



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE
ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE HADJ LAKHDAR DE BATNA
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRE
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT ES SCIENCES

Filière

Sciences Vétérinaires

Option

Pathologie des animaux domestiques

Présentée par :

HELEILI NOUZHA

THEME

***Etude préliminaire des mycoplasmoses respiratoires
aviaires dans la région de Batna***

JURY

Grade et Université

Président :	Alloui N.	Professeur	Université de Batna
Examineur :	Ouzrout R.	Professeur	Centre universitaire d'El Tarf
Examineur :	Ben Souileh M.	Professeur	Université d'Annaba
Examineur :	Guitarni D.	Professeur	Université de Blida
Rapporteur :	Mamache B.	M.C	Université de Batna

Année universitaire : 2010-2011.

Remerciements

A Monsieur Mamache Bakir,

Professeur à l'université de Batna pour l'aide précieuse qu'il m'a prodiguée. J'espère que vous trouverez dans l'accomplissement de ce travail, le produit bénéfique de votre encadrement. Mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le président de jury, Pr Alloui Nadir

Pour avoir accepté de présider notre jury de thèse et d'évaluer la valeur scientifique de notre travail et qui m'a toujours encouragé et soutenue. Je le remercie surtout pour sa disponibilité et son extrême gentillesse mais aussi pour nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail. Merci.

A Monsieur Ouzrout Rachid

Professeur au centre universitaire d'El Taref qui m'a fait l'honneur de juger notre modeste travail

A Monsieur Guitarni Djamel

Professeur à l'université de Blida qui nous a fait l'honneur de siéger à notre jury de thèse.

A Monsieur Ben Souilah Mourad

Professeur à l'université d'Annaba qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

A Monsieur Ayachi Ammar.

Maitre de conférences au département vétérinaire de Batna qui m'a apporté un soutien sans faille tout au long de mon parcours de recherche et qui m'a initié au grand monde de la bactériologie malgré ses lourdes responsabilités.

A Monsieur Mehenaoui Smail

Professeur au département vétérinaire de Batna pour son aide.

A Monsieur Safsaf Boubakeur

Chef du département vétérinaire de Batna. J'ai beaucoup apprécié votre aide et votre compréhension surtout au début de mes travaux de recherche.

A Madame Bouchardon-Gautier Anne.

Maitre de conférences à l'Unité de Mycoplasmologie-Bactériologie, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, pour son aide précieuse et efficace.

A Monsieur Yannick Gardin.

Directeur de la Sarl SOLEIL diagnostics, France, pour nous avoir offert les antigènes pour le test d'ARL.

A Madame Shaabiny Leila.

Professeur au laboratoire de la santé animale, Dokky, Le Caire-Egypte, pour sa grandeur d'âme et sa patience et accueil chaleureux. Elle a enrichi mes connaissances en mycoplasmologie et a mis à ma disposition toute sa documentation.

A tous les enseignants du département vétérinaire de Batna pour qui je voue le plus grand respect et dévouement.

*J'adresse mes plus vifs remerciements à tous les vétérinaires praticiens, sans les quels je n'aurais jamais pu réaliser ce modeste travail. Je nomme : **Dr Ben Turki.M., Chelihi .A., Djablia.A., Zeghina D., Hiba. N, Ben Hamouda.N., Amamra.N., Zeghina.A., Hamdi H., malek et saleh, Nada Merzougui.***

A Mme Meguelati A et Hijazi F, ingénieurs de laboratoires au département vétérinaire de Batna.

Un grand merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées et qui m'ont aidé.

Dédicaces

Avant tout je remercie dieu le tout puissant de l'aide et la patience qu'il m'a octroyé durant ces quatre années d'étude.

Je dédie mon travail à mon cher mari et ami sans le quel je n'aurais abouti à rien. Je ne trouve pas les mots pour te remercier mais je suis sûre que tu sais à quel point j'apprécie ta présence à mes côtés.

A mes chers parents mais surtout mon cher père. Il m'a toujours encouragé à poursuivre mes études supérieures et n'a tarit aucun moyen pour que cela arrive. Voilà mon cher père je suis arrivé à réaliser ton rêve et j'espère que tu seras fier de moi tout autant que ma mère. Que dieu vous garde pour moi car j'aurais toujours besoin de vous.

Je dédie ce travail à mes enfants ; ma princesse Amira et mon petit bout de chou Abdel Mouyz qui ont tout les deux souffert de mon absence. J'espère que vous serez fières de votre maman et que cela vous serve d'exemple pour avancer dans la vie et réussir dans vos carrières.

A la mémoire de ma chère sœur Souad.

A mon cher beau frère Ammar qui m' a toujours épaulé et soutenu.

A mes chères sœurs et beaux frères surtout Shahrzade et son mari Fethallah sans les quels je n'aurais jamais pu réaliser cette thèse.

A tous mes neveux et nièces.

A toutes mes amies mais surtout Souhila Belkadi et khadra Chaib Inou.

Liste des abréviations

ADN : Acide desoxyribonucléique

Ae : Aérobie

Ag : Antigène

An : Anaérobie

Anx : Animaux

ARL : Agglutination Rapide sur Lame

ARN : Acide ribonucléique

ATB: Antibiotique

Bât: Bâtiment

C. innocum: Clostridium innocum

C.ramosum: Clostridium ramosum

Dg: Digitonine

Elev: élevages

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Fig : Figure

IFI : Immunofluorescence indirecte

IgG : Immuno globuline G

IgM : Immuno globuline M

IC : Inhibition de la croissance

IHA : Inhibition de l'hémagglutination

Kb : kilo paire base

MA : *Mycoplasma anatis*

Mg : *Mycoplasma gallinarum*

Min : minute

MG : *Mycoplasma gallisepticum*

MI : *Mycoplasma iowae*

µm: Micro mètre

MM : *Mycoplasma meleagridis*

MRC : Maladie respiratoire chronique

MS : *Mycoplasma synoviae*

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

Nbre : Nombre

pb : base paire

PC : poulet de chair

PCR : Réaction d'amplification en Chaîne par Polymérase

PP : poule pondeuse

PPLO: pleuropneumoniae like organism

S: Seconde

Sem : semaines

Spp: speciae

U.urealyticum: Ureaplasma urealyticum

VIH : virus du syndrome de l'immunodéficience acquise humaine

Liste des tableaux

Pages

Tableau I	Caractères biochimiques des mycoplasmes	09
Tableau II	Les mycoplasmes aviaires et leurs hôtes	14
Tableau III	Répartition des élevages par type de production et par commune	50
Tableau IV	Répartition des prélèvements pour sérologie et bactériologie en fonction des zones d'élevage.....	54
Tableau V	Répartition des échantillons en fonction des organes prélevés.....	55
Tableau VI	Typologie des élevages de poulet de chair.....	76
Tableau VII	Répartition des élevages étudiés en fonction de la taille des cheptels selon le type de production.....	78
Tableau VIII	Résultats sérologiques globaux pour le screening des mycoplasmoses à MG et MS par l'ARL.....	80
Tableau IX	Répartition des échantillons en fonction des zones d'élevage.....	82
Tableau X	Répartition des échantillons de sérums prélevés en fonction de l'âge et du type de production	85
Tableau XI	Répartition des échantillons en fonction de la saison.....	88
Tableau XII	Répartition des résultats sérologiques en fonction de la taille de l'élevage.....	89
Tableau XIII	Répartition des résultats sérologiques en fonction de la souche d'oiseaux.....	91
Tableau XIV	Résultats globaux des échantillons positifs en culture.....	95
Tableau XV	Répartition des échantillons positifs en culture en fonction du type de production.....	95
Tableau XVI	Répartition des échantillons positifs en culture en fonction de la zone de Prélèvement.....	97
Tableau XVII	Répartition des échantillons positifs en culture en fonction de	

l'organe prélevé	99
Tableau XVIII Comparaison des résultats de la sérologie, la culture et la PCR.....	102
Tableau XIX Résultats comparatifs des résultats de PCR, de culture et d'ARL.....	103

Liste des figures

Pages

Figure 1	Représentation schématique des relations phylogénétiques entre les Mollicutes et quelques parents basées sur les séquences de l'ARN ribosomal 16S.....	11
Figure 2	Structure des mycoplasmes en microscopie électronique (G x 68.000).....	17
Figure 3	Photographie de colonies d' <i>Acholeplasma laidlawii</i> au microscope (G x 50) montrant l'aspect typique en « œuf sur le plat » (Razin and Oliver, 1961).....	19
Figure 4	Schéma représentatif de la composition du milieu de culture pour Mycoplasmes.....	57
Figure 5	Protocole de l'analyse sérologique avec le test d'ARL.....	63
Figure 6	Schéma d'isolement chez les sujets vivants.....	65
Figure 7	Schéma d'isolement chez les cadavres.....	66
Figure 8	Diagramme d'isolement des souches de mycoplasmes.....	68
Figure 9	Protocole d'identification des souches de mycoplasmes.....	73
Figure 10	Répartition des échantillons en fonction des zones d'élevage.....	83
Figure 11	Influence de l'âge sur l'infection mycoplasmiq ue chez les poules pondeuses.....	84
Figure 12	Influence de l'âge sur l'infection mycoplasmiq ue chez le poulet de chair.....	85
Figure 13	Relation entre l'infection mycoplasmiq ue et le type de production.....	87
Figure 14	L'influence de la saison sur l'évolution de l'infection mycoplasmiq ue.....	88

