

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine Vétérinaire

Titre de la thèse en français :

Mycoplasma bovis dans le complexe respiratoire bovin et propriétés de cyto-adhésion *in vitro*

Titre de la thèse en anglais :

Mycoplasma bovis in the bovine respiratory disease complex and *in vitro* cytoadherence

Candidat : Anne Thomas

Promoteur : Prof. J. Mainil

Co-promoteur : Dr. A. Linden

Département et Service : département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, service de Bactériologie

Date de la défense publique : le 13 mars 2003

Composition du Jury : J. Mainil, A. Linden, J.-J. Letesson, D. Desmecht, F. Rollin, P. Gustin, E. Thiry, A. Vanderplasschen, D. Maes, J. Frey

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Les pathologies respiratoires affectent très fréquemment le cheptel bovin surtout en élevage intensif. Au regard de l'impact économique de ces pathologies, une compréhension approfondie des agents impliqués dans le complexe respiratoire bovin permettront de réduire leurs coûts. Des études relativement récentes ont montré le rôle pathogène des mycoplasmes, dont *Mycoplasma bovis*, dans le tractus respiratoire bovin et l'émergence de ces bactéries en Europe.

Les objectifs de ce travail se répartissent en deux grands thèmes. Le premier est consacré à déterminer la place de *Mycoplasma bovis* dans le complexe respiratoire bovin en Belgique et le second à étudier l'importance de l'adhésion de *M. bovis* aux cellules eucaryotes *in vitro*.

La première partie est subdivisée en trois études dont les objectifs sont les suivants :

1. Déterminer la méthode de prélèvement qui, sur le terrain, permet d'isoler *M. bovis* le plus efficacement du tractus respiratoire bovin chez des animaux atteints de troubles respiratoires ;
2. Déterminer l'importance de *M. bovis* dans le complexe respiratoire bovin en Belgique par la technique de prélèvement déterminée au point 1 ;
3. Evaluer la susceptibilité des souches de *M. bovis* isolées récemment du tractus respiratoire bovin à dix substances antibiotiques.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons, dans un premier temps, comparé les isolements de mycoplasmes par diverses techniques de prélèvement dont l'écouvillonnage nasal, le lavage broncho-alvéolaire et la section pulmonaire. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé les fréquences d'isollements de mycoplasmes réalisés à partir de lavage broncho-alvéolaires chez des animaux vivants cliniquement sains ou atteints de troubles respiratoires (aigus et récurrents), et également à partir de poumons macroscopiquement sains ou pathologiques. De plus, nous avons étudié l'association de *M. bovis* à d'autres agents infectieux. Dans un troisième temps, la susceptibilité de quarante souches *M. bovis* isolées récemment en Belgique à partir du tractus respiratoire bovin vis-à-vis de dix substances à activité antibiotique a été étudiée *in vitro*.

La seconde partie du travail vise à étudier, *in vitro*, l'adhésion de *M. bovis* aux cellules de l'hôte. La compréhension de ces mécanismes et l'identification des structures impliquées pourraient permettre la mise au point des outils diagnostiques et prophylactiques.

Cette seconde partie est, elle aussi, subdivisée en deux études dont les objectifs sont les suivants :

1. Evaluer la représentativité de la souche de référence PG45 de *M. bovis* quant à la propriété d'adhésion aux cellules de l'hôte en culture ;
2. Caractériser l'adhésion de *M. bovis* sur une culture primaire de cellules épithéliales bronchiques bovines et identifier l(es) adhésine(s) de *M. bovis*.

Tableau: Fréquences individuelles des mycoplasmes respiratoires chez 50 jeunes bovins cliniquement sains, 110 jeunes bovins atteints de troubles respiratoires récurrents et 20 jeunes bovins atteints de troubles respiratoires aigus

	Cliniquement sains n = 50	Récurrents n = 110	Aigus n = 20
<i>M. bovis</i>	0	39 (35,5 %)	10 (50,0 %)
<i>M. dispar</i>	ND	30 (45,5 %)a	ND
<i>M. bovirhinis</i>	8 (16,0 %)	45 (40,9 %)	0
<i>M. canis</i>	ND	6 (10,7 %)b	ND
<i>Ureaplasma diversum</i>	ND	8 (14,8 %)c	ND
<i>M. arginini</i>	0	8 (7,3 %)	3 (15,0 %)
<i>M. alkalescens</i>	0	3 (2,7 %)	0
<i>M. bovis genitalium</i>	0	0	0
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	0	0	0
<i>Mycoplasma spp.</i>	8 (16,0 %)	86 (78,2 %)	13 (65,0 %)

Echantillons examinés pour *M. dispar* (n = 66)a, pour *M. canis* (n = 56)b, et pour *U. diversum* (n = 54)c;
ND: non déterminé.

