*) de *M. conjunctivae* est impliquée dans l'adhésion aux cellules synoviales ovines. Cette lipoprotéine présente un motif RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) qui suggère la participation de certaines intégrines ovines dans l'adhésion du mycoplasme [127]. Les récepteurs cellulaires utilisés par les mycoplasmes pour l'adhésion sont des macromolécules complexes de type sialoglycoconjugués et des glycolipides sulfatés .

Des études menées chez *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae* et *M. genitalium* ont montré qu'une perte de l'adhésion était accompagnée d'une perte de la virulence [128].

Chez *M. agalactiae*, la lipoprotéine P40 [129] participe à l'adhésion mais n'est pas exprimée chez toutes les souches indiquant que d'autres protéines peuvent être

impliquées dans ce processus. Les études menées chez *M. pneumoniae* ont montré que l'adhésion était un processus multifactoriel .

#### **2.4.4. Invasion de la cellule hôte**

Les mycoplasmes sont des parasites extracellulaires, mais des études récentes ont montré que certaines espèces possèdent la capacité de pénétrer dans les cellules non phagocytaires. L'invasion cellulaire a notamment été étudiée chez *M. penetrans* [130]. Elle a également été démontrée pour d'autres mycoplasmes comme *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae* et *M. gallisepticum* [131]. L'invasion cellulaire est un processus complexe dont les acteurs restent encore à définir. L'intervention de la fibronectine a été suggérée pour l'internalisation de *M. penetrans* [132] et de *M. pneumoniae* [133] par analogie avec des observations faites chez *Neisseria gonorrhoeae* et *Staphylococcus aureus* [134]. La subversion du cytosquelette pourrait être une autre stratégie aboutissant à l'invasion des cellules de l'hôte [135].

La capacité de *M. agalactiae* à envahir les cellules de l'hôte reste à démontrer.

#### **2.4.5. Subversion de la réponse immune**

Les mycoplasmes sont capables d'exercer des effets immunomodulateurs sur le système immunitaire de leur hôte.

En 1981, Geary et al ont mis en évidence une toxine inflammatoire chez *M. bovis* qui serait capable d'activer le complément [136]. Des protéines membranaires de *M. fermentans* seraient également liées à l'activation du complément [137].

L'induction de la prolifération des lymphocytes B et T par *M. arthritidis* fait l'objet d'études détaillées [138]. L'activation des lymphocytes T par une protéine présente dans du surnageant de culture a permis d'identifier un superantigène, nommé MAM pour « *Mycoplasma arthritidis* mitogen ». D'autres mycoplasmes, comme *M. pulmonis*, sont également capables d'activer les lymphocytes B et T [139]. Ce dernier induit aussi une augmentation de l'activité lytique des cellules NK (« Natural Killer ») [140]. Les espèces *M. penetrans* et *M. fermentans*

peuvent respectivement envahir et fusionner avec les lymphocytes T et induire la mort de ces cellules [141].

De nombreuses espèces de mycoplasmes sont également capables d'interagir avec les monocytes et les macrophages. Cette interaction aboutit à la production de cytokines, comme l'interféron et les interleukines 2, 4 et 10 .

Enfin, des études récentes ont montré que *M. gallisepticum* et *M. synoviae* possèdent une protéase capable de cliver les immunoglobulines de type G [142].

Chez *M. agalactiae*, la protéine P48 [143] présente des motifs similaires à ceux de protéines membranaires de *M. fermentans* dont l'activité biologique est liée à l'activation du complément et à l'induction des cytokines [144].

#### **2.4.6. Production de toxines et de métabolites toxiques**

Un facteur de virulence nommé CARDS TX pour « Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome Toxin » a été identifié chez *M. penetrans* et *M. pneumoniae*. Cette toxine présente des similitudes avec des ADP-ribosyltransférases comme la toxine pertussique de *Bordetella pertussis* [145]. Les ADP-ribosyltransférases induisent des modifications protéiques post-traductionnelles sur les protéines qui lient les nucléotides [146]. De telles modifications ont été observées en culture cellulaire avec une protéine CARDS TX recombinante [147]. Le facteur CARDS TX est à ce jour l'un des rares produits mycoplasmiens semblables à des toxines bactériennes plus classiques.

Des agents nécrotiques digérant les tissus ont été mis en évidence chez *M. alligatoris* [148]. Il s'agirait d'une hyaluronidase et d'une sialidase, toutes deux présentant des homologies avec des protéines sécrétées par *Clostridium perfringens*. L'interaction entre hyaluronidase et sialidase serait nécessaire à l'expression du pouvoir pathogène chez *M. alligatoris*. *M. crocodyli* possède également une hyaluronidase mais pas de sialidase fonctionnelle ce qui pourrait expliquer son faible pouvoir pathogène en comparaison avec *M. alligatoris* .

Enfin, la production de radicaux peroxydes ou superoxydes peut également être à l'origine de dommages cellulaires. Des études menées chez *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC

ont montré que les souches africaines possédaient plusieurs gènes impliqués dans le transfert du glycérol (GtsABC), contrairement aux souches européennes considérées comme moins virulentes. Cette incapacité à transporter le glycérol pourrait être à l'origine de l'atténuation de leur virulence [149]. Le glycérol absorbé serait phosphorylé en glycérol-3-phosphate (G3P) puis la (L-alpha)-glycérophosphate oxydase (GlpO), protéine membranaire, catalyserait l'oxydation du G3P en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) avec production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les souches européennes, incapables de transporter le glycérol, produisent une quantité réduite d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et sont moins cytotoxiques que les souches africaines .

La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été rapportée pour certaines souches de *M. agalactiae* [150].

#### **2.4.7. Perturbations du cycle cellulaire**

Les mycoplasmes peuvent se développer en culture cellulaire et interagir avec les cellules eucaryotes durant de longues périodes sans induire d'effets cytopathiques aigus. Cependant, la présence de mycoplasmes à la surface ou à l'intérieur des cellules eucaryotes peut induire des signaux capables de perturber le cycle cellulaire.

Des études récentes ont montré que plusieurs mycoplasmes peuvent provoquer une inhibition de la prolifération et induire la mort cellulaire accompagnée par une fragmentation de l'ADN caractéristique de l'apoptose. On peut citer *M. arginini*, *M. bovis*, *M. hyorhinitis*, *M. penetrans*, *M. fermentans*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC et *M. alligatoris* [151]. Paradoxalement, en plus de leur effet apoptotique, *M. fermentans* et *M. penetrans*, peuvent induire une prolifération cellulaire [152]. Des effets mitotiques ont été observés lors de l'infection par *M. arginini*, *M. arthritidis*, *M. fermentans* et *M. penetrans* [153]. Enfin, des aberrations chromosomiques et une instabilité génétique ont été décrites en présence de *M. orale*, *M. hominis*, *M. salivarium* et *M. fermentans* [154]. Les mécanismes responsables de l'altération de la structure des chromosomes restent toutefois inexplicés.

# **Chapitre 3 :**

**physiopathologie des infections bactériennes de l'appareil génital  
(chez les ruminants)**

## 1. Physiopathologie de la brucellose

### 1.1. Généralités sur *Brucella*

Conformément à la définition phylogénétique d'une espèce, le genre *Brucella* est divisé en six (6) espèces elles mêmes séparées en biovars, en fonction d'une relative spécificité vis-à-vis de leur espèce hôte animal naturel. On distingue: *B. melitensis* (3 biovars), *B. abortus* (9 biovars) le plus souvent rencontré en Afrique, *B. suis* (5 biovars), *B. ovis*, *B. canis* et *B. neotomae*. Deux espèces identifiées chez des mammifères marins ont été proposées: *B. ceti* chez les dauphins et *B. pinnipedialis* chez les pinnipèdes [155]. En 2007, une autre espèce *B. microti* est isolée chez les campagnols (*Microtus arvalis*) en République Tchèque et en 2008 chez les renards sauvages en Autriche [156]. L'espèce *B. inopinata* a été isolée aux Etats Unis à partir d'une prothèse mammaire d'une patiente [157] et porte le nombre d'espèces de *Brucella* à dix à nos jours. Les brucelles affichent une proximité génétique avec quelques bactéries pathogènes ou symbiotiques des plantes du genre *Agrobacterium et rhizobium*, avec des pathogènes animaux (*Bartonella*) et avec des bactéries opportunistes ou telluriques (*Ochrobactrum*) [158].

*Brucella* est une bactérie gram négatif, coco bacille (groupés par pair) de 0,5 à 1,5 micron de long sur 0,4 à 0,8 micron de large relativement rectiligne avec deux extrémités arrondies (05). Elle n'est ni sporulée, ni capsulée, ni flagellée.

Elle est principalement anaérobie [159] et a un développement intra-cellulaire.

### 1.2. Sources et modes d'infection

Les animaux infectés ou les porteurs latents constituent les sources de contagion durant toute leur vie. Le contenu de l'utérus gravide, les sécrétions vaginales, l'urine contaminée, le colostrum, le lait et le sperme de ces animaux représentent les matières virulentes.

L'infection se fait par voie cutanée, conjonctivale, respiratoire, digestive et vénérienne. Quelle que soit l'espèce animale ou l'Homme, la transmission de la maladie peut se faire de manière verticale (in utero ou pendant la parturition) ou de manière horizontale par contact direct entre les sujets sains et infectés et par l'intermédiaire de matières virulentes, des locaux et matériels souillés et des produits infectés (lait et viande).

Très peu de cas de transmission interhumaine ont été signalés [160], mais il a été suggéré une transmission interhumaine entre un microbiologiste travaillant sur *Brucella* et sa femme [161] d'une part, et d'autre part la contamination d'un nouveau né ayant été allaité par le lait maternel infecté [162].