Figure 15	Résultats de l'infection par MG et MS en fonction de la taille d'élevage...90
Figure 16	Influence de la souche d'oiseaux sur la prévalence de la maladie chez la poule pondeuse.....91
Figure 17	Répartition des résultats de l'isolement en fonction du type de production.....96
Figure 18	Répartition des échantillons positifs en culture en fonction de la zone de prélèvement.....98

Liste des photos

Pages

Photo 1	Animaux présentant des signes de conjonctivite.....	51
Photo 2	Les oiseaux sont incapables de se redresser.....	52
Photo 3	Sinusite chez les oiseaux due à MG.....	52
Photo 4	Test d'ARL. Les anticorps anti MG et anti MS sont mis en évidence par les agrégats formés avec l'antigène coloré en violet (intensité de réaction 4+++)......	79
Photo 5	Aspect d'œuf sur plat des mycoplasmes sous stéréo -microscope (X40).....	90
Photo 6	Identification des mycoplasmes par la coloration de diènes.....	91
Photo 7	Test de sensibilité des mycoplasmes à la digitonine.....	91
Photo 8	Test de fermentation du glucose (à droite) et d'hydrolyse de (à gauche).....	92
Photo 9	Test d'inhibition de la croissance positif observé sous stéréo microscope.....	92
Photo 10	Résultats de la PCR pour les 18 souches de MG.....	98
Photo 11	Résultats de la PCR pour les 18 souches de MS.....	99

Table des matières

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PREMIERE PARTIE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Historique.....	3
II. Taxonomie.....	4
III. Classification et Phylogénie.....	4
IV. Sérotypage.....	12
V. Caractères généraux des Mycoplasmes.....	15
V.1. Morphologie	15
V.2. Structure.....	16
V.3. Culture.....	17
VI. Caractéristiques des mycoplasmes	20
VI.1. L'absence de paroi rigide	20
VI.2. Taille minimum.....	20
VI.3. Mode de développement naturel.....	21
VI.4. Répartition.....	21
VI.5. Les mycoplasmes et leur hôte.....	22
VI.6. L'ubiquité des Mycoplasmes.....	22
VII. Propriétés physiques et chimiques.....	23
VIII. Importance économique de l'infection mycoplasmique.....	24
IX. Rôle des facteurs de l'environnement.....	25

X.	Pouvoir pathogène des mycoplasmes chez les volailles.....	25
X.1.	Epidémiologie.....	25
X.2.	Pathogénie.....	27
X.2.1.	Action directe des mycoplasmes.....	27
	a) Pouvoir d'adhésion.....	27
	b) Production de substances toxiques.....	28
	c) Pouvoir invasif.....	29
X.2.2.	interaction avec le système immunitaire de l'hôte.....	29
X.3.	Transmission.....	30
X.4.	Aspects cliniques.....	32
X.4.1.	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	32
	a) Incubation et symptômes.....	34
	b) Lésions.....	35
	c) Diagnostic et lutte.....	36
X.4.2.	<i>Mycoplasma synoviae</i>	37
X.4.3.	<i>Mycoplasma iowae</i>	38
XI.	Diagnostic.....	39
A.	Diagnostic sérologique.....	39
B.	Diagnostic bactériologique.....	40
B.1.	Isolement.....	40
B.2.	Identification.....	41
B.2.1.	Caractères cultureux.....	41
B.2.2.	Tests biochimiques.....	42
B.2.3.	Tests sérologiques.....	43
B.2.4.	Identification moléculaire.....	44
XII.	Contrôle des mycoplasmoses aviaires.....	45

XIII. Vaccination.....	47
------------------------	----

SECONDE PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL

1. Suivi épidémiologique des exploitations aviaires dans la région de Batna.....	49
2. Elevages.....	51
3. Prélèvement.....	53
4. Transport.....	56
5. Les souches de références.....	56
6. Milieux de culture.....	56
7. Les composants du milieu de culture.....	56
7.1. Les inhibiteurs.....	56
7.2. Les enrichisseurs.....	56
7.3. Le rouge de phénol (indicateur coloré).....	58
8. Isolement.....	58
9. Solution de digitonine pour différencier les Acholeplasma des Mycoplasmes.....	58
10. Colorant de Diènes.....	59
11. Identification biochimique et sérologique des souches isolées.....	59
12. Matériel utilisé pour la PCR.....	59

II. METHODES

1. Etude épidémiologique.....	62
2. Analyses sérologiques.....	62
3. Reconstitution du milieu de culture.....	64
4. Ensemencement.....	64
5. purification de la souche.....	67

6. Identification.....	69
a- Aspect de la colonie.....	69
b- Coloration de Diènes.....	69
c- Test de la digitonine.....	69
d- fermentation du glucose.....	70
e- hydrolyse de l'arginine.....	70
f- Test de l'inhibition de la croissance.....	70
g- Identification des souches de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> et de <i>Mycoplasma synoviae</i> par la technique de PCR.....	71
h- Etude statistique.....	74

III. RESULTATS

1. Résultats de l'enquête épidémiologique.....	75
1.1. Répartition des élevages visités en fonction de la taille dans les deux types de production.....	77
a) Chez le poulet de chair	78
b) Chez la poule pondeuse.....	78
1.2. Conduite de l'élevage.....	79
2. Résultats sérologiques.....	80
2.1. Répartition des résultats sérologiques en fonction des zones d'élevage.....	81
2.2. Résultats sérologiques en fonction de l'âge des oiseaux.....	83
2.3. La séoprévalence de MG et MS en fonction du type de production.....	87
2.4. Résultats sérologiques selon la saison.....	88
2.5. L'influence de la taille des élevages sur les résultats sérologiques.....	89
2.6. Résultats sérologiques en fonction de la souche d'oiseaux élevés.....	90
3. Résultats de l'étude bactériologique.....	92

3.1. Prévalence globale de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> et <i>Mycoplasma synoviae</i>	95
3.2. Résultats bactériologiques en fonction du type de production.....	95
3.2. Résultats des isoléments en fonction des zones d'élevages.....	96
3.3. Répartition des échantillons positifs en culture en fonction de l'organe prélevé.....	98
4. Utilisation de la PCR pour l'identification des souches isolées.....	99
5. Comparaison des résultats de la sérologie, de la culture et de la PCR.....	102

IV. DISCUSSION

1. Résultats de l'investigation menée au niveau des élevages.....	104
2. Résultats sérologiques.....	108
3. Résultats bactériologiques.....	111
4. Comparaison des résultats sérologiques et bactériologiques.....	112
5. Résultats de l'identification moléculaire.....	113
6. Comparaison entre les résultats des trois méthodes de diagnostic.....	114
CONCLUSION GENERALE.....	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	118

ANNEXES

Introduction générale

Les mycoplasmes forment un grand groupe de micro-organismes procaryotes avec plus de 190 espèces distinguées des bactéries ordinaires par leur petite taille, leur génome minutieux (**Abdelatif, 1999**).

Les oiseaux abritent une vingtaine de sérotypes de mycoplasmes. Les espèces les plus pathogènes sont : *M.gallisepticum* (MG), *M.synoviae* (MS). Puis viennent, en fonction des circonstances, *M.meleagridis* (MM), *M.iowae* (MI). Les autres espèces sont considérées comme inoffensives la plupart du temps (**Markham and Wong, 1952; Grumbles et al., 1953**).

D'autres mycoplasmes aviaires peuvent montrer une certaine pathogénicité dans certaines circonstances. Par exemple, *M. gallinarum* (Mg) a été impliqué dans une manifestation de la maladie respiratoire chez les poulets de chair et *M. pullorum* a été associé à la mortalité d'embryon de dinde en France (**Hedia, 2005**).

Selon **Marois et al. (2001)**, l'incidence de la maladie est favorisée par l'intensification de la production avicole et entraîne des pertes économiques du fait du retard de croissance, de l'augmentation des indices de consommation de 10-20%, des saisies à l'abattoir, des baisses de productions d'œufs commercialisables de 10-20% et des diminutions d'éclosabilité des poussins et des dindonneaux de 5-10%.

L'effet de ces agents pathogènes s'ajoute à celui de facteurs prédisposants tels que les mauvaises conditions d'ambiance (taux d'ammoniac excessif, poussières, humidité, plumes d'oiseaux, ventilation mal réglée..), les stress subis par les oiseaux (vaccination, transport, débecage...), les carences et le parasitisme pour faciliter la propagation de ces microorganismes (**Masover et al., 1975**).

Plusieurs facteurs nous ont incités à entreprendre cette étude; entre autre, le peu de données sur les mycoplasmoses aviaires en Algérie (à l'exception de l'investigation **d'Aimeur et al., 2010**), l'importance de l'élevage avicole dans la région de Batna qui représente 20% de la production nationale, de même que l'importance de MG et de MS, considérés comme les plus pathogènes de

toutes les espèces de mycoplasmes aviaires (**Razin and Tully, 1970**), mais surtout la possibilité de la persistance de cet organisme pendant toute la vie d'un oiseau infecté (**Kempf, 1992**). Ceci représente un danger réel pour les élevages commerciaux.