Le premier de ces deux objectifs a été atteint en comparant l'adhésion de PG45 à celle de souches de *M. bovis* isolées de cas de mammites, d'arthrites et de bronchopneumonies. La deuxième étude a nécessité la mise au point d'une culture primaire de cellules épithéliales bronchiques bovines et, donc, une standardisation du test d'adhésion pour pouvoir comparer ces mêmes souches, étudier la spécificité de l'adhésion, l'effet de traitements enzymatiques et l'inhibition par des anticorps afin d'identifier des adhésines.

RÉSULTATS

Les mycoplasmes sont fréquemment impliqués dans les pathologies respiratoires chez les bovins. *Mycoplasma bovis* est considéré comme l'espèce la plus pathogène dans les pays indemnes de péripneumonie contagieuse du bovin. En Belgique, sur les 200 cas respiratoires recensés dans cette étude, *M. bovis* a été isolé aussi bien en *ante* (35 à 50 %) qu'en *post mortem* (20 %). Ces résultats contrastaient avec les pourcentages d'isolement obtenus sur animaux cliniquement sains (0 %) ou sur poumons macroscopiquement sains (2 %). De plus, les associations étaient fréquentes avec d'autres mycoplasmes mais aussi avec des pasteurelles, *Arcanobacterium pyogenes* et le virus respiratoire syncytial bovin. Ces isolements ont été réalisés à partir de liquides de lavage broncho-alvéolaire, technique avérée fiable quant à l'isolement de *M. bovis* et applicable en routine de diagnostic. Parmi ces isolats, de nombreux se sont révélés résistants à des antibiotiques couramment utilisés en médecine bovine. En effet, les valeurs élevées des concentrations minimales inhibitrices pour les tétracycli-

nes, macrolides, aminoglycosides et lincosamides suggèrent l'acquisition d'antibiorésistances parmi les souches respiratoires belges de *M. bovis*. Vu la fréquence de *M. bovis* en Belgique et le risque d'antibiorésistances, il est crucial de comprendre la pathogénicité de cette bactérie afin de pouvoir optimiser les moyens prophylactiques. Dans ce but, l'étude de l'adhésion de ce micro-organisme aux cellules de l'hôte est essentielle puisqu'elle représente la première étape de l'infection. Les données antérieures relatives à l'adhésion de *M. bovis* concernent la souche de référence PG45, souche isolée en 1962 d'un cas de mammite et subcultivée un grand nombre de fois en milieu inerte de culture. Or, il a été démontré au cours de nos recherches que cette souche n'est pas représentative des souches de terrain vu ses faibles taux d'adhésion, quelle que soit la lignée cellulaire utilisée. Cette non-représentativité est probablement due au nombre accru de passages en milieu inerte de culture, et non à l'origine de la souche (mammité) car aucune différence significative n'a été observée entre les taux d'adhésion de souches isolées récemment de cas d'arthrites, de mammites et de bronchopneumonies. Une souche récente, isolée d'un bovin atteint d'une bronchopneumonie, et ayant subi un faible nombre de subcultures (7 fois), a été utilisée dans les études ultérieures. Des expériences réalisées après trypsinisation ont montré que *M. bovis* était capable d'adhérer spécifiquement sur des cellules épithéliales bronchiques bovines en culture primaire via des structures protéiques. La réduction significative de l'adhésion par deux anticorps monoclonaux spécifiques des protéines variables de surface, vsp C et F, suggère l'implication de ces protéines dans l'adhésion à la culture primaire de cellules épithéliales bronchiques bovi-

nes. Ces résultats appuient l'hypothèse de la complexité du processus d'adhésion de *M. bovis* aux cellules eucaryotes et l'implication de diverses protéines.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

M. bovis est fréquemment isolé en Belgique chez les bovins présentant des troubles respiratoires. Il est souvent associé aux pasteurelles et au virus respiratoire syncytial bovin, démontrant le caractère multifactoriel des pathologies respiratoires, la complexité de leur diagnostic, de leur prophylaxie et de leur thérapie. En raison de la fréquence élevée des souches multirésistantes, il est donc primordial d'optimiser la prophylaxie soit par un vaccin soit par le respect des règles d'hygiène et de gestion des troupeaux.

La compréhension des mécanismes d'adhésion de *M. bovis* aux cellules de l'hôte est essentielle. Nous avons ainsi montré que l'adhésion est fonction de la souche bactérienne, de son nombre de passages en milieu de culture inerte et de la lignée cellulaire utilisée. De plus, *M. bovis* est capable d'adhérer sur des cellules épithéliales bronchiques bovines en culture primaire au moyen de plusieurs protéines dont les vsp C et F. Cette adhésion est spécifique vu la saturation des récepteurs et l'inhibition de l'adhésion par des mycoplasmes non radioactifs.

Les résultats exposés dans ce travail illustrent donc la complexité de *Mycoplasma bovis*. Ils ont apporté de nombreuses précisions, mais ils ont également suscité de nouvelles questions. Des études ultérieures contribueront à élucider certains points toujours obscurs, bien qu'il reste beaucoup de chemin à parcourir avant de faire toute la lumière sur *M. bovis* et ses mécanismes pathogènes dont l'adhésion aux cellules eucaryotes. Plusieurs suggestions peuvent être énoncées aussi bien en ce qui concerne l'infection des bovins par *M. bovis* qu'au sujet de son adhésion aux cellules eucaryotes.