### 1.3. Facteurs de réceptivité et de sensibilité

Chaque espèce de *Brucella* semble avoir son espèce animale préférée, mais cette spécificité d'espèce n'est pas stricte car certaines espèces animales font une infection liée à la présence d'autres types de brucelles. C'est le cas de la chèvre qui résiste à l'infection par *B. abortus*, alors que le bovin et l'ovin sont des hôtes préférentiels de *B. abortus* ; et les ovins, de *B. ovis*. La gestation est un important facteur de sensibilité.

Toutefois, la brebis exprime rarement une infection à *B. ovis*, tandis que le bélier présente dans 50% des cas de symptômes. Les jeunes restent des porteurs latents car la maladie ne s'exprime qu'après la puberté pour rester infectés toute leur vie [163].

### 1.4. Les mécanismes de pathogénicité de *Brucella*

Plusieurs espèces de *Brucella* peuvent contaminer l'homme. Toutefois, le degré de gravité est variable selon les espèces considérées.

Les espèces de *Brucella* diffèrent dans leur capacité à provoquer des maladies humaines invasives. *B. melitensis* est la plus pathogène, *B. abortus* est associée à des infections moins fréquentes et à une majorité des cas sub-cliniques. La virulence de *S. suis* est variable pour l'homme [164].

Ils ne sont pas encore totalement connus. Les *Brucella* virulentes sont des parasites intracellulaires facultatifs qui peuvent infecter à la fois des cellules phagocytaires et non phagocytaires [165]. Les voies de transmission de la brucellose sont multiples puisqu'elles peuvent concerner l'ingestion, le contact avec des abrasions cutanées ou certaines muqueuses, mais aussi l'inhalation. Des études animales suggèrent qu'après passage des barrières épithéliales, les organismes sont rapidement ingérés par les cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages).

Le principal facteur de virulence des espèces de *Brucella* est le lipopolysaccharide (LPS) de la paroi cellulaire. Comme nous l'avons vu, il existe à la fois des formes « S » lisses (*S. metitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) et « R » rugueuses (*S. canis*). Ces dernières présentent des souches possédant des LPS rugueux ayant beaucoup moins de virulence chez l'humain. Après opsonisation et ingestion par les cellules phagocytaires, les bactéries sont capables de survivre et de se multiplier à l'intérieur des phagosomes. Ceci est rendu possible par la production de dérivés azotés, l'adénine et la guanine monophosphate (GMP), qui inhibent la fusion du phagosome et du lysosome, l'activité oxydative ainsi que la production de facteur de nécrose tumorale correspondant au système bactéricide [166].

### 1.5. Interactions avec le système immunitaire

Les défenses spécifiques de l'hôte contre *Brucella* sont similaires à celles engagées contre les autres bactéries intracellulaires et mettent en jeu deux types de mécanisme immunitaire : une médiation humorale (mettant en jeu les anticorps) et une médiation cellulaire.

**Le rôle de la médiation humorale :** l'administration passive d'anticorps directement au contact du LPS a montré une réduction du nombre de *Brucella* survivant dans le foie et la rate de souris expérimentales, indiquant un rôle des anticorps dans la protection. Cependant, le principal mécanisme de défense contre *Brucella* est la médiation cellulaire.

**Le rôle de la médiation cellulaire :** il a été montré qu'après avoir phagocyté *Brucella*, les macrophages présentaient les antigènes de la bactérie aux lymphocytes T qui produisent alors des lymphokines. Ces agents (dont l'interféron, acteur principal dans le cas d'infection à *Brucella*) activent les anciens macrophages inefficaces et leur donnent un potentiel bactéricide. Les lymphokines dérivées des lymphocytes T attirent alors d'autres cellules sur le lieu de l'infection. Ceci conduit à la formation de granulomes. Simultanément, d'autres cellules phagocytaires actives sont amenées sur le site de l'infection. Cette réponse inflammatoire est induite par les lymphocytes T qui produisent des cytokines, des facteurs de colonie stimulants, des facteurs de nécrose tumorale et d'interleukine .

Suite aux réactions de l'hôte, les lésions des tissus ou granulomes provoqués par les espèces de *Brucella* chez l'homme, sont composés de cellules épithéliales, de leucocytes

polymorphonucléaires, de lymphocytes et de quelques cellules géantes. En cas d'infection avec *B. melitensis*, ces granulomes sont particulièrement petits, bien que la toxicité associée à cette espèce soit forte. Il n'y a généralement pas de nécroses ni de formation d'abcès, excepté dans le cas de *B. suis*. L'hypersensibilité rapidement développée par l'homme au contact des antigènes de *Brucella* suggère que la plupart des symptômes de la brucellose humaine résultent de la réaction des défenses de l'hôte .

La sensibilité à la médiation cellulaire diffère selon les espèces considérées, *B. abortus* étant facilement tuée au contraire de *B. melitensis* qui est rarement affectée. La lyse par le sérum (médiation humorale) peut se produire, même en l'absence d'anticorps d'agglutination avec, là encore, une plus grande sensibilité de *B. abortus* par rapport à *B. melitensis*. Les différences entre les types de LPS, la sensibilité à la lyse par le sérum et à la médiation cellulaire peuvent expliquer les différences de pathogénicité des espèces chez les humains.

Si elle n'est pas tuée par les mécanismes bactéricides à l'intérieur du phagosome, la bactérie détruit son hôte cellulaire et infecte d'autres cellules. *Brucella* peut aussi se répliquer extracellulairement dans les tissus de l'hôte .

### **1.6. La diffusion de *Brucella* dans l'organisme**

Les *Brucella* sont ingérées par les neutrophiles et les macrophages qui les transportent alors vers les ganglions lymphatiques locaux. La bactérie se développe sous une à trois semaines après l'exposition si le système immunitaire de l'hôte ne peut contenir l'infection [167].

Les bactéries diffusent alors largement à partir des tissus lymphoïdes locaux soit par transport à l'intérieur des cellules phagocytaires, soit extra cellulairment par le flux sanguin mais ces mécanismes de dispersion ne sont pas bien connus. Les bactéries peuvent se localiser dans certains organes cibles comme les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, la moelle osseuse, et spécifiquement chez les animaux les organes reproducteurs. La présence de méso-érythritol dans les testicules et les vésicules séminales des taureaux, chèvres et verrats ainsi que dans les produits de la conception chez les ruminants et truies gravides stimule énormément la multiplication de *Brucella*. Ce facteur influençant la localisation des bactéries au sein des organes reproducteurs est absent chez l'homme .

En résumé, l'origine des diverses manifestations cliniques chez les sujets atteints de brucellose n'a pas encore été clairement élucidée. Toutefois, il ne fait aucun doute que l'augmentation de la réplication de *Brucella* chez l'hôte est largement due à sa capacité à éviter les mécanismes de "killing" cellulaire, à proliférer dans les macrophages comme d'autres pathogènes intracellulaires. *Brucella* ne résiste pas seulement à la destruction par les neutrophiles après phagocytose, mais se réplique aussi dans les macrophages. De plus, la survie dans ces derniers permet l'établissement d'infections chroniques, la bactérie échappant aux mécanismes extracellulaires humoraux de défense de l'hôte comme le complément et les anticorps [168].

## **2. Physiopathologie des mammites**

### **2.1. Généralités sur les staphylocoques**

Les staphylocoques appartiennent à la famille des *Micrococcacæ* qui comprend quatre genres : *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* et *Planococcus* [169]. La classification des staphylocoques a été faite sur la base d'analyses des séquences des gènes codants pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S. Le genre *Staphylococcus* est classé dans la famille des *Staphylococcacæ* qui comprend 45 espèces et sous espèces dont dix sept ont été retrouvées chez l'homme [170].

La coloration de Gram, la morphologie des colonies sur milieux gélosés et différents tests biochimiques permettent d'identifier le genre *Staphylococcus* et l'espèce *S. aureus*. Les staphylocoques sont donc des *cocci* à Gram positif, isolés ou groupés en amas, immobiles, mesurant de 0.8 à 1 µm, non sporulés, parfois encapsulés, catalase positive et oxydase négative. *S. aureus* est identifié sur l'aspect pigmenté des colonies, la positivité des tests de la coagulase. En cas de résultats discordants entre les tests de la coagulase et d'agglutination, l'identification peut être faite par des galeries de tests biochimiques ou des sondes nucléiques spécifiques de *S. aureus*.

### **2.2. Origine de la contamination**

La peau et les muqueuses des animaux à sang chaud constituent la niche écologique de *S. aureus*. Chez l'homme, les fosses nasales, le cuir chevelu et les mains sont les principales localisations [171]. Chez les ruminants et plus particulièrement chez la vache, *S. aureus* se

retrouve majoritairement dans les naseaux et sur la peau des trayons [172]. Il est capable de survivre dans l'environnement direct de l'animal puisque de nombreuses espèces de staphylocoques peuvent être retrouvées dans l'air, dans la salle de traite, la litière et au niveau des lésions cutanées.

### 2.3. Etapes du processus infectieux

La première étape du processus infectieux est la contamination du trayon. Le franchissement du canal du trayon, même par un très petit nombre de bactéries, leur donne accès à la lumière de la glande et suffit à induire une infection mammaire [173]. Le canal du trayon est donc central dans la protection de la mamelle. Après l'entrée dans la lumière de la glande mammaire, les staphylocoques vont avoir la capacité de se répliquer dans le milieu lait, malgré certaines conditions non favorables : pression partielle en oxygène faible, composés bactériostatiques. Les étapes suivant la multiplication intraciternale sont des étapes primordiales dans la survie et donc dans la persistance de *S. aureus* dans la mamelle. En absence d'observation et de données claires *in vivo*, ces étapes sont pour l'heure relativement spéculatives. Ces étapes sont l'adhésion à l'épithélium des citernes et des canaux galactophores puis l'internalisation des staphylocoques dans les CEM.