Les objectifs de cette étude se résument en :

- Procéder à un suivi épidémiologique des différentes zones d'élevages de la wilaya à fin d'établir les facteurs de risque des mycoplasmoses dans nos élevages.
- Etudier la séoprévalence des mycoplasmoses à MG et à MS.
- Etablir les taux d'infection par les deux mycoplasmes les plus pathogènes dans cette région en vue de réaliser une banque de données épidémiologiques fiables et exploitables par les vétérinaires de la région.
- Faciliter, pour les futurs chercheurs, l'isolement de ces germes en faisant ressortir les organes de prédilection de MG et de MS.
- Essayer de déterminer la meilleure méthode de détection de la maladie en comparant les résultats de la sérologie, la culture des germes et la Polymerase Chain Reaction (PCR).

PREMIERE PARTIE
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Historique

Les premières étapes dans la découverte des mycoplasmes ont été réalisées par E.Nocard en 1891. En effet, il a été le premier à isoler l'agent responsable de la pleuropneumonie infectieuse bovine et de la débilité chez le veau. Cet agent fut appelé PPLO (pleuropneumoniae like organism) lequel terme fut utilisé pour les mycoplasmes.

Au cours des années 1935-1939 a eu lieu la découverte de *Mycoplasma spp* isolé à partir du système respiratoire supérieur des poules souffrant de coryza (**Abdelatif, 1999**). Elle a été désignée sous le nom de « maladie respiratoire chronique », laquelle maladie décrite par Delaplane et Stuart en 1943 (in **Ben abdelmoumen, 1996**).

Markham and Wong, 1952 (in **Nascimento et al., 2005**) isolèrent avec succès des mycoplasmoses à de partir poules et dindes et suggèrent que ces microorganismes appartiennent aux PPLO et il furent appelés ensuite *Mycoplasma gallisepticum*.

Grumbles et al., 1953 démontrent que cette maladie pouvait être inapparente.

Grainfort et al., 1955 (in **Abdelatif, 1999**) indiquent que les mycoplasmes isolés présentaient des communautés antigéniques.

Olson et al., 1956 décrivent la forme respiratoire due à *Mycoplasma synoviae*.

Walker et al, 1978 (in **Hedia, 2005**) rapportent que *Mycoplasma synoviae* avait un diamètre de 300-500nm et dépourvu de paroi cellulaire.

Ajufo et Withear, 1980 décrivent la couche extracellulaire des mycoplasmes par la microscopie électronique.

Kreig et Holt, 1984 (in **Hedia, 2005**) définissent *Mycoplasma gallisepticum* comme une espèce pathogène appartenant au genre *Mycoplasma*, famille des *Mycoplasmataceae*.

Quinn et al., 2002 précisent que les mycoplasmes sont des microorganismes appartenant à la classe des mollicutes, constituée de 98 genres dont 5 présentant un intérêt vétérinaire incluant *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* pathogènes pour la volaille.

II. Taxonomie

De par leur petite taille (environ 0,5 µm de diamètre) et leur morphologie très variable, les mycoplasmes ont longtemps posé des problèmes aux bactériologistes essayant de les classer. A présent, ils sont considérés comme de petites bactéries dépourvues de paroi rigide, fragiles et extracellulaires appartenant à la classe des Mollicutes, phylum des Firmicutes (**Baseman and Tully, 1997 ; Razin and Herrmann, 2002**). Il existe six genres au sein de cette classe, les principaux sont *Mycoplasma*, *Ureaplasma* et *Acholeplasma* chez les animaux, *Spiroplasma* chez les végétaux (**Weisburg et al., 1989**).

Les Mollicutes, en dehors de leur absence de paroi, ont également la particularité de posséder un petit génome de 620 à 780 kilobases de base (140 et 510 mega daltons) pauvre en guanine et en cytosine ; 23-40 mol% (**O'Leary, 1989**). Les essais de subdivision du genre *Mycoplasma* ont longtemps été basés sur une approche immunologique ou sur l'examen de la composition de l'ADN. Mais ces approches furent insuffisantes pour étudier la phylogénie des différentes espèces et ce manque a pu être pallié par l'analyse des séquences d'ARN ribosomal 16S.

III. Classification et Phylogénie

La classification actuelle des bactéries (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2004) est basée principalement sur les caractères morphologiques, biochimiques et sérologiques. La

classification des mycoplasmes est particulièrement difficile, parce que, dans l'absence d'une paroi cellulaire, leur morphologie est exposée à de grandes variations et les tests biochimiques ont une valeur limitée (**Barber and Fabricant, 1971**). Plusieurs espèces ne donnent aucune réaction tandis que d'autres donnent des réactions similaires. La classification est donc basée en grande partie sur leurs caractères sérologiques (**Lemcke, 1964; Razin and Rottem, 1967**). Le premier test sérologique entrepris est celui de l'inhibition de croissance, deux autres tests furent utilisés pour le diagnostic des Mycoplasmes et des Acholeplasmae ; l'inhibition du métabolisme et l'immunofluorescence (**Brown et al., 2007**).

Les mycoplasmes appartiennent à la classe des Mollicutes (mouli : mou ; cutis : peau ; bactéries à peau molle), ordre des Mycoplasmatales. Parmi les 200 espèces de Mollicutes identifiés, seuls les mycoplasmes sont reconnus pathogènes (**Rawadi and Dussurget, 1995; Frey, 2002**). Les espèces qui affectent les volailles font partie de la famille des Acholeplasmataceae (stérol indépendants) ou de celle des Mycoplasmataceae (stérol dépendants) (**Stanbridje, 1971**). Ce sont les plus petits procaryotes capables d'auto réplication.

La classe des Mollicutes contient 6 genres identifiés comme suit : Mycoplasma, Acholeplasma, Ureaplasma et Spiroplasma font partie des anaérobies facultatives, alors que les Anaeroplasma et Asteroleplasma sont classés parmi les anaérobies obligatoires (**Woese et al., 1980**).

En 1993, une nouvelle classification a été établie et dans la quelle, en plus des 6 genres précédemment décrits, deux nouveaux genres (Entomoplasma et Mesoplasma) ont été proposés (**Gundersen et al., 1994; Razin and Herrmann, 2002**).

La détermination de l'origine et de la phylogénie des Mollicutes par rapport aux eubactéries serait d'une importance capitale dans la compréhension de la biologie et de la génétique de ces microorganismes.

Différentes hypothèses concernant l'origine phylogénétique des mycoplasmes, ont été soulevées. Leur grande simplicité et leur petite taille, avait conduit à l'idée qu'il s'agissait des organismes les plus primitifs, capables de multiplication autonome et très rapide (**Daubin et al., 2001; Mrâzek, 2006**). Par la suite, des études comparatives ont été réalisées en utilisant des approches immunologiques, des tests d'hybridation des acides nucléiques et l'analyse de la composition de leur ADN.

L'hypothèse retenue actuellement, est que les mycoplasmes sont des formes très évoluées, dérivées des bactéries à Gram positif à faible teneur en guanine+cytosine (**Masover et al., 1975 ; Papazisi et al., 2003**).

L'étude de l'analyse des séquences de l'ARN ribosomal 16S, a démontré le mode de leur évolution ; ils auraient évolué à partir de ces ancêtres, vraisemblablement les Streptocoques il y a environ 600 millions d'ans (**Razin, 1985; Rochas and Blanchard, 2002 ; Hong et al., 2005**) qui eux aussi sont des bactéries à Gram + et à faible teneur en guanine+cystéine, d'un génome de 1700-2600 Kb, par un processus concernant des réductions successives de taille et de génome d'environ 50% (**Maniloff, 2002**), accompagnées d'une perte de la paroi .

Les bactéries les plus proches dans cet arbre phylogénétique sont les clostridies (**Woese, 1987**) ; au sein de la lignée des clostridies, les mycoplasmes présentent un certain degré de parenté avec les bacilles (**Daubin et al., 2001; Jaffe et al.,2004; Wolf et al., 2004**) et les lactobacilles (**Lam, 2005**), et se trouvent très liés avec un sous-groupe de clostridies représentés par *C. innocum* et *C.ramosum* (**Razin, 1985**).

Les études de Rogers et ses associés, 1985 (107) sur les ARN 5S de 10 Mollicutes et de *C.innocum*, démontrèrent une communauté génétique entre les mycoplasmes et les clostridies (**Ben abdelmoumen, 1996**).

Woese et associés, 1987 (**Razin and Herrmann, 2002**) ont déterminé 5 groupes phylogénétiques sur la base de l'alignement des séquences des molécules d'ARN ribosomal 16S :

- Le groupe pneumoniae dont 6 espèces caractérisées avec *M.pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. iwoae*, *U.urealyticum*.
- Le groupe hominis qui comprend 16 espèces, parmi lesquelles *M.arthritis*, *M.fermentans*, *M.hominis*, *M.hypopneumoniae*, *M.hyorhinis*, *M.pulmonis*.
- Le groupe Spiroplasma avec 17 espèces incluant *M.capricolum*, *M.mycooides*, *S.apis*, *S.citri* et *S.mirum*.
- Le groupe anaeroplasmata renferme 6 espèces avec *Acholeplasma laidlawii*, *Anaeroplasmata abactoclasticum*, *Anaeroplasmata intermedium*, *A.anaerobium*.