Le lavage broncho-alvéolaire est proposé comme une technique fiable pour l'isolement de *M. bovis* dans les pathologies respiratoires. Toutefois, cette technique restera probablement réservée aux exploitations « à problèmes respiratoires récidivants » pour lesquelles un diagnostic étiologique doit être posé. En terme de diagnostic indirect, la séroprévalence de *M. bovis* fournira des informations utiles à l'échelle des troupeaux, à condition de disposer des tests sérologiques sensibles et spécifiques.

Seules les infections respiratoires dues à *M. bovis* ont été présentées dans ce travail. Cependant, *M. bovis* est également responsable de mammites et d'arthrites chez les bovins. Quelques analyses ont mis en évidence *M. bovis* lors de mammites dans des troupeaux belges. Ces investigations mériteraient d'être approfondies afin de déterminer l'implication réelle de ce mycoplasme dans les pathologies de la glande mammaire.

De nombreux isolats récents sont résistants à plusieurs molécules antibiotiques. Quels sont les mécanismes impliqués dans ces résistances ? Il serait intéressant d'identifier les déterminants associés à la résistance à la tétracycline ou les mutations présentes au niveau soit de l'ADN-gyrase soit de la topoisomérase de type IV et responsables de la résistance aux fluoroquinolones.

M. bovis a été mis en évidence dans 20 à 50 % des cas respiratoires repris dans ce travail. Faut-il éradiquer ou contrôler cet agent ? Le Danemark est parvenu à l'éradiquer durant plusieurs années, mais les mesures prises n'ont pu être prolongées et *M. bovis* est de nouveau présent dans ce pays. Un contrôle de l'infection par vaccination est plus réaliste à long terme. Les recherches actuelles tendent à développer un vaccin inactivé, et surtout de comprendre les mécanismes pathogènes qui sous-tendent les processus d'adhésion.

Outre sa fréquence dans les pays européens, *M. bovis* se caractérise par ses mécanismes pathogènes sophistiqués, comme tous les mycoplasmes étudiés jusqu'à ce jour. L'adhésion s'est révélée très élaborée et multifactorielle. L'analyse d'autres isolats provenant d'animaux asymptomatiques et l'étude sur des cellules différenciées et organisées en tissu permettraient de différencier les adhésines majeures et accessoires.

L'identification des récepteurs cellulaires représente une approche complémentaire et intéressante. La compréhension des interactions « adhésines-récepteurs » ouvrira ainsi de nouvelles perspectives pour le diagnostic et la prophylaxie.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Ministère Fédéral Belge de l'Agriculture et SPSA pour leur soutien financier, les firmes Pfizer, Vétoquinol et Bayer pour nous avoir procuré respectivement la danofloxacin, la marbofloxacin et l'enrofloxacin.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- LINDEN A., THOMAS A., MAINIL J. Les mycoplasmes respiratoires des bovins : I. Clinique, diagnostic et traitement. *Ann. Med. Vet.*, 1998, **142**, 397-404.
- MAINIL J., THOMAS A., LINDEN A. Les mycoplasmes respiratoires des bovins : II. Propriétés de virulence et vaccination. *Ann. Med. Vet.*, 1998, **142**, 405-410.
- THOMAS A., DIZIER I., TROLIN A., MAINIL J., LINDEN A. Comparison of sampling procedures for isolating pulmonary mycoplasmas in cattle. *Vet. Res. Comm.*, 2002, **26**, 333-339.
- THOMAS A., BALL H., DIZIER I., TROLIN A., BELL C., MAINIL J., LINDEN A. Isolation of *Mycoplasma* species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Vet. Rec.*, 2002, **151**, 472-476.
- THOMAS A., SACHSE K., DIZIER I., GRAJETZKI C., FARNIR F., MAINIL J., LINDEN A. Adherence to various host cell lines of *Mycoplasma bovis* strains differing in pathogenic and cultural features. *Vet. Microbiol.*, 2003, **91**, 101-113.
- THOMAS A., NICOLAS C., DIZIER I., MAINIL J., LINDEN A. Antibiotic susceptibilities of recent *Mycoplasma bovis* isolates. *Vet. Rec.*, 2003, **153**, 428-431.
- THOMAS A., SACHSE K., DIZIER I., GRAJETZKI C., FARNIR F., MAINIL J., LINDEN A. Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. *Microb. Pathog.*, 2003, **34**, 141-148.
- THOMAS A., MAINIL J., LINDEN A. *Mycoplasma bovis*: synthèse des connaissances actuelles. *Ann. Med. Vet.* 2003, **147**, 23-39.
- THOMAS A., DIZIER I., SACHSE K., BALL H., MAINIL J., LINDEN A. *Mycoplasma bovis* dans le complexe respiratoire bovin et propriétés de cyto-adhésion *in vitro*. *Ann. Med. Vet.*, 2003, **147**, 267- 272.