#### 2.3.1. Adhésion de *S. aureus* aux cellules du tissu mammaire

*S. aureus* a la capacité de coloniser les tissus de l'hôte en adhérant aux surfaces abiotiques (par ex. équipements médicaux ou de traite) ou directement aux cellules eucaryotes et aux composants de la matrice extracellulaire. En effet, *S. aureus* peut adhérer à l'épithélium ou l'endothélium de l'hôte via son affinité vis-à-vis de la fibronectine (Fn), du fibrinogène (Fg), de l'élastine, du collagène et du facteur de Von Willebrand [174]. Dans le contexte mammaire, plusieurs études *in vitro* ont démontré la capacité de *S. aureus* à adhérer aux cellules épithéliales mammaires [175]. Il a été montré que *S. aureus* possède un fort taux d'adhésion à de nombreuses lignées cellulaires (épithéliales, endothéliales, kératinocytes, macrophages) [176], mais que ce taux varie en fonction de la souche bactérienne sélectionnée et qu'il dépend aussi du fond génétique du donneur de la lignée cellulaire [177]. Cette étape d'adhésion, bien que clairement identifiée sur modèle cellulaire notamment par des études de microscopie, reste difficile à observer sur explants et encore plus sur des prélèvements de tissus infectés. La

multitude d'adhésines présentes à la surface de *S. aureus* lui confèrent une forte capacité d'adhésion aux cellules ainsi qu'aux tissus conjonctifs de la matrice interstitielle.

### **2.3.2. Internalisation de *S. aureus* aux cellules du tissu mammaire**

Suite à l'adhésion, il est probable qu'une partie au moins des staphylocoques soit internalisée au sein des cellules de l'hôte. En effet, la capacité d'internalisation de *S. aureus* dans une variété de cellules de l'hôte a en effet été démontrée. *S. aureus* est aujourd'hui reconnu comme pathogène potentiellement intracellulaire [178]. Des études de microscopie à transmission réalisées sur modèles cellulaires ont montré cette capacité de *S. aureus* à internaliser les cellules épithéliales mammaires notamment dans la lignée cellulaire bovine MAC-T où l'internalisation peut être massive. Des *S. aureus* isolés de mammites peuvent donc envahir les cellules en culture, et leur taux d'internalisation est généralement corrélé au taux initial d'adhésion [179]. A l'heure actuelle, l'internalisation reste cependant controversée dans le cas des mammites car non observée *in vivo*. Les mécanismes mis en jeu lors de l'internalisation de *S. aureus* sont aujourd'hui intensément étudiés et de mieux en mieux caractérisés essentiellement sur modèle cellulaire. La pénétration de *S. aureus* dans les cellules épithéliales mammaires fait intervenir un mécanisme de type zipper, processus d'interaction entre des protéines bactériennes et cellulaires conduisant à la formation de pseudopodes invaginant la bactérie adhérente [180].

L'internalisation de *S. aureus* passe par un mécanisme d'endocytose faisant appel à des récepteurs spécifiques. En effet, les protéines fixant la fibronectine semblent nécessaires (mais pas indispensables) à l'adhésion et elles sont par contre indispensables à l'internalisation [181]. Il a clairement été démontré que des souches mutantes de *S. aureus*, déléetées de leurs protéines de liaison à la fibronectine (Fnb A et B) perdent la capacité d'internaliser dans les cellules épithéliales mammaires. Les protéines de liaison à la fibronectine de *S. aureus* permettent d'interagir avec la fibronectine cellulaire présente dans le milieu extracellulaire. Cette interaction primaire entre le pathogène et la fibronectine permet à *S. aureus* d'être en interaction avec des récepteurs spécifiques de l'hôte. Ces récepteurs cellulaires sont des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  présentes à la surface de la majorité des cellules eucaryotes. Les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  sont des points focaux permettant l'ancrage du cytosquelette cellulaire. En effet, les intégrines sont directement reliées au réseau d'actine participant à l'architecture cellulaire. Cette interaction secondaire entre *S. aureus* – Fibronectine – Intégrines  $\alpha 5\beta 1$  entraîne, par une cascade de signalisation, un

remaniement de l'architecture cellulaire conduisant à la formation de pseudopodes et donc à l'invagination par endocytose du pathogène [182].

### **2.3.3. Vie intracellulaire de *S. aureus* et persistance intramammaire**

Le devenir de *S. aureus* et de la cellule infectée va dépendre de la souche impliquée [183], mais aussi de la susceptibilité des cellules de l'hôte aux différents facteurs de virulence. La capacité de survie au sein des cellules de l'hôte après son internalisation représente une évolution similaire à celle des pathogènes intracellulaires, favorisant la persistance du pathogène et conférant un aspect chronique à l'infection.

#### **2.3.3.1. Effet cytopathique**

Des études récentes ont montré que l'invasion de cellules épithéliales (MAC-T et HeLa) par des souches de *S. aureus* d'origine humaine ou animale avait des répercussions sur le cycle cellulaire de la cellule hôte. En effet, l'invasion par *S. aureus* ralentit la prolifération cellulaire et induit un effet cytopathique [184]. Les auteurs révèlent qu'une viabilité bactérienne semble nécessaire à l'effet cytopathique qui se manifeste par une transition entre la phase G2 et M plus longue. Ce retard semble favoriser la réplication de *S. aureus*, et donc sa propagation au sein de l'hôte .

#### **2.3.3.2. Persistance intracellulaire et « Small Colony Variant »**

Une fois internalisées, toutes les bactéries ne vont pas être dégradées sous l'action phagolysosomale mais pourront survivre pour de longues périodes au sein de différentes lignées cellulaires.

Dans de nombreux cas et notamment lors de mammites, la persistance des infections est attribuable à la formation de « Small Colony Variant » (=SCV) [185]. Les SCV apparaissent spontanément dans la population de *S. aureus* internalisée et présentent des caractéristiques différentes de la souche parentale : croissance lente, absence de pigmentation, non hémolytique. Les études génomiques réalisées sur les SCV révèlent que dans beaucoup de cas, une mutation dans le locus « *agr* », un des régulateurs majeurs de la virulence, entraîne une défaillance dans la production de facteurs de virulence sous contrôle du quorum-sensing [186]. Outre une virulence atténuée, le phénotype SCV confère une paroi plus épaisse [187] et une surexpression

du facteur sigma alternatif  $\sigma_B$ , permettant une meilleure résistance face aux stress environnementaux [188].

Ces observations confirment le fait que *S. aureus* persiste dans les cellules de l'hôte sous la forme de SCV et participe à la formation de réservoir pour des infections récurrentes. Tel un cheval de Troie, dans le cas des mammites, la pathogénicité des SCV est liée à sa capacité à résister aux défenses de l'hôte et aux traitements antibiotiques avec une tendance à réverter vers le phénotype sauvage lorsque les conditions redeviennent favorables, conduisant à la chronicité de l'infection. Attala et al en 2008 ont ainsi identifié dans leur campagne d'échantillonnage que 50 % des souches de *S. aureus* isolées de mammites chroniques présentent un phénotype SCV [189].

### 2.3.3.3. Induction de la mort cellulaire

Outre cette capacité de persistance sous forme de SCV, *S. aureus* peut sortir de l'endosome sous l'action notamment de l' $\alpha$ -toxine. Une fois dans le cytoplasme, il peut se répliquer et induire la mort de la cellule infectée pour ensuite se disséminer vers les tissus sous-jacents [190]. Certaines études montrent que la mort cellulaire induite par *S. aureus* est complexe et multifactorielle, mais qu'elle fait majoritairement intervenir un mécanisme caspase-dépendant sous l'action de l' $\alpha$ -toxine et d'autres toxines hémolytiques [191]. Haslinger-Löffler et al. en 2005 identifient que la localisation intracellulaire de *S. aureus* est indispensable à l'induction de la mort cellulaire [192].

Les facteurs de virulence requis pour induire une mort apoptotique semblent être sous dépendance de « *agr* » et du facteur sigma alternatif  $\sigma_B$  [193]. Cependant *S. aureus* ne semble pas induire un seul type de mort cellulaire, et celle-ci semble dépendante de la souche, de la multiplicité d'infection et du stade de croissance de la souche étudiée [194]. Malgré l'ensemble de ces connaissances, la pathogénèse de *S. aureus* et sa capacité de persistance sous forme de SCV dans les cellules épithéliales mammaires restent mal comprises, notamment par absence de preuve *in vivo*.

## 2.4. Les facteurs de virulence et modes d'action

Le cycle infectieux de *S. aureus* révèle deux grandes étapes, la colonisation et la dissémination vers d'autres tissus, cette dernière impliquant la mise en place de mécanismes

d'échappement et de lutte contre le système immunitaire. Les facteurs de virulence de *S. aureus* répondent à ces différentes étapes et leur expression est séquentielle [195]. Chez *S. aureus*, les facteurs de colonisation sont d'abord exprimés puis les facteurs de virulence sécrétés contribuant à la dissémination du pathogène dans l'organisme prennent le relais. Cette régulation fine entre facteurs de colonisation et facteurs de virulences se fait notamment via le quorum-sensing et le système « agr ».

#### **2.4.1. Les MSCRAMMs: « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules »**

*S. aureus* exprime certains facteurs de virulence à sa surface telles les adhésines qui appartiennent à la famille des MSCRAMMs (« Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules »). Ces protéines de surface permettent l'attachement de *S. aureus* à des composants de la matrice extracellulaire ou aux vaisseaux sanguins et contribuent ainsi à la colonisation de l'hôte.