Bien que la plupart des groupes phylogénétiques soient liés les uns aux autres, certaines espèces comme *Asteroleplasma*, sont très distinctes. Ceci est probablement dû au fait que cette espèce émerge de la classe des eubactéries gram-positives distincte de celle qui est considérée comme ancêtre de la plupart des mycoplasmes.

Les caractéristiques biochimiques sont importantes pour l'identification des Mollicutes et surtout la capacité de fermenter le glucose et/ou d'hydrolyser l'arginine sont des dispositifs, qui doivent également être envisagés quand de nouvelles espèces sont décrites. Ces propriétés ne reflètent pas toujours la phylogénie des Mollicutes. Seul le groupe hominis, qui est composé de 21 espèces a un identique profil d'arginine /glucose (-/+).

L'ordre qui est celui des Mycoplasmatales, auquel appartiennent les six genres de mycoplasmes déterminés et identifiés ci-dessus, regroupe trois familles:

- La famille des *Mycoplasmataceae* se caractérise par son besoin absolu en cholestérol et compte deux genres dans l'espèce humaine et le règne animal à savoir le mycoplasme et l'ureaplasme (**Razin, 1975**).

Les mycoplasmes sont incapables de métaboliser l'urée et comptent aujourd'hui plus de 80 espèces y compris 18 espèces de mycoplasmes aviaires (Tableau 1). La première fut isolée et classée comme étant une espèce non pathogène, correspondant au sérotype B de Kleckner, 1960 ou encore Mg selon Fabricant, 1960 in **Ben abdelmoumen, 1996**. La désignation de MG était proposée pour l'espèce pathogène typique de la maladie respiratoire chronique chez les poules et la sinusite infectieuse chez les dindes par Edward et Kanarek, 1960 (**Garrity et al., 2004**). Ces mêmes auteurs ont aussi classé Mi correspondant au sérotype G, comme une espèce relativement non pathogène.

Quant au MM, il fut désigné par le sérotype Y (**Yamamoto et al., 1965**). En 1964, Olson et coll (**Garrity et al., 2004**) ont désigné l'espèce responsable de la synovite infectieuse par MS, et c'est au cours de la même année, que MA, isolé chez le canard, fut décrit par Roberts, 1964 in **Garrity et al., 2004**. Par la suite, Jordan et coll, 1982 (**Jordan et al., 1982**) ont largement entrepris la classification des mycoplasmes en les faisant correspondre aux sérotypes déjà cités. Ces auteurs ont désigné MI par les sérotypes I et J et possiblement par d'autres, auxquels les sérotypes K, N, Q et R furent ajoutés. Ils attribuèrent respectivement les sérotypes C, D, F et L à *Mycoplasma pullorum*, *Mycoplasma gallinaceurn*, *Mycoplasma gallopavonis* et *Mycoplasma colombinasale* isolé chez le pigeon. D'autres isolements ont eu lieu chez le pigeon dont deux espèces ont été identifiées et caractérisées: *Mycoplasma columbinum* et *Mycoplasma columborale* (**Shimizu et al., 1978; Jordan et al., 1981 in Ben abdelmoumen, 1996**).

Vers les années 90, Bradbury et son équipe isolèrent et identifièrent chez la poule une nouvelle espèce de mycoplasme nommée *Mycoplasma imitans* (**Bradbury et al., 1993**).

Le deuxième genre de la famille des *mycoplasmataceae* est l'ureaplasme, isolé pour la première fois par Shepard en 1954 (**Razin and Herrmann, 2002**), qui hydrolyse l'urée et qui ne comprend que les deux espèces suivantes: *Ureaplasma urealyticum* et *Ureaplasma gallorale* (Tableau 1).

- La famille des *Acholeplasmataceae* n'a pas besoin de cholestérol pour la croissance, et ne comporte qu'un seul genre, celui d'acholeplasme qui compte dix espèces saprophytes.

- La famille des *Spiroplasmataceae* comporte des agents de forme hélicoïdale ayant un besoin absolu en cholestérol pour leur croissance et compte un seul genre dans le règne végétal et chez les invertébrés à savoir le spiroplasme (**Moulder *et al.*, 2002**).

Enfin, il existe les genres Asteroleplasme et Anaeroplasme qui sont des anaérobies strictes et dont l'isolement a été fait à partir du rumen des bovins ou des ovins (**Robinson et Freundt, 1987 in Ben abdelmoumen, 1996**). Les Asteroleplasmes sont capables de croître en absence de stérols alors que, les anaeroplasmes en dépendent pour leur multiplication.

Tableau n°1 : Caractères biochimiques des mycoplasmes (Kempf, 1992).

Espèces	Glucose	Arginine	Phosphatase	Film et spots	Sels de tétrazolium Ae*/An**	Hémadsorption
M. anatis	+	-	+	+	-/+	-
M.columbinasale	-	+	+	+	-/-	-
M.columbinum	-	+	-	+	-/+	-
M.columborale	+	-	-	-	-/+	-
M.gallinaceum	+	-	-	-	-/-	-
M.gallisepticum	+	-	-	-	+/+	+
M.gallinarum	-	+	-	+	+/+	-
M.iners	-	+	-	+	-/-	-
M.iowae	+	+	-	-	+/+	+
M.lipofaciens	+	+	-	+	-/+	ND
M.meleagridis	-	+	+	-	-/+	+ ou -
M.synoviae	+	-	-	-	+	-/F
Acholeplasma laidlawii	+	-	-	-	+	

***Ae : aérobie**

**** An : anaérobie**

F : faible

ND : non déterminé

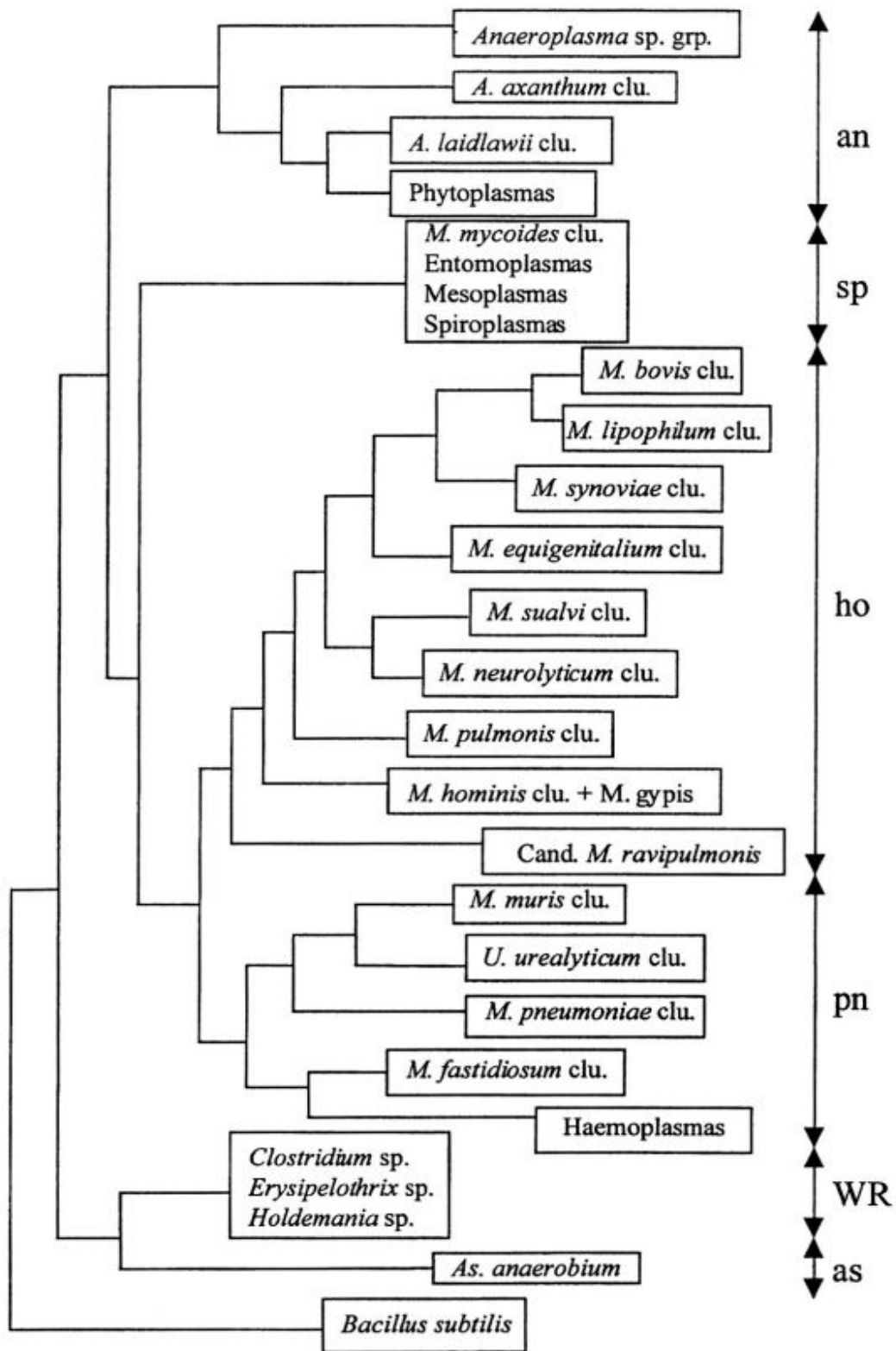


Figure1 : Représentation schématique des relations phylogénétiques entre les Mollicutes et quelques parents basées sur les séquences de l'ARN ribosomal 16S

(Razin and Herrmann, 2002).