La protéine A est l'une des adhésines les mieux caractérisées chez *S. aureus*. Elle est capable de se lier au facteur de von Willebrand, un petit peptide présent au niveau de l'endothélium lésé [196]. Il peut, de ce fait, jouer un rôle dans l'adhésion bactérienne en début d'infection. De plus, la protéine A possède un domaine de liaison capable de se fixer sur le fragment constant (Fc) des immunoglobulines et d'inhiber ainsi la phagocytose par les polynucléaires. La protéine A est également fortement antigénique et a montré une induction d'une réponse inflammatoire en modèle d'infusion intramammaire [197].

#### **2.4.2. Les SERAMs : « Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules »**

Les protéines appartenant aux SERAMs (« Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules ») peuvent se fixer par des liaisons non covalentes, essentiellement de type hydrophobe, aux protéines de la matrice extracellulaire comme le fibrinogène, la fibronectine, l'élastine... Ces protéines sont impliquées dans de nombreux types d'infections. Parmi ces protéines on peut citer Eap (« extracellular adherence protein »), Emp (« extracellular matrix binding protein »), Efb (« extracellular fibrinogene binding protein ») ainsi que la coagulase .

### 2.4.3. Les toxines

*S. aureus* s'appuie sur un large panel d'enzymes extracellulaires et de toxines capables d'endommager la membrane cellulaire ou les fonctions cellulaires. La majorité des souches de *S. aureus* produit des toxines hémolytiques (hémolysines), ayant une action cytotoxique sur de nombreuses cellules eucaryotes, notamment les globules rouges et les plaquettes. Chez *S. aureus*, on distingue les hémolysines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . *S. aureus* produit également des exfoliatines (ou toxines épidermolytiques) et des leucotoxines comme la Leucocidine de Panton Valentine (PVL) qui fait partie de la famille des toxines synergohyménotropes (comme l'hémolysine  $\gamma$ ) et dont le rôle est controversé dans certaines infections.

### 2.4.4. Les entérotoxines

Les entérotoxines staphylococciques appartiennent à la famille des protéines pyrogéniques. Cette famille de protéines présente des propriétés biologiques communes : pyrogénicité, activation de lymphocytes T. Elles possèdent aussi une activité émétique qui les rend responsables des symptômes associés aux toxi-infections staphylococciques (vomissements, diarrhées, crampes abdominales, prostration...). Les gènes spécifiant ces entérotoxines sont tous portés par des éléments génétiques mobiles (îlots de pathogénicité, prophage, plasmide), à l'exception du gène *se/X* (codant pour une entérotoxine-like de type X) récemment identifié sur le génome central et qui présente par ailleurs des variants en fonction de l'origine humaine ou bovine de la souche [198]. Certains gènes d'entérotoxines sont regroupés en clusters (« enterotoxin gene clusters » ; egc) véritables nurseries de gènes à entérotoxines et dont la composition et la structure varient d'une souche à l'autre [199].

*S. aureus* possède également une capsule extracellulaire, ayant une structure polysaccharidique et produite par plus de 90 % des souches de *S. aureus* [200].

## 2.5. Interactions avec le système immunitaire

La contamination de la glande mammaire saine par *S. aureus* induit une réponse inflammatoire. Des infections expérimentales ont montré que la réaction inflammatoire se déclenche, en fonction de la souche et de la taille de l'inoculum, en quelques heures à quelques jours après inoculation. Cette inflammation déclenche le recrutement de polynucléaires neutrophiles puis de monocytes en masse, se traduisant par un comptage de CS dans le lait variable en fonction du temps mais dont la concentration peut dépasser le million de cellules

par millilitre [201]. La réponse inflammatoire de la glande mammaire est très variable en fonction du pathogène impliqué. Ainsi, les profils cytokiniques induits par des mammites à *S. aureus* ou à *E. coli* sont très différents [202]. La réponse à *S. aureus* se caractérise par la synthèse de TGF- $\beta$  et IL-8, des cytokines proinflammatoires [203].

Cette réponse varie aussi en fonction du type de mammite et les mammites subcliniques n'induisent que peu de cytokines pro-inflammatoires (IL- $\beta$  et TNF- $\alpha$  notamment) [204]. Ces cytokines participent à l'immunité de l'épithélium mammaire. Les cellules épithéliales mammaires en interaction avec *S. aureus* peuvent sécréter elles aussi des chimiokines de types IL-8 et TNF- $\alpha$  [205]. Cette capacité de sécrétion est aujourd'hui de mieux en mieux caractérisée et des études récentes ont démontré la présence de « Toll Like Receptor » de type 2 et 4 à la surface des cellules épithéliales. Par conséquent, les cellules épithéliales mammaires jouent un rôle essentiel de sentinelles dans la glande mammaire.

Bien que participant à l'immunité de l'hôte, les réponses humorales sont pourtant limitées contre *S. aureus*. Le complément n'est pas bactéricide sur *S. aureus* et la lactoferrine est peu opérationnelle en milieu lait en raison des fortes concentrations en citrate. Parmi les défenses solubles, les défensines sont des peptides inhibiteurs de pathogènes. De nombreux travaux ont identifié l'existence et l'expression de défensines bovines dans la glande mammaire. Parmi les défensines les mieux caractérisées dans la glande mammaire, on peut citer la « Tracheal Antimicrobial Peptide », la « Lingual Antimicrobial Peptide » ou encore la « Béta Defensin 5 » (BNBD 5) [206].

De son côté, *S. aureus* possède des mécanismes de résistance aux défenses humorales. Ainsi, certaines souches sont capables d'exprimer une capsule qui leur confère une protection contre la reconnaissance par les anticorps. Ces polysides capsulaires (majoritairement de type 5 et 8 chez les souches bovines) réduisent l'activité bactéricide et l'opsonisation par les polymorphonuclear leukocytes (=PMN) [207]. De même, la protéine A, la capacité de fixer les anticorps par leur fragment Fc, empêchant ainsi leur activité opsonisante [208]. *S. aureus* possède également un arsenal de toxines ciblant notamment les cellules du système immunitaire. L' $\alpha$ -toxine, exerce un effet toxique spécifique contre les neutrophiles. Cependant, les toxines les plus agressives pour les phagocytes sont les leucotoxines (toxines à deux composants formant des pores transmembranaires). Parmi ces leucotoxines, il y a les hémolysines mais surtout LukM/F très cytotoxique pour les neutrophiles des ruminants [209].



## **BIBLIOGRAPHIE :**

[01]-GOUET (Ph.), CONTREPOIS (M.) et DUBOURGUIER (M.C.)-La microflore intestinale banale et pathogène du veau nouveau-né. Caractères propres à la microflore lactique et aux E. Coli entéropathogènes. Bull. G.T.V., 1980, 189, 35-45.

[02]- ALEXANDER (M.)-Microbiol ecology. John Wiley and sons. New York and Chichester, 1971.

[03]- NAYLOR (J.M)-Neonatal ruminant diarrhea- Large Animal Internal Medicine, Edition Mosby, 3ème édition, 2001, 350-365.

[04]-SMITH (H.W.)-Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. J. Path. Bact., 1965, 89, 95-122.

[05]-CONTREPOIS (M.) et GOUET (Ph.)-La microflore du tube digestif du jeune veau préruminant. Dénombrement de quelques groupes bactériens à différents niveaux du tube digestif. Ann. Rech. Vét., 1973, 4, 161-170.

[06]-NIELSON (N.O.), MOON (H.W.),ROE (W.E.)-Enteric colibacillosis in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1968, 153, 1590-1606.

[07]-SMITH (H.W.), LINGGOOD (M.A.)-Further observations on E. Coli enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains : The transmissible nature of three enterotoxins and of K antigen possessed by calf and lamb strains. J. Med. Microbiol., 1972, 5, 243-250.

[08]-CONTREPOIS (M.) et GOUET (Ph.)-Etiologie des colibacillooses chez les bovins. Rec. Méd. Vét., 1983, 159(3), 159-166.

[09]-MORRIS (J.A.), THORNS (J.), SOJKA (W.J.)-Evidence for two adhesive antigens on the K99. Reference strain Escherichia Coli B 41. J. Gen. Microbiol., 1980, 118, 107113.

[10]-GIRARDEAU (J.P.), DUBOURGUIER (M.C.) et CONTREPOIS (M.)-Attachement des E. Coli entéropathogènes à la muqueuse intestinale. Bull. G.T.V., 1980, 190, 49-60.

[11]-VAN MIERT (A.S.), FRENS (J.)-The reactions of different animal species bacterial pyogens. Zool. Vet. Med., 1968, 15, 532-543.

[12]-DUBOURGUIER (M.C.), CONTREPOIS (M.) et GOUET (Ph.)-Sécrétion et action des entérotoxines. G.T.V. Vichy, 25 oct. 1979, 191, 61-71.

[13]-CONTREPOIS (M.) et GOUET (Ph.)-Etiologie des colibacilloses chez les bovins. Rec. Méd. Vét., 1983, 159(3), 159-166.

[14]-RADOSTITS (O.M.), GAY (C.C.), BLOOD (D.C.) et HINCHCLIFF (K.W.)-Collibacillosis of newborn calves, piglets, lambs, kids, and foals. In Veterinary Medicine, Edition Saunders, 9ème Edition, 2001, Part. I-6, 783-802.

[15]-BYWATER (R.J.)-Aspects physiopathologiques des flux d'eau, du glucose et des ions dans l'intestin du veau. Journées G.T.V. le Donjon du 14 octobre 1977, Document Beecham, 35-39.

[16]-MEANS (A.R.), DEDMAN (J.R.)-Calmodulin, an intracellular calcium receptor. Nature, 1980, 285, 73-77.

[17]-CHEUNG (W.Y.)-Calmodulin, Scientific American, 1982, 246, 48-56.

[18]-RADOSTITS (O.M.), GAY (C.C.), BLOOD (D.C.) et HINCHCLIFF (K.W.)-Enteritis (Including malabsorption, enteropathy and diarrhea). In Veterinary Medicine, Edition Saunders, 9ème Edition, 2001, Part. I-6, 235-246.

[19]-POHL P. – Les souches pathogènes d'Escherichia coli, histoire et classification – Ann. Rech. Vét. 1993 ; 137 : 325-333.

[20]-POPOFF MY, BOCKEMUHL J, Supplement 2002 to the Kauffmann-White scheme, Res. Microbiol., 2004, 155(7), 568-570.

[21]-LE MINOR L, Taxonomie et nomenclature des Salmonella, Méd. Mal. Infect, 1992, 22, 246-248.

[22]-SCHMIDT H. ET M. HENSEL. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2004; 17(1):14-56.

[23]-YOON S.H., Y.K. PARK, S. LEE, D. CHOI, T.K. OH, C.G. HUR ET J.F. KIM. Towards pathogenomics: a web-based resource for pathogenicity islands. Nucl Acids Res 2007; 35(suppl\_1):D395-400.

[24]-LIBBY S.J., T.A. HALSEY ET C. ALTIER. SALMONELLA. IN: GYLES CL, PRESCOTT JF, SONGER JG ET AL., EDS. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3rd ed. Ames, IA: Blackwell Publishing Professional, 2004; pp.143-167.

[25]-ALLEN SD. Clostridium. In: Murray, P.R. Baron, E.J. Jorgensen, J.H. Manual of clinical microbiology. 8 ed; 2003. p. 835-856

[26]-HATHEWAY CL. Toxigenic clostridia. Clin Microbiol Rev 1990;3:66-98.

[27]-COLLINS MD, LAWSON PA, WILLEMS A, CORDOBA JJ. The phylogeny of the genus Clostridium : proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int J Syst Bacteriol 1994;44(4):812-826.

[28]-PRAZMOWSKI A. Untersuchung über die entwicklungsgeschichte und fermentwirkung einiger Bakterien. In: Arten HV, editor. Leipzig, Germany; 1880.

[29]-CATO EP, Stackebrandt. Taxonomy and phylogeny. In: N.P. Minton and D.J. Clark. Clostridia. Plenum Press ed. New York; 1989. p. 1-26.

[30]-SEDALLIAN A. CLOSTRIDIUM AUTRES QUE C. DIFJICILE. IN: FRENEY, J. RENAUD, F. HANSEN, W. ET AL. Manuel de bactériologie clinique. 2 ed; 1994. p. 1589-1600.

[31]-POPOFF MR. Clostridium. In: Eyquem, A. Alouf, J. Montagnier, L. Traité de microbiologie; 1998. p. 63 1-650.

[32]-SEBALD M, PETIT JC. Institut Pasteur. Méthodes de laboratoire . Bactéries anaérobies et leur identification. 2 ed; 1997.

[33]-LI, J., ADAMS, V., BANNAM, T.L., MIYAMOTO, K., GARCIA, J.P., UZAL, F.A., ET AL. (2013). Toxin plasmids of Clostridium perfringens. Microbiol Mol Biol Rev, 77, 208-233. doi: 10.1128/MMBR.00062-12

[34]-MORRIS, W.E. & FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E. (2009). Toxins of Clostridium perfringens. Rev Argent Microbiol, 41, 251-260.

[35]-CAVALCANTI, M.T.H., PORTO, T., FIGUEIREDO PORTO, A.L., BRANDI, I.V., DE LIMA FILHO, J.L. & PESSOA JUNIOR, A. (2004). Large scale purification of Clostridium perfringens toxins: a review. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 40.

[36]-SAKURAI, J., NAGAHAMA, M. & ODA, M. (2004). Clostridium perfringens alpha-toxin: characterization and mode of action. J Biochem, 136, 569-574. doi: 10.1093/jb/mvh161

[37]-PETIT, L., GIBERT, M. & POPOFF, M.R. (1999). Clostridium perfringens: toxinotype and genotype. Trends Microbiol, 7, 104-110.

[38]-KEYBURN, A.L., SHEEDY, S.A., FORD, M.E., WILLIAMSON, M.M., AWAD, M.M., ROOD, J.I., ET AL. (2006). Alpha-toxin of Clostridium perfringens is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. Infect Immun, 74, 6496-6500. doi: 10.1128/IAI.00806-06

[39]-KEYBURN, A.L., BOYCE, J.D., VAZ, P., BANNAM, T.L., FORD, M.E., PARKER, D., ET AL. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by Clostridium perfringens. PLoS Pathog, 4, e26. doi: 10.1371/journal.ppat.0040026

[40]-AUTHEMAN, D., WYDER, M., POPOFF, M., D'HERDE, K., CHRISTEN, S. & POSTHAUS, H. (2013). Clostridium perfringens Beta-Toxin Induces Necrostatin-Inhibitable,

Calpain-Dependent Necrosis in Primary Porcine Endothelial Cells. PLoS One, 8, e64644. doi: 10.1371/journal.pone.0064644

[41]-FREEDMAN, J.C., THEORET, J.R., WISNIEWSKI, J.A., UZAL, F.A., ROOD, J.I. & MCCLANE, B.A. (2015). Clostridium perfringens type A-E toxin plasmids. Res Microbiol, 166, 264-279. doi: 10.1016/j.resmic.2014.09.004

[42]-MATSUDA, T., OKADA, Y., INAGI, E., TANABE, Y., SHIMIZU, Y., NAGASHIMA, K., ET AL. (2007). Enteritis necroticans 'pigbel' in a Japanese diabetic adult. Pathol Int, 57, 622-626. doi: 10.1111/j.1440-1827.2007.02149.x

[43]-PETRILLO, T.M., BECK-SAGUE, C.M., SONGER, J.G., ABRAMOWSKY, C., FORTENBERRY, J.D., MEACHAM, L., ET AL. (2000). Enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic child. N Engl J Med, 342, 1250-1253. doi: 10.1056/NEJM200004273421704

[44]-GIBERT, M., JOLIVET-REYNAUD, C. & POPOFF, M.R. (1997). Beta2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens. Gene, 203, 65-73.

[45]-VAN ASTEN, A.J., NIKOLAOU, G.N. & GRONE, A. (2010). The occurrence of cpb2-toxigenic Clostridium perfringens and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. Vet J, 183, 135-140. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.11.005

[46]-CRESPO, R., FISHER, D.J., SHIVAPRASAD, H.L., FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E. & UZAL, F.A. (2007). Toxinotypes of Clostridium perfringens isolated from sick and healthy avian species. J Vet Diagn Invest, 19, 329-333.

[47]-GILL, D.M. (1982). Bacterial toxins: a table of lethal amounts. Microbiol Rev, 46, 86-94.

[48]-STEBBINS, M. (2007). U.S. Government Lists of Bioterrorism Agents and Diseases Retrieved August 12th, 2013

[49]-BOKORI-BROWN, M., SAVVA, C.G., FERNANDES DA COSTA, S.P., NAYLOR, C.E., BASAK, A.K. & TITBALL, R.W. (2011). Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J*, 278, 4589-4601. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x

[50]-POPOFF, M.R. (2011). Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS J*, 278, 4602-4615. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x

[51]-SAKURAI, J., NAGAHAMA, M., ODA, M., TSUGE, H. & KOBAYASHI, K. (2009). *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins (Basel)*, 1, 208-228. doi: 10.3390/toxins1020208

[52]-CHEN, J., MA, M., UZAL, F.A. & MCCLANE, B.A. (2014). Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections. *Gut Microbes*, 5, 96-107. doi: 10.4161/gmic.26419

[53]-BARTH, H. & STILES, B.G. (2008). Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. *Curr Med Chem*, 15, 459-469.

[54]-VESHNYAKOVA, A., PROTZE, J., ROSSA, J., BLASIG, I.E., KRAUSE, G. & PIONTEK, J. (2010). On the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudins. *Toxins (Basel)*, 2, 1336-1356. doi: 10.3390/toxins2061336

[55]-LINDSTROM, M., HEIKINHEIMO, A., LAHTI, P. & KORKEALA, H. (2011). Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol*, 28, 192-198. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.020

[56]-KITADOKORO, K., NISHIMURA, K., KAMITANI, S., FUKUI-MIYAZAKI, A., TOSHIMA, H., ABE, H., ET AL. (2011). Crystal structure of *Clostridium perfringens* enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. *J Biol Chem*, 286, 19549-19555. doi: 10.1074/jbc.M111.228478

[57]-KEYBURN, A.L., YAN, X.X., BANNAM, T.L., VAN IMMERSEEL, F., ROOD, J.I. & MOORE, R.J. (2010). Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet Res*, 41, 21. doi: 10.1051/vetres/2009069

[58]-AMIMOTO, K., NORO, T., OISHI, E. & SHIMIZU, M. (2007). A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology*, 153, 1198-1206. doi: 10.1099/mic.0.2006/002287-0

[59]-PAREDES-SABJA, D., SARKER, N. & SARKER, M.R. (2011). *Clostridium perfringens* tpeL is expressed during sporulation. *Microb Pathog*, 51, 384-388. doi: 10.1016/j.micpath.2011.05.006

[60]-GUTTENBERG, G., HORNEI, S., JANK, T., SCHWAN, C., LU, W., EINSLE, O., ET AL. (2012). Molecular characteristics of *Clostridium perfringens* TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells. *J Biol Chem*, 287, 24929-24940. doi: 10.1074/jbc.M112.347773

[61]-NAGAHAMA, M., OHKUBO, A., KINOUCI, Y., KOBAYASHI, K., MIYAMOTO, K., TAKEHARA, M., ET AL. (2015). *Clostridium perfringens* TpeL Induces Formation of Stress Fibers via Activation of RhoA-ROCK Signaling Pathway. *Biol Pharm Bull*, 38, 732-739. doi: 10.1248/bpb.b14-00842

[62]-COURSODON, C.F., GLOCK, R.D., MOORE, K.L., COOPER, K.K. & SONGER, J.G. (2012). TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe*, 18, 117-121. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.10.001

[63]-PEWE K., 1992. Contribution à l'étude de la tuberculose bovine au Togo. Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 24

[64]-BOURDON J. L. ; MARCHAL N. ; PILET CH. ET TOMA B., 1975. Bactériologie Médicale et Vétérinaire : Systématique bactérienne : Les Bacilles Acido-alcool-résistants. Paris : Doin Editeurs. – 489p.