N.B : les groupes phylogénétiques sont indiqués sur une ligne verticale ; an = Anaeroplasma, as = Asteroleplasma, ho = Hominis, pn = Pneumoniae, sp = Spiroplasma.

IV. Sérotypage

Actuellement, on compte approximativement 20 espèces de mycoplasmes aviaires, dont seulement quatre qui possèdent un rôle pathogène majeur pour les animaux domestiques.

Il s'agit de MG, MM, MS et MI. Les études qui ont mené à l'identification des différents sérotypes de *Mycoplasma* spp., ont débuté en 1957. L'année suivante, des travaux furent entrepris pour caractériser cinq sérotypes.

Plus tard, huit sérotypes, y compris les cinq précédents, furent décrits et désignés par des lettres alphabétiques (de A jusqu'à H) (Yoder, 1984).

Durant la période 1964-1967, 12 sérotypes, de H à L, plus 19 autres, de A jusqu'à S ont été rapportés et caractérisés d'après le tableau de Yoder (1984).

Des études ultérieures ont été entreprises par plusieurs groupes de chercheurs concernant les sérotypes agglutinants. Ces derniers ont été rassemblés en huit à dix groupes sérologiques, et des investigations plus approfondies démontrèrent des similarités entre les sérotypes E et G.

Néanmoins, des sérotypes se sont révélés identiques, alors que d'autres auteurs suggèrent la possibilité d'une intercontamination entre sérotypes, dont notamment entre B et M d'une part, C et O d'autre part et enfin entre D et P (Yoder, 1984).

Les sérotypes de *Mycoplasma iowae* sont: I, J, K, N, Q et R (Zhao et Yamamoto, 1989).

La similarité des groupes sérologiques fut confirmée par la sérologie et par des tests d'hybridation des acides nucléiques (Thomas et Dierks, 1980).

Les sérotypes pathogènes A, H et S qui correspondent respectivement aux espèces suivantes: MG, MM et MS, sont demeurés distincts les uns des autres. Cela n'exclut pas l'existence d'une communauté antigénique et génomique entre les sérotypes des trois espèces.

Tableau II : Les mycoplasmes aviaires et leurs hôtes (Yoder, 1984).

Espèces	Sérotypes	Hôtes communs
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	A	poule, dinde
<i>Mycoplasma synoviae</i>	S	poule dinde
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	H, Y	dinde
<i>Mycoplasma iowae</i>	I, J, K, N, Q, R	dinde, poule
<i>Mycoplasma imitans</i>	non classé	poule
<i>Mycoplasma gallopavonis</i>	F	dinde
<i>Mycoplasma cloacale</i>	non classé	dinde
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	B	poule
<i>Mycoplasma gallinaceum</i>	D	poule
<i>Mycoplasma pullorum</i>	C	poule
<i>Mycoplasma iners</i>	non classé	poule
<i>Mycoplasma lipofaciens</i>	non classé	poule
<i>Mycoplasma glycyphilum</i>	non classé	poule
<i>Mycoplasma columbinasale</i>	L	pigeon
<i>Mycoplasma columbinum</i>	non classé	pigeon
<i>Mycoplasma columborale</i>	non classé	pigeon
<i>Mycoplasma anati</i>	non classé	canard
<i>Mycoplasma anseri</i>	non classé	oie
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	non classé	variété
<i>Ureaplasma gallorale</i>	non classé	poule
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	non classé	dinde

V. Caractères généraux des Mycoplasmes

V.1. Morphologie

Du fait de leur très petite taille (0.2 à 0.3 μm) (**Stanbridje, 1971; Robinson and Bébéar, 1997**), les mycoplasmes sont difficiles à observer en microscopie optique, et ont souvent été confondus avec les virus surtout les myxovirus en raison de la similitude de leur morphologie au microscope électronique ; leur sensibilité à l'éther et au chloroforme ; leur inhibition de croissance par l'antisérum spécifique ; leur capacité de quelques souches à hémagglutiner; leur résistance à quelques antibiotiques (**Macpherson, 1966**). L'examen en fond noir ou en contraste de phase montre des organismes polymorphes, coccoïdes ou filamenteux, branchés ou en étoile, variables selon les stades de la croissance ou les conditions d'observation. Des formes bourgeonnantes ou en chaînettes peuvent être observées. Cette souplesse résulte de l'absence totale de la paroi cellulaire qui les sensibilise au choc osmotique, aux détergents, aux alcools, aux anticorps et au système du complément.

En général, la forme de base des mycoplasmes est coccoïde de 0.33 à 1 μm de diamètre (**Maniloff and Morowitz, 1972**), car même pendant la phase filamenteuse, la rapidité de leur croissance et la synchronisation parfaite entre la division du cytoplasme et la réplication du génome, les transforme en éventuelle chaîne coccoïde (**Razin, 1978**). Il a été démontré que ces chapelets pouvaient être altérés par des agents physiques ou chimiques utilisés. Grâce à leur pléomorphisme, les mycoplasmes passent à travers un filtre de 0.45 μm (**Weisburg et al., 1989**) et ont même la capacité de changer de forme à fin de pouvoir passer à travers des filtres dont les pores sont de diamètre plus petit que leur taille circulaire. Cette habilité de changer de forme, est liée à la présence de protéines contractiles comme l'actine (**Woese et al., 1980**). Bien que la plupart des mycoplasmes soient immobiles et ne possèdent aucun flagelle, un certain nombre d'entre eux montrent un mouvement de glissement sur les surfaces. Cette mobilité par glissement semble être due à une structure terminale spécialisée (extrémité effilée) qui joue un rôle important dans

l'adhésion des mycoplasmes à différents supports (**Zanella et al., 1998**). Cet organelle présente une structure différente de celle du reste de la cellule.

L'absence de paroi confère aux mycoplasmes la capacité de résister à la Pénicilline et à tous les antibiotiques dégradant ou inhibant la synthèse du peptidoglycan. (**Nascimento, 2005**)

V.2. Structure

La structure de la cellule des mycoplasmes consiste en une membrane cytoplasmique trilaminaire typique, composée essentiellement de lipides (32-40%) et de protéines (50-59%), 0.5-2% de carbohydrates, 2-5% de RNA et environ 1% de DNA (**Rottem and Razin, 1967; Maniloff and Morowitz, 1972**). Cette membrane délimite le cytoplasme qui renferme des ribosomes au niveau desquels s'effectue la synthèse des protéines cellulaires, quelques vésicules entourées d'une membrane à triple feuillet (**Razin, 1978**) et un matériel nucléaire formé d'une molécule d'ADN. Ils ne possèdent ni flagelles ni pili et certains sont mobiles (**Robinson and Bébéar, 1997**).

Certaines espèces de mycoplasmes possèdent en plus une structure terminale comme dans le cas de MM et MG (**Green and Hanson, 1973**), ou des fibres contractiles qui entourent, à l'extérieur, la membrane cytoplasmique (**Raccach et al., 1975; Whitford et al., 1994**). Cette structure terminale semble jouer un rôle dans l'attachement des mycoplasmes aux surfaces des cellules épithéliales respiratoires (**Woese et al., 1980**).