[65]-ZANELLA G., 2007. Tuberculose bovine dans une population de cerfs et de sangliers sauvages: Epidémiologie et modélisation. Thèse de Doctorat, Université Paris XI, France, 199 p.

[66]-NEILL S.D., O'BRIEN J.J., HANNA J., 1991. A mathematical model for Mycobacterium bovis excretion from tuberculous cattle. *Veterinary Microbiology*, 28: 103-109.

[67]-PHILLIPS C.J.C., FOSTER C.R.W., MORRIS P.A., TEVERSON R., 2003. The transmission of Mycobacterium bovis infection to cattle. *Res. Vet. Sci.*, 74: 1 – 15.

[68]-PRITCHARD D.G., 1988. A Century of bovine tuberculosis 1888 - 1988: Conquest and Controversy. *Journal of Comparative Pathology*, 99: 357 - 388.

[69]-CASSIDY J.P., BRYSON D.G., POLLOCK J.M., EVANS R.T., FOSTER F., NEILL S.D., 1998. Early lesion formation in cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis. *J. Comp. Pathol.*, 19: 27–44.

[70]-MENZIES F.D., NEILL S.D., 2000. Cattle to Cattle transmission of bovine tuberculosis. *The veterinary Journal*, 160 (6): 92 – 106.

[71]- KAZWALA R.R., DABORN C.J., KUSILUKA L.J., JIWA S.F., SHARP J.M., KAMBARAGE DM., 1998. Isolation of Mycobacterium species from raw milk of pastoral cattle of the Southern high lands of Tanzania. *Trop. Anim. Health. Prod.*, 30 : 233 – 239.

[72]-OLOYA J., OPUDA-ASIBO J., DJONNE B., MUMA J.B., MATOPE G., KAZWALA R., SKJERVE E., 2006. Responses to tuberculin among Zebu cattle in the transhumance regions of Karamoja and Nakasongola district of Uganda. *Trop. Anim. Health Prod.* 38: 275–283.

[73]-JACKSON R., COOKE M.M., COLEMA J.D., MORRIS R.S., 1995. Naturally occurring tuberculosis caused by Mycobacterium bovis in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*): I. An epidemiological analysis of lesion distribution. *New Zeal Vet. J.* 43 (7): 306 - 314.

[74]-PERPEZA A., 1963. Importance du farcin chez le zébu du Tchad. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 56: 375 – 383.

[75]-LUGTON I., PFEIFFER D., JACKSON R., MORRIS R., 1997. Stress and the Epidemiology of tuberculosis in Possums. *Epidémiol. Santé anim.*, 31 - 32.

[76]-MICHEL A.L., 2002. Implications of tuberculosis in African wildlife and livestock. The domestic animal/wildlife interface. Issues for disease control, conservation, sustainable food production and emerging diseases. *Ann NY Acad. Sci.*, 969: 251-255.

[77]-RENWICK A.R., WHITE P.C., BENGIS R.G., 2006. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. *Epidemiol Infect.* 1-12.

[78]-CLEAVELAND S., MLENGEYA T., KAZWALA R.R., MICHEALI A., KAARE M.T., JONES S.L., 2005. Tuberculosis in Tanzanian wildlife. *J. Wildl. Dis.* 41: 446 - 453.

[79]-HOPE J.C., THOM M.L., VILLARREAL-RAMOS B., VORDERMEIER H.M., HOWARD C.J., 2005. Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against challenge with virulent *Mycobacterium bovis*. *Clinical and Experimental Immunology*, 139 - 148.

[80]-FRANCIS J., 1958. *Tuberculosis in Animals and Man*. Cassll and Co, London.

[81]-O'REILLY L.M., DABORN C.J., 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuberc. Lung Dis.*, 76: 1 – 46.

[82]-MALO D., SKAMENE, 1994. Genetic control of host resistance to infection. *TIG.*, 10: 365 –371.

[83]-BLACKWELL J.M., BARTON C.H., WHITE J.K., ROACH T.I.A., SHAW M.A., WHITEHEAD S.H., MOCK B.A., SEARLE S., WILLIAMS H., BAKER A.M., 1994. Genetic regulation of Leishmanial and mycobacterial infection: the Lsh/TtyIBcg gen story continues. *Immunol. Lett.*, 43: 99-107.

[84]-FENG J., YUJING L., HASHAD M., ERWIN S., GROS P., GARRY A.L., JEO TEMPLETON W., 1996. Bovine natural Resistance Associated Macrophage Protein 1 (Nramp1) gen. *Genome Res.*, 9: 956 – 964.

[85]-BENET J.J., 2006. La tuberculose animale. In: *Polycopie des Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises*, 96p.

[86]-POLLOCK J.M., WELSH M.D., 2002. The WC1 gama delta population in cattle – A possible role in resistance to intracellular infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 89 (3-4): 104 – 114.

[87]-POLLOCK J.M., NEILL S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.*, 163: 115 – 127.

[88]-ROOK G.A., HERMANDEZ – PANDO R., 1996. The pathogenesis of tuberculosis. *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 259 – 284.

[89]-POTGIETER L.N.D., 1988. Immunosuppression in cattle as a result of bovine viral diarrhea virus infection. *Agri-Practice* 9: 7 - 14.

[90]-MICHAEL D., NEIL D.W., BRYCE M.D., 2005. INF- $\gamma$  enhances bovine macrophage responsiveness to *Mycobacterium bovis*: Impact on bacterial replication, cytokine release and macrophage apoptosis. *Immunology and Cell Biology.*, 83: 643 -650.

[91]-RITACCO V., LOPEZ B., De KANTOR I.N., BARRERA L., ERRICO F., NADER A., 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 50: 365 –367.

[92]-CASSIDY J.P., BRYSON T.D., GUTIERREZ M.M., FOSTER F., POLLOCK J.M., NEILL S.D., 2001. Lymphocytes subsets in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. *J. Comp. Pathol.* 124: 46 – 51.

[93]-POLLOCK J.M., WELSH M.D., McNAIR J., 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: toward new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet. Immunol. Immuopathol.*, 108: 37-43.

[94]-POLLOCK J.M., POLLOCK D.A., CAMPBELL D.G., GIRVIN R.M. CROCKARD A.D., NEILL S.D., MACKIE D.P., 1996. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology*, 87: 236 – 241.

[95]-SKINNER M.A., PALMER N., McCARTHY A., BUDDLE B.M., 2003. Cytotoxic T-cell responses to *Mycobacterium bovis* during experimental infection of cattle with bovine tuberculosis. *Immunology* 110: 234 – 241.

[96]-SMYTH A.J., WELSH M.D., GIRVIN R.M., POLLOCK J.M., 2001. In vitro responsiveness of  $\gamma\delta$  T cells from *Mycobacterium bovis* infected cattle to mycobacterial antigens: Predominant involvement of WC1(+) cells. *Infect. Immunol.*, 69: 89 -96.

[97]-KENNEDY H.E., WELSH M.D., BRYSON D.G., CASSIDY J.P., FOSTER F.I., HOWARD C.J., COLLINS R.A., POLLOCK J.M., 2002. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1(+) gamma delta T cells. *Infect. Immun.* 70: 1488 – 1500.

[98]-LYASHCHENKO K.P., SINGH M., COLANGELI R., GENNARO M.L., 2000. A multi-antigen print immunoassay for development of serological diagnosis of infectious disease. *J. Immunol. Meth.* 242: 91 – 100.

[99]-KRIEG N. LUDWIG W. WHITMAN W. HEDLUND B. PASTER B. STALEY J et al. (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - 2nd revised Edition - Volume 4.* Springer-Verlag New York Inc.. 974 pages.

[100]-RAZIN S and HAYFLICK L (2010). Highlights of mycoplasma research-an historical perspective. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 38. 183-190.

[101]-RAZIN S. YOGEV D and NAOT Y (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62. 1094-1156.

[102]-STIPKOVITS L. RIPLEY PH. TENK M et al (2001). Use of valnemuliii in the control of *Mycoplasma bovis* infection under field conditions. *Veterinary Record*, 148. 399-402.

[103]-ARCANGIOLI MA. DUET A. MEYER G DERNBURG A. BEZILLE P, POUMARAT F and LEGRAND D (2008). The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *Veterinary Journal*, 177. 89-93.

[104]-MAUNSELL F and DONOVAN (2009). *Mycoplasma bovis* Infections in Young Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25. 139-177.

[105]-LAMM CG, MUNSON L. THURMOND MC. BARR BC and GEORGE LW (2004). *Mycoplasma Otitis* in California Calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16. 397-402.

[106]-LEMARCHAND F. FANUEL R GASNIER R and ASSÈ S (2007). Conduite à tenir lors de suspicion de Mycoplasmosse chez le taurillon. *Bulletin des G7Yn*°39. 37-43.

[107]-MCAULIFFE L, ELLIS RJ. MILES K. AYLING RD and NICHOLAS RAJ (2006). Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology* . 152. 913 -922.

[108]-RAZIN S. YOGEV D and NAOT Y (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62. 1094-1156.

[109]-SANCHIS R. ABADIE G. LAMBERT M. CABASSE E. DUFOUR R GUIBERT JM and PEPIN M (2000). Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae*: comparative pathogenicity of six field strains. *Veterinary Research*, 31, 329-337.

[110]-BERGONIER D, BERTHELOT X and POUMARAT F (1997). Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 16: 848-873.

[111]-MESEGUER MA, ÁLVAREZ A, REJAS MT, SÁNCHEZ C, PÉREZ-DÍAZ JC, BAQUERO F. *Mycoplasma pneumoniae*: a reduced-genome intracellular bacterial pathogen. *Infection, Genetics and Evolution* 3: 47-55, 2003.

[112]-KANNAN TR, PROVENZANO D, WRIGHT JR, BASEMAN JB. Identification and characterization of human surfactant protein A binding protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* 73: 2828-2834, 2005.

[113]-HANSEN EJ, WILSON RM, BASEMAN JB. Isolation of mutants of *Mycoplasma pneumoniae* defective in hemadsorption. *Infect. Immun.* 23: 903-906, 1979.

[114]-HALBEDEL S, STÜLKE J. Tools for the genetic analysis of mycoplasma. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 37-44, 2007.

[114]-HUTCHISON CA, PETERSON SN, GILL SR, CLINE RT, WHITE O, FRASER CM, SMITH HO, VENTER JC. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* 286: 2165-2169, 1999.

[115]-HENSEL M, SHEA JE, GLEESON C, JONES MD, DALTON E, HOLDEN DW. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269: 400-403, 1995.

[116]-AUTRET N, CHARBIT A. Lessons from signature\_tagged mutagenesis on the infectious mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 29: 703-717, 2005.

[117]-MUDAHI-ORENSTEIN S, LEVISOHN S, GEARY SJ, YOGEV D. Cytadherence-deficient mutants of *Mycoplasma gallisepticum* generated by transposon mutagenesis. *Infect. Immun.* 71: 3812-3820, 2003.

[118]-CITTI C, NOUVEL L-X, BARANOWSKI E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol* 5: 1073-1085, 2010.

[119]-CITTI C, WISE KS. *Mycoplasma hyorhinis* vlp gene transcription: critical role in phase variation and expression of surface lipoproteins. *Mol. Microbiol.* 18: 649-660, 1995.

[120]-MARKHAM PF, GLEW MD, SYKES JE, BOWDEN TR, POLLOCKS TD, BROWNING GF, WHITHEAR KG, WALKER ID. The organisation of the multigene family which encodes the major cell surface protein, pMGA, of *Mycoplasma gallisepticum*. *FEBS Lett.* 352: 347-352, 1994.

[121]-BHUGRA B, VOELKER LL, ZOU N, YU H, DYBVIG K. Mechanism of antigenic variation in *Mycoplasma pulmonis*: interwoven, site-specific DNA inversions. *Mol. Microbiol.* 18: 703-714, 1995.

[122]-RÖSKE K, BLANCHARD A, CHAMBAUD I, CITTI C, HELBIG JH, PREVOST MC, ROSENGARTEN R, JACOBS E. Phase variation among major surface antigens of *Mycoplasma penetrans*. *Infect. Immun.* 69: 7642- 7651, 2001.

[123]-NOORMOHAMMADI AH, MARKHAM PF, KANCI A, WHITHEAR KG, BROWNING GF. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Mol. Microbiol.* 35: 911-923, 2000.

[124]-GLEW MD, MARENDA M, ROSENGARTEN R, CITTI C. Surface diversity in *Mycoplasma agalactiae* is driven by site-specific DNA inversions within the vpma multigene locus. *J. Bacteriol.* 184: 5987-5998, 2002.

[125]-RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1094-1156, 1998.

[126]-RAZIN S, JACOBS E. *Mycoplasma* adhesion. *J. Gen. Microbiol.* 138: 407-422, 1992.

[127]-ZIMMERMANN L, PETERHANS E, FREY J. RGD motif of lipoprotein T, involved in adhesion of *Mycoplasma conjunctivae* to lamb synovial tissue cells. *J. Bacteriol.* 192: 3773-3779, 2010.

[128]-BASEMAN JB, COLE RM, KRAUSE DC, LEITH DK. Molecular basis for cytoadsorption of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 151: 1514-1522, 1982.

[129]-FLEURY B, BERGONIER D, BERTHELOT X, PETERHANS E, FREY J, VILEI EM. Characterization of P40, a cytoadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. *Infect. Immun.* 70: 5612-5621, 2002.

[130]-LO SC, HAYES MM, KOTANI H, PIERCE PF, WEAR DJ, NEWTON PB 3RD, TULLY JG, SHIH JW. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by mycoplasma penetrans: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Mod. Pathol.* 6: 276-280, 1993.

[131]-TAYLOR-ROBINSON D, DAVIES HA, SARATHCHANDRA P, FURR PM. Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *Int. J. Exp. Pathol.* 72: 705-714, 1991.

[132]-GIRÓN JA, LANGE M, BASEMAN JB. Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect. Immun.* 64: 197-208, 1996.

[133]-DALLO SF, KANNAN TR, BLAYLOCK MW, BASEMAN JB. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 46: 1041-1051, 2002.

[134]DZIEWANOWSKA K, CARSON AR, PATTI JM, DEOBALD CF, BAYLES KW, BOHACH GA. Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect. Immun.* 68: 6321-6328, 2000.

[135]-WINNER F, ROSENGARTEN R, CITTI C. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immun.* 68: 4238-4244, 2000.

[136]-GEARY SJ, TOURTELLOTTE ME, CAMERON JA. Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis*: isolation and characterization. *Science* 212: 1032-1033, 1981.

[137]-MATSUMOTO M, NISHIGUCHI M, KIKKAWA S, NISHIMURA H, NAGASAWA S, SEYA T. Structural and functional properties of complement-activating protein M161Ag, a *Mycoplasma fermentans* gene product that induces cytokine production by human monocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 12407 -12414, 1998.

[138]-COLE B, KNUDTSON K, OLIPHANT A, SAWITZKE A, POLE A, MANOHAR M, BENSON LS, AHMED E, ATKIN C. The sequence of the *Mycoplasma arthritis* superantigen, MAM: identification of functional domains and comparison with microbial superantigens and plant lectin mitogens. *J. Exp. Med.* 183: 1105-1110, 1996.

[139]-RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1094-1156, 1998.

[140]-LAI WC, BENNETT M, GORDON BE, PAKES SP. Protection of mice against experimental murine mycoplasmosis by a *Mycoplasma pulmonis* immunogen in lysogenized *Escherichia coli*. *Vaccine* 12: 291-298, 1994.

[141]-FRANZOSO G, DIMITROV DS, BLUMENTHAL R, BARILE MF, ROTTEM S. Fusion of *Mycoplasma fermentans* strain incognitus with T-lymphocytes. *FEBS Lett.* 303: 251-254, 1992.

[142]-CIZELJ I, BERCIC RL, DUSANIC D, NARAT M, KOS J, DOVC P, BENCINA D. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* express a cysteine protease CysP, which can cleave chicken IgG into Fab and Fc. *Microbiology* 157: 362-372, 2011.

[143]-ROSATI S, ROBINO P, FADDA M, POZZI S, MANNELLI A, PITTAU M. Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. *Vet. Microbiol.* 71: 201-210, 2000.

[144]-KOSTYAL DA, BUTLER GH, BEEZHOLD DH. A 48-kilodalton *Mycoplasma fermentans* membrane protein induces cytokine secretion by human monocytes. *Infect. Immun.* 62: 3793-3800, 1994.

[145]-KANNAN TR, BASEMAN JB. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumonia* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 6724-6729, 2006.

[146]-KANNAN TR, PROVENZANO D, WRIGHT JR, BASEMAN JB. Identification and characterization of human surfactant protein A binding protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* 73: 2828-2834, 2005.

[147]-KRUEGER KM, BARBIERI JT. The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 34-47, 1995.

[148]-BROWN DR, ZACHER LA, FARMERIE WG. Spreading factors of *Mycoplasma alligatoris*, a flesh-eating mycoplasma. *J. Bacteriol.* 186: 3922-3927, 2004.

[149]-VILEI EM, FREY J. Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: Its impact on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and virulence. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 85-92, 2001.

[150]-KHAN LA, MILES RJ, NICHOLAS RAJ. Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of in vitro passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Vet. Res. Commun.* 29: 181-188, 2005.

[151]-KOMADA Y, ZHANG XL, ZHOU YW, IDO M, AZUMA E. Apoptotic cell death of human T lymphoblastoid cells induced by arginine deiminase. *Int. J. Hematol.* 65: 129-141, 1997.

[152]-FENG SH, LO SC. Lipid extract of *Mycoplasma penetrans* proteinase K-digested lipid-associated membrane proteins rapidly activates NF-kappaB and activator protein 1. *Infect. Immun.* 67: 2951-2956, 1999.

[153]-STUART PM, CASSELL GH, WOODWARD JG. Differential induction of bone marrow macrophage proliferation by mycoplasmas involves granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect. Immun.* 58: 3558-3563, 1990.

[154]-FOGH J, FOGH H. Chromosome changes in PPLO-infected FL human amnion cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119: 233-238, 1965.

[155]-FOSTER G., OSTERMAN B.S., GODFROID J., et al., 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. For *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 11) : 2688-2693.

[156]-HUBÁLEK Z., SCHOLZ HC., SEDLÁČEK I. et al., 2008. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* Winter. 7(4) : 679-687.

[157]-SCHOLZ HC., NÖCKLER K., GÖLLNER C., BAHN P., et al., 2009. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* [Epub ahead of print].