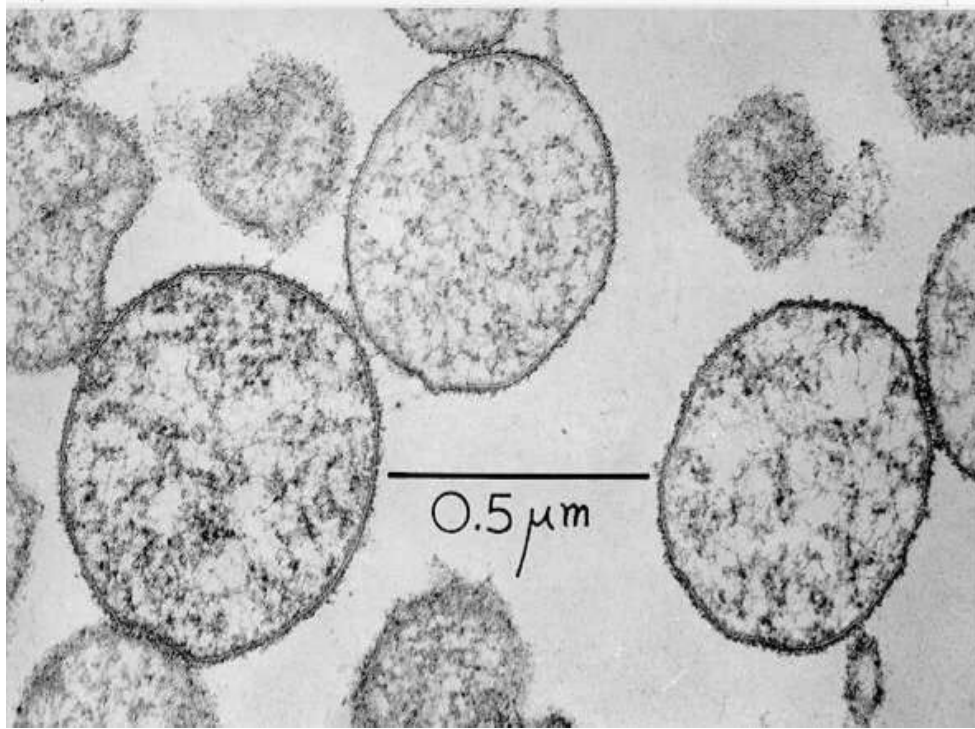


Figure 2 : Structure des mycoplasmes en microscopie électronique (G x 68.000)

(Razin, 1983)

V.3. Culture

Le génome des mycoplasmes est le plus petit des génomes des procaryotes et représente en moyenne moins d'un cinquième du génome d'*Escherichia coli* (Stakenborg, 2005). Cette petite taille limite les capacités de biosynthèse des mycoplasmes et leur culture requiert donc des milieux de culture de composition spécifique (Papazisi *et al.*, 2003). Ils doivent être riches en nutriments complexes comme des précurseurs d'acide nucléique, des acides aminés, des extraits de levure, des inhibiteurs de bactéries et des précurseurs de lipides. Ces derniers jouent le rôle de régulateur de la fluidité et de la souplesse membranaire lors de leurs transformations. Il faut entre autre, ajouter du sérum (10-15%) dont le rôle est de fournir les acides gras et le cholestérol sous une forme assimilable et non-toxique (Razin, 1978; Rochas and Blanchard, 2002) pour la synthèse de membrane (Razin and Tully, 1970; Razin, 1975). La dépendance vis-à-vis des stérols est

spécifique chez les Mollicutes aux Mycoplasmes, aux Uréaplasmes, aux Spiroplasmes et aux Acholeplasmes (**Poumarat et al., 1996**).

D'autres éléments de base qui servent de source de carbone et d'énergie tel que les sucres, sont nécessaires pour les mycoplasmes fermentateurs. Le milieu décrit par Frey *et al.*, 1968 (**Frey et al., 1968**) est largement utilisé aux États-Unis d'Amérique et dans d'autres pays pour l'isolement de *M. gallisepticum* et *M. synoviae*. Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) essentiel pour la culture de *M. synoviae* peut être omis du milieu pour MG (**Aldridge, 1975; Poumarat et al., 1996**). Cependant, la croissance de MG peut être nettement améliorée par l'ajout du dextrose au milieu de culture (**Kelton, 1972**).

Il est important que chaque nouveau lot de milieu soit validé avec des cultures de souches récemment isolées et ayant un faible nombre de passages *in vitro* parce que la capacité de certains composants, en particulier l'extrait de levure et le sérum, à permettre la croissance des mycoplasmes peut varier (**Aldridge, 1975**).

Une bonne croissance est obtenue après adaptation des espèces au milieu de culture adéquat avec une incubation à 36°C - 37°C mais en général, les mycoplasmes tendent à se développer très lentement mais une période de 3 à 5 jours est exigée (**Morton and Lecce, 1953**) et sont plutôt résistants à certains antibiotiques qui sont fréquemment utilisés dans le milieu pour retarder la croissance des bactéries et des champignons (**Manuel Terrestre De L'OIE, 2008**).

La plupart des mycoplasmes sont des bactéries anaérobies facultatives ; toutefois, les cultures primaires poussent plus rapidement sous atmosphère humide à 5% de CO₂ (surtout préconisée pour un premier isolement) soit dans une jarre avec une chandelle ou une étuve à CO₂. La durée d'incubation pour les mycoplasmes aviaires, varie de 24 h (ex *M.gallinarum*, *M.Anatis*) à 10 jours pour d'autres espèces (**Ben abdelmoumen, 1996**).

Le pH initial du milieu de culture devrait être stabilisé à des valeurs différentes selon le pouvoir de fermentation de la souche (soit entre 6-6.5 et 8).

Dans le bouillon de culture, les mycoplasmes n'ont pas besoin des conditions anaérobiques (**Ben abdelmoumen, 1996**).

La croissance de ces microorganismes sur gélose montre au microscope binoculaire des colonies lisses et circulaires à l'aspect typique dit en « œufs sur le plat » (fig. 2) due à la perte de paroi rigide (**O'Leary, 1989; Robinson and Bébéar, 1997**), de 10 à 500 µm de diamètre en moyenne et jusqu'à 2 mm de diamètre (**Stanbridje, 1971; Walker, 1999; Goll, 1994**). Une colonie montre un centre dense, enfoncé ou surélevé, indiquant une croissance intense des mycoplasmes avec une incrustation dans la gélose. Le centre élevé peut être présent dans les cultures initiales mais tend à être plus évident après deux ou trois passages dans les milieux de culture (**Hedia, 2005**). En zone périphérique, la colonie s'étale en surface et apparaît translucide correspondant à une croissance des cellules jeunes qui restent en surface. (**Ben abdelmoumen, 1996**).

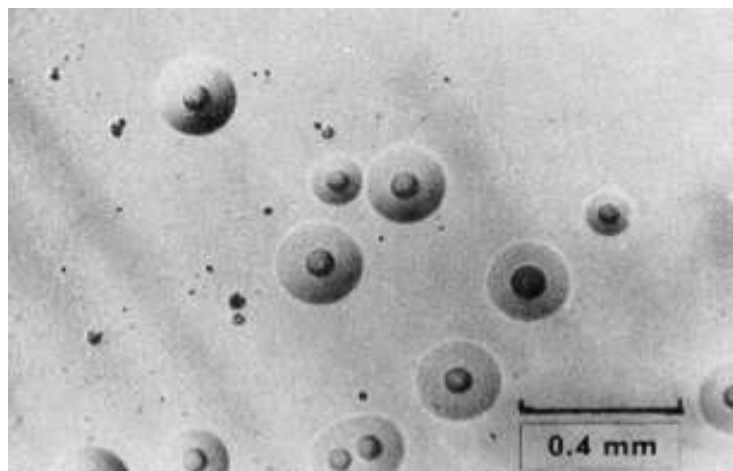


Figure 3 : Photographie de colonies d'*Acholeplasma laidlawii* au microscope (G x 50) montrant l'aspect typique en « œuf sur le plat » (Razin and Oliver, 1961).

Cette morphologie n'est décrite que pour les formes coccoides ou circulaires des mycoplasmes. Les formes filamenteuses, spiralées ou circulaires ne peuvent être décrites qu'avec l'utilisation de la coloration au Giemsa. Dans le bouillon, la croissance de ces microorganismes montre une turbidité qui est peu appréciable à l'œil nu.

A part les milieux de culture acellulaires artificiels (bouillon et gélose), les mycoplasmes peuvent être cultivés sur des oeufs embryonnés.

VI. Caractéristiques des mycoplasmes

VI.1. L'absence de paroi rigide

L'absence de la paroi rigide est la principale caractéristique qui différencie les mycoplasmes des autres procaryotes (fig.1) (**Poumarat, 1996**). Une membrane cellulaire classique de type trilaminaire constitue la seule interface avec le milieu environnant (**O'Leary, 1989**).

VI.2. Taille minimum

Les mycoplasmes sont les plus petits organismes vivants capables de s'auto-reproduire sans avoir recours aux cellules de l'hôte. Leurs génomes sont les plus petits des génomes des procaryotes allant de 0.58 à 1.35 Mb en comparaison avec celui d'*Escherichia coli* avec 1300Kb (Whitford et al., 1994). Ce bagage héréditaire restreint, a eu comme conséquence la réduction des capacités de biosynthèse des mycoplasmes. Leur culture requiert donc des milieux de composition complexe, en particulier par l'adjonction de sérum qui apporte les acides gras et le cholestérol nécessaires à l'élaboration de la membrane. Cette dépendance vis-à-vis des stérols (exception faite des *Acholeplasmes*) est également unique chez les procaryotes.

La très petite taille des mycoplasmes (0,15 à 0,8 μm) leur permet, comme les virus et contrairement aux bactéries classiques, de traverser des membranes de porosité de 0,45 μm et même de 0,2 μm par déformation (**Poumarat *et al.*, 1996**).

VI.3. Mode de développement naturel

A cause de leur fragilité, liée à l'absence de paroi, et de leur possibilité de synthèse limitée, les mycoplasmes sont exclusivement des parasites, des saprophytes ou des commensaux des organismes supérieurs. Ils sont toujours extracellulaires, bien qu'une exception ait été mise en évidence pour les mycoplasmes isolés chez des malades immunodéprimés. Ces mycoplasmes présentent une structure d'attachement et pénètrent dans les cellules (**Lam, 2005**).

VI.4. Répartition

Les Mollicutes sont des organismes extrêmement répandus dans le règne animal. Près d'une centaine d'espèces a été identifiée chez les poissons, les reptiles, les oiseaux et les mammifères. Régulièrement, de nouvelles sont décrites, laissant supposer une répartition beaucoup plus large. Les Mollicutes sont également largement répandus chez les insectes et les végétaux (**Bencina *et al.*, 2006**).

Les Mollicutes, chez l'animal, ont un tropisme tissulaire extrêmement varié et des niches écologiques multiples. Il en existe même dans la flore ruminale des bovins. Cependant, on les retrouve principalement au niveau des muqueuses respiratoires, génitales et oculaires (**Lam, 2005**).

VI.5. Les mycoplasmes et leur hôte

Parmi les Mollicutes, certaines espèces sont responsables d'affections graves d'un point de vue médical et/ou économique, dans le domaine vétérinaire. Ce sont : *M. mycoides subsp.mycoides* biotype small colony, agent de la péri-pneumonie contagieuse bovine, *M.gallisepticum*, agent de la maladie respiratoire chronique des volailles, *M.hypopneumoniae*, agent de la pneumonie enzootique du porc, *M. agalactiae*, agent de l'agalactie contagieuse des petits ruminants.

On attribuait aux mycoplasmes une spécificité d'hôte stricte et étroite (**Kokotovic et al., 1999**). Plusieurs exemples s'opposant au principe de la spécificité d'hôte ont été démontrés chez l'homme et chez les espèces animales. On sait actuellement qu'elle est préférentielle mais pas exclusive; *M Phocicerebrale* est le seul mycoplasme pathogène des animaux qui infecte régulièrement les humains, causant une maladie appelée seal fingers (**Lierz et al., 2008**), on retrouve *M.canis* (chien) ou *M.gallisepticum* (volailles) chez les bovins (**Lam, 2005**), *M.capricolum* (chèvre) chez les bovins et les volailles (**Bencina et al., 2006**), *M.bovis* chez la volaille (**Ongor et al., 2008**).

VI.6. L'ubiquité des Mycoplasmes

La répartition, la diversité et l'importance des mycoplasmes a longtemps été sous-estimée.

En effet, comparés aux autres bactéries, on pourrait supposer que les mycoplasmes sont déficients dans leur capacité d'adaptation, tant ils sont limités par leur fragilité, leur information génétique restreinte et leur dépendance vis-à-vis des nutriments essentiels. L'acquisition évolutive de systèmes pour compenser ces limites a donc été une condition pour la survie des mycoplasmes. Les clés de cette adaptation résident probablement dans les composants de la membrane unique entourant ces microorganismes. Cette membrane doit subvenir à tous les transports, à toutes les interactions physiques et sensorielles, entre le mycoplasme et l'environnement d'accueil.

VII. Propriétés physiques et chimiques

L'absence de la paroi confère aux mycoplasmes une certaine fragilité. Ils sont ainsi sensibles ; à la chaleur (quelques minutes à 60°C), aux rayons ultraviolets et aux ultrasons, aux chocs osmotiques, et à tous les désinfectants usuels (**Clyde *et al.*, 1980; Villate, 2001**). En revanche, l'absence de structure pariétale leur permet de ne pas subir les attaques du lysozyme (**Olivier, 2001**). On peut conserver facilement les mycoplasmes par le froid, ils résistent quelques jours au réfrigérateur et plusieurs mois au moins congelés entre -20°C et -70°C (**Clyde *et al.*, 1980; Blanchard and Montagnier, 1994**). Raccac et al, 1975 in **Stanbridje, 1971** ont démontré que la conservation des mycoplasmes à une température de -70°C a détruit plus de cellules qu'à -20°C, mais la viabilité est plus appréciable à -70°C. Ils peuvent s'avérer très résistants s'ils sont conservés dans un environnement riche en protéines, humide et frais (**Poumarat *et al.*, 1991**). Par exemple, *Mycoplasma dispar* s'est révélée être résistante dans le poumon plus de 14 jours (**Rosenbasch, 1994**). Plusieurs de ces micro-organismes sont capables de survivre au stress de la nébulisation, dans des particules suspendues dans l'atmosphère (**Charles *et al.*, 1967**).

Les mycoplasmes résistent peu dans le milieu extérieur ; 1 jour sur les vêtements et 1-3 jours dans les fientes et l'eau de boisson (**Villate, 2001**). Christensen *et al.*, 1994 ont étudié la survie de 3 mycoplasmes aviaires dans l'environnement des oiseaux. Ils ont démontré que la survie la plus longue des 3 espèces a eu lieu sur les plumes ; MG a survécu entre 2 et 4 jours et MS, 2 à 3 jours. La souche de *M. iowae* est restée en vie 5 jours sur les plumes. Cette souche a également survécu au moins 6 jours sur les cheveux humains et sur plusieurs autres supports. MG a survécu sur les cheveux humains jusqu'à 3 jours et a pu être isolé également à partir des échantillons de paille, de coton et de caoutchouc après 2 jours (**Christensen *et al.*, 1994**). Cette résistance est tributaire de la charge initiale de ces microorganismes. **Polak-Vogelzang, 1977** et **Shahd-Majid, 1988** ont démontré que MG peut être isolée de l'eau de boisson des oiseaux infectés (surtout après addition de milieu liquide pour culture des mycoplasmes ; PPLO broth à l'eau de boisson) lorsque la charge de MG est de 5.5×10^8 organismes/ml.

VIII. Importance économique de l'infection mycoplasmique

Très répandue dans les élevages avicoles, les pertes économiques qu'occasionne l'infection mycoplasmique sont considérables, quel que soit le type d'élevage.

Ainsi, les mycoplasmoses cliniques sont responsables de :

- 1 à 7% des cas de mortalité,
- 10% de chutes de ponte,
- 10 à 15% des troubles de l'éclosabilité.

Le rendement, en viande ou en production d'œufs, est diminué de 5 à 7% dans les élevages contaminés d'une façon inapparente comparé aux élevages indemnes de mycoplasmes.

A ces pertes (mortalité, diminution de croissance, augmentation de l'indice de consommation, saisie) s'ajoutent des dépenses en médicaments souvent lourdes par rapport aux résultats obtenus.

La mise en place de prophylaxies sanitaire et médicale souvent mal adaptées, augmente encore les dépenses dues à cette infection. D'autant plus qu'il s'agit de maladies contagieuses qui frappent non seulement les élevages de poulets et de dinde, mais de plus en plus, les élevages de pigeons et de perdrix, d'oies et de canards.

La difficulté d'élaborer un plan cohérent de prophylaxie, les contraintes techniques liées à l'application de ces plans et le nombre restreint de laboratoires spécialisés susceptibles d'effectuer la recherche et le contrôle des mycoplasmoses aviaires font que les infections mycoplasmiques ne sont pas encore en voie de disparition (**Gaillard-Perrin, 1984**).

IX. Rôle des facteurs de l'environnement

Il est bien connu que les infections respiratoires soient sensiblement affectées par des facteurs environnementaux, et cette sévérité de la maladie est accrue pendant les mois d'hiver.

La température, la ventilation, l'humidité, l'ammoniac atmosphérique, ont tous des interactions importantes avec les agents infectieux en provoquant la maladie respiratoire.

Cependant, il y a eu relativement peu d'études sur l'influence des facteurs environnementaux sur la sévérité des infections à mycoplasmes. La poussière de l'air a augmenté de manière significative la sévérité des lésions des sacs aériens causées par *M.meleagridis* chez les dindes (**Anderson et al., 1968**). Les poulets maintenus à des températures de 7°C à 10° C étaient plus susceptibles aux aérosacculites provoquées par *M. synoviae* que des poulets maintenus à 24°C à 29°C ou à 31°C à 32° C (**Yoder et al., 1977**).

X. Pouvoir pathogène des mycoplasmes chez les volailles

X.1. Epidémiologie

En pathologie aviaire, la maladie respiratoire chronique de la poule (M.R.C), est de même que la synovite infectieuse ou la sinusite de la dinde due respectivement à *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* et *Mycoplasma meleagridis* sont connues depuis bien longtemps.

Les efforts prophylactiques ou les interventions chimiothérapeutiques ont, au fil des années, probablement diminué le nombre des cas cliniques de ces affections, cependant, ils n'ont pas permis d'éliminer les principaux agents de ces maladies. Ainsi, la multiplication des élevages, la forte concentration d'animaux, la coexistence d'espèces diverses (poules, dindes, pigeons, canards,...), l'excès d'ammoniac atmosphérique, les basses températures la recherche de hauts rendements et/ou de fortes productions, non associés à un plan de lutte adéquat, sont autant de facteurs qui entretiennent la pérennité de ces infections (**Kleven, 1998**).

Les sérotypes de mycoplasmes autres que MG, MS, et MM prennent, eux aussi, une importance de plus en plus grande en pathologie aviaire : par exemple *Mycoplasma gallinarum*,

sérotype reconnu peu pathogène a été retrouvé chez des animaux souffrant d'une aérosacculites (**Gaillard-Perrin, 1984**).