[158]-OIE, 2005: Santé publique vétérinaire : Tendances futures. Rapport sur les réunions d'experts et groupes d'études [en ligne]: Accès Internet: [http://www.WHO.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB\\_111:feb11128.pdf](http://www.WHO.int/gb/ebwha/pdf_files/EB_111:feb11128.pdf)

[159]-FAO/WHO. Expert committee on brucellosis. Sixth report, technical report series n0740. Geneva : World Health Organization, 1986.

[160]-AVRIL J.L, DABERNAT H, DENIS F, et al; *Brucella*. in : *Bactériologie clinique*. Paris: Empses, 31èrne édition, 341-349.

[161]-GOOFROID J., CLOECKAERT A., LIACETARD J.P. et al., 2005. From the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been re-emergend zoonoses. *Véterinary.Research*, 36:313-326.

[162]-RUBEN B., BAND J.D., WONG P. et COLVILLE J., 1991. La transmission humaine de *Brucella melitensis*. *Scient. Inf. Dis* ; 21 : 283-289

[163]-PALANDUZ A., PALANDUZ S., GULER K. et GULER N., 2000. Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. *Int. J. Infect. Dis.*, 4:55-56.

[164]-SAEGERMAN C., 2005. Epidémiologie des événements rares chez les bovins en Belgique. Thèse Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège 4000 Liège (Belgique) [en ligne] : [www.dnipfmv.ulg.ac.be/epidemiomet/These%20Saegerman](http://www.dnipfmv.ulg.ac.be/epidemiomet/These%20Saegerman).

[165]-ALTON G.G., FORSYTH J.R.L. *Brucella*. *Medmicro*, chapitre 28. <http://qsbs.utmb.edu/microbook/ch028.htm>. 2005.

[166]-CORBEL M. J. *Brucellosis : an Overview*. *Emerging Infectious Diseases* N°3, p.213-221. 1997.

[167]-HOOVER D., FRIEDLANDER A. *Brucellosis*. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. In Zajtchuk R, ed. *Textbook of Military Medicine*. Washington, DC: US Department of the Army, Surgeon General, and the Borden Institute, p.513-521.1997.

[168]-LISGARIS M.V. *Brucellosis*. *Emedicine*. 2005. <http://www.emedicine.com/med/topic248.htm>

[169]-KO J., SPLITTER G.A. *Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans*. *Clinical Microbiology Reviews* N° 16, p.65-78. 2003

[170]-LECLERQ H, MONSEL D.A.A. *Microbiologie, le tube digestif, l'eau et les aliments*. Edition DOIN. 1989.

[171]-GARRITY GM, JOHNSON KL, BELL J, SEARLES DB. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edn. Springer-verlag, New York (2002).

[172]-KLOOS, W. E., R. J. ZIMMERMAN, AND R. F. SMITH. 1976. Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(1):53-59.

[173]-ROBERSON, J.R., FOX, L.K., HANCOCK, D.D., GAY, J.M., BESSER, T.E., 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 77(11):3354-3364.

[174]-POUTREL, B., LERONDELLE, C., 1978. Induced staphylococcal infections in the bovine mammary gland. Influence of the month of lactation and other factors related to the cow. *Ann. Rech. Vet.* 9(1):119-128.

[175]-HEILMANN, C. 2011. Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv. Exp. Med. Biol.* 715:105-123.

[176]-OPDEBEECK, J. P., A. J. FROST, AND D. O'BOYLE. 1988. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 16(1):77-86.

[177]-PEACOCK, S. J., T. J. FOSTER, B. J. CAMERON, AND A. R. BERENDT. 1999. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology* 145 (12):3477-3486.

[178]-FROST, A. J., D. D. WANASINGHE, AND J. B. WOOLCOCK. 1977. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infect. Immun.* 15(1):245-253.

[179]-ALMEIDA, R. A., D. A. LUTHER, S. J. KUMAR, L. F. CALVINHO, M. S. BRONZE, AND S. P. OLIVER. 1996. Adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells and to extracellular matrix proteins. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 43(7):385-392.

- [180]-HENSEN, S. M., M. J. PAVICIC, J. A. LOHUIS, J. A. DE HOOG, AND B. POUTREL. 2000. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J. Dairy Sci.* 83(9):1966-1975.
- [181]-OGAWA, S. K., E. R. YURBERG, V. B. HATCHER, M. A. LEVITT, AND F. D. LOWY. 1985. Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 50(1):218-224.
- [182]-LAMMERS, A., P. J. NUIJTEN, E. KRUIJT, N. STOCKHOFE-ZURWIEDEN, U. VECHT, H. E. SMITH, AND F. G. VAN ZIJDERVELD. 1999. Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. *Vet. Microbiol.* 67(2):77-89.
- [183]-SINHA, B., AND M. FRAUNHOLZ. 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int. J. Med. Microbiol.* 300(2-3):170-175.
- [184]-KRUT, O., O. UTERMOHLEN, X. SCHLOSSHERR, AND M. KRONKE. 2003. Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect. Immun.* 71(5):2716-2723.
- [185]-ALEKSEEVA, L., L. RAULT, S. ALMEIDA, P. LEGEMBRE, V. EDMOND, V. AZEVEDO, A. MIYOSHI, S. EVEN, F. TAIEB, Y. RLOT-BONNEMAINS, LE LOIR Y. AND N. BERKOVA. 2013. *Staphylococcus aureus*-induced G2/M phase transition delay in host epithelial cells increases bacterial infective efficiency. *PLoS. One.* 8(5):e63279.
- [186]-ATALLA, H., C. GYLES, AND B. MALLARD. 2010. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 143(2-4):319-328.
- [187]-SENDI, P., AND R. A. PROCTOR. 2009. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* 17(2):54-58.
- [188]-BULGER, R. J., AND R. E. BULGER. 1967. Ultrastructure of small colony variants of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 94(4):1244-1246.

- [189]-MOISAN, H., E. BROUILLETTE, C. L. JACOB, P. LANGLOIS-BEGIN, S. MICHAUD, AND F. MALOUIN. 2006. Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J. Bacteriol.* 188(1):64-76.
- [190]-ATALLA, H., C. GYLES, AND B. MALLARD. 2008. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim. Health Res. Rev.* 12(1):33-45.
- [191]-QAZI, S. N., E. COUNIL, J. MORRISSEY, C. E. REES, A. COCKAYNE, K. WINZER, W. C. CHAN, P. WILLIAMS, AND P. J. HILL. 2001. agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect. Immun.* 69(11):7074-7082.
- [192]-IMRE, G., AND K. RAJALINGAM. 2012. Role for caspase-2 during pore-forming toxin-mediated apoptosis. *Cell Cycle* 11(20):3709-3710.
- [193]-HASLINGER-LOFFLER, B., B. C. KAHL, M. GRUNDMEIER, K. STRANGFELD, B. WAGNER, U. FISCHER, A. L. CHEUNG, G. PETERS, K. SCHULZE-OSTHOFF, AND B. SINHA. 2005. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell Microbiol.* 7(8):1087-1097.
- [194]-WESSON, C. A., L. E. LIOU, K. M. TODD, G. A. BOHACH, W. R. TRUMBLE, AND K. W. BAYLES. 1998. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect. Immun.* 66(11):5238-5243.
- [195]-SCHWARZ, D., U. S. DIESTERBECK, K. FAILING, S. KONIG, K. BRUGEMANN, M. ZSCHOCK, W. WOLTER, AND C. P. CZERNY. 2009. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany-A longitudinal study. *J. Dairy Sci.* 93(12):5716-5728.
- [196]-LOWY, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339(8):520-532.
- [197]-HARTLEIB, J., N. KOHLER, R. B. DICKINSON, G. S. CHHATWAL, J. J. SIXMA, O. M. HARTFORD, T. J. FOSTER, G. PETERS, B. E. KEHREL, AND M. HERRMANN. 2000.

Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*. 96(6):2149-2156.

[198]-KUMAR, D., J. J. CAWLEY, J. M. IRIZARRY-ALVARADO, A. ALVAREZ, AND S. ALVAREZ. 2007. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. *Transpl. Infect. Dis.* 9(4):336-338.

[199]-WILSON GJ, SEO KS, CARTWRIGHT RA, CONNELLEY T, CHUANG-SMITH ON, MERRIMAN JA, GUINANE CM, PARK JY, BOHACH GA, SCHLIEVERT PM, MORRISON WI, FITZGERALD JR. 2011. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog.* 7(10):e1002271.

[200]-VIÇOSA GN, LE LOIR A, LE LOIR Y, DE CARVALHO AF, NERO LA. 2013. *egc* characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Int J. Food Microbiol.* 165(3):227-30.

[201]-LEE, S. J., S. S. LEE, N. H. SHIM, J. U. OK, H. S. JUNG, G. M. CHU, I. H. KIM, AND J. D. KIM. 2009. Effects of dietary synbiotics from anaerobic microflora on growth performance, noxious gas emission and fecal pathogenic bacteria population in weaning pigs. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 22:1202-1208.

[202]-RIOLLET, C., P. RAINARD, AND B. POUTREL. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.* 84(5):1077-1084.

[203]-BANNERMAN, D. D., M. J. PAAPE, J. W. LEE, X. ZHAO, J. C. HOPE, AND P. RAINARD. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 11(3):463-472.

[204]-RAINARD, P. 2003. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet. Res.* 34(5):647-670.

[205]-RIOLLET, C., P. RAINARD, AND B. POUTREL. 2000. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:247-258.

[206]-WELLNITZ O, KERR DE. 2004. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 101(3-4):191-202.

[207]-RAINARD, P., AND C. RIOLLET. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37(3):369-400.

[208]-SUTRA, L., AND B. POUTREL. 1991. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40:79-89.

[209]-FOURNIER, B., AND A. KLIER. 2004. Protein A gene expression is regulated by DNA supercoiling which is modified by the ArlS-ArlR two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 150(11):3807-3819.