La théorie de la spécificité d'hôte semble être de plus en plus difficile à soutenir, ainsi *Mycoplasma gallisepticum* a été retrouvé chez le canard, la poule, la dinde, la perdrix et la caille (**Nascimento et al., 2005**) ; *Mycoplasma columbinasale*, hébergée par le pigeon, a été isolée chez la dinde (**Grumbles et al., 1983**), *Mycoplasma pullorum*, hébergée par la poule a été retrouvée chez des faisans présentant des symptômes respiratoires.

Enfin, d'autres espèces animales (bovins, caprins par exemples peuvent héberger de façon exceptionnelle des mycoplasmes « dits aviaires » (**Gaillard-Perrin, 1984**). A coté des porteurs sains identifiables le plus souvent par examen sérologique ou bactériologique, la diffusion des infections mycoplasmiques et à posteriori leur expression clinique peut être assurés par des sujets porteurs sains non identifiables au plan sérologique. La durée de portage, donc l'excrétion, peut être longue et passer inaperçue pendant des semaines voire des mois.

Les traitements antibiotiques, quelquefois mal adaptés, administrés de façon répétée aux animaux en dehors des interventions prophylactiques, n'assurent pas toujours leur stérilisation et les transforment, de la même façon, en porteurs sains chroniques. De plus, dans ces cas, les mycoplasmes qui survivent se révèlent difficiles à isoler et résistants aux traitements antibiotiques classiques et rendent ainsi encore plus aléatoire tout plan de lutte médicale (**Gaillard-Perrin, 1984**).

X.2. Pathogénie

Il est souvent difficile de mettre en évidence le rôle pathogène direct des mycoplasmes, parce que dans beaucoup de cas il y a une interaction complexe avec d'autres microorganismes, telles que les bactéries ou les virus.

Le processus pathogénique est le résultat de deux phénomènes : l'action directe des mycoplasmes sur les cellules de l'hôte et leur interaction avec le système immunitaire.

X.2.1. Action directe des mycoplasmes

a) Pouvoir d'adhésion

L'étape initiale de la colonisation est l'attachement ou l'adhésion des mycoplasmes aux cellules du revêtement épithélial. Plusieurs études ont démontré que la perte de la capacité d'adhésion par mutation des mycoplasmes signe la perte de leur virulence (**Kheyar et al., 1995; Zanella et al., 1998**)

En effet, les mycoplasmes sont considérés comme des parasites extracellulaires, aussi bien chez l'homme que chez les animaux (**Papazisi et al., 2003**). Ils possèdent des protéines spécifiques d'adhésion ; les adhésines surtout reconnues chez le mycoplasme humain, *M.pneumoniae* (**Lockaby et al., 1998**). Cette adhésion semble être attribuée à l'action d'une région morphologiquement distincte connue sous le nom de « structure terminale » favorisant le contact intime entre le mycoplasme et la membrane de la cellule hôte par les résidus d'acides sialiques de cette dernière (**Kheyar et al., 1995; Orenstein et al., 2003**). L'association intime des mycoplasmes entraîne une augmentation des concentrations locales des métabolites toxiques pouvant s'accumuler et endommager les cellules.

Les Mycoplasmes envahissent rarement la circulation sanguine et les tissus (**Razin, 1978; Boguslavsky et al., 2000**). Il semblerait qu'il existe différents genres de mécanismes d'adhérence selon les espèces de mycoplasmes et l'hôte (**Bredt et al., 1981; Ross and Young, 1993**). L'isolement de MG chez la volaille atteinte de polyarthrite induite par infection expérimentale et des emplacements divers dans le corps des oiseaux naturellement infectés, tels que la région urogénitale, la bile, le cerveau (**Kleven, 1998; zanella et al., 1998**), le cœur et les reins (**Olanrewaju et al., 2009**), implique que ce microorganisme a la capacité de traverser la muqueuse respiratoire, passer

dans la circulation sanguine, et se disséminer dans tout le corps (**Winner *et al.*, 2000; Burnham *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2005**).

b) Production de substances toxiques :

Les mycoplasmes se développent à la surface des épithéliums. L'association intime avec les cellules hôtes induit un environnement tel que les concentrations en toxiques excrétés par les mycoplasmes (H₂O₂, NH₃) s'accumulent et provoquent des dommages tissulaires (**Razin, 1978; Rawadi and Dussurget, 1995; Lockaby *et al.*, 1998**). Ainsi, le H₂O₂ excrété par les mycoplasmes attachés à la surface de la cellule hôte peut attaquer la membrane des cellules sans être rapidement détruit par la catalase ou la peroxydase contenue dans les liquides corporels extracellulaires. Les enzymes hydrolytiques produites par les mycoplasmes peuvent endommager les membranes cellulaires de l'hôte. Des toxines plus spécifiques sont également synthétisées localement par certaines espèces. Jusqu'ici, on a pu identifier une exotoxine vraie avec des propriétés neurotoxiques isolée seulement dans les cultures du *M. neurolyticum* chez les souris. La toxine est une protéine thermolabile séparable des cellules par filtration à travers des filtres de 100 nanomètres de diamètre.

Enfin, les mycoplasmes endommagent l'endothélium, ce qui provoque l'agrégation des plaquettes, leur dégranulation et l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation. La voie intrinsèque est activée par l'exposition du collagène subendothélial. Ces phénomènes initialisés par l'atteinte de l'intégrité de l'endothélium vasculaire, sont eux-mêmes à l'origine de troubles.

c) Pouvoir invasif

L'existence d'une pénétration intracellulaire a longtemps été controversée.

Peu d'études ont réellement été menées sur le pouvoir invasif. Seules des études sur certains mycoplasmes humains (*Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*) ont permis de mettre en évidence que ces espèces peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules épithéliales et s'y multiplier lentement. Winner *et al.*, 2000

(cités par **Mathengheng, 2007**) ont rapporté que *M.gallisepticum* est la seule espèce aviaire qui a un pouvoir invasif à l'opposé de MS et des autres espèces de mycoplasmes aviaires non pathogènes (**Kleven, 2008**). Cette situation expliquerait la longue persistance des mycoplasmes et le caractère chronique de l'infection (**Razin, 1999; Winner et al., 2000; Sasaki et al., 2002**)

X.2.2. interaction avec le système immunitaire de l'hôte

Le rôle pathogène des mycoplasmes est basé sur deux facteurs principaux: la transformation ou l'imitation biologique, et la capacité de perturber le mécanisme immunitaire de leur hôte. L'absence de paroi rend les mycoplasmes sensibles au complément et aux anticorps mais en dépit de cette sensibilité, les infections mycoplasmiques sont souvent de nature chronique prouvant les échecs continus du système immunitaire à éradiquer cette maladie. Ce ci démontre que certaines souches pathogènes de mycoplasmes ont des mécanismes plutôt sophistiqués d'adaptation rapide aux microenvironnements changeants.

En effet, en l'absence de paroi des échanges d'Ag sont possibles entre les membranes des mycoplasmes et celles des cellules de l'hôte (**Kleven, 1998; Evans et al., 2005**). Les mycoplasmes s'associent à la surface de la cellule hôte et le fait de pouvoir attacher les protéines exogènes à leur membrane cytoplasmique leur confère la possibilité de s'entourer d'Ag de la cellule hôte. Ainsi, par ce mécanisme, les mycoplasmes peuvent échapper au système immunitaire de l'animal hôte même s'ils sont en position extracellulaire parmi les villosités des cellules épithéliales des muqueuses infectées (**Jan et al., 2001**) et les phénomènes de défense ciblant ces Ag peuvent alors détruire les cellules de l'hôte (**Minion et al., 1993; Rottem, 2003**). Par conséquent, ils sensibilisent leurs hôtes à des infections secondaires par d'autres microorganismes tels que *Escherichia coli*, *Haemophilus paragallinarum*, *Staphylococcus aureus*, et *Pasteurella multocida* chez les poules et les dindes (**Javed et al., 2005**). Chez l'espèce humaine, des études basées sur la relation existant entre le virus du syndrome de l'immunodéficience acquise humaine (VIH) et les mycoplasmes (*M.fermentans*, *M.penetrans*, *M.pirum*), démontrent que ces derniers sont de plus en plus isolés chez les personnes

infectées par le VIH, le rhumatisme articulaire, la maladie de Crohn et le sida et qu'ils agissent comme cofacteurs accélérant la progression de la maladie. (**Razin, 1992; Blanchard and Montagnier, 1994 ; Lo et al., 1996; Vollenbroich et al., 1997; Stakenborg, 2005**)

X.3. Transmission

La transmission des mycoplasmes est soit verticale par l'intermédiaire des œufs à couver ; résultant surtout du contact intime de l'ovaire et des sacs aériens (**Villate, 2001**), soit horizontale, principalement par voie respiratoire par contact direct entre des oiseaux sensibles et d'autres infectés cependant, la transmission indirecte par l'intermédiaire des humains peut jouer un rôle très important du fait de la persistance de MG dans l'environnement (**Behbahen et al., 2005**).

La transmission horizontale résulte soit de contacts directs entre oiseaux malades ou porteurs et oiseaux sensibles, soit de contacts indirects par l'intermédiaire de l'homme, des oiseaux sauvages ou du matériel d'élevage, l'aliment et l'eau souillés (**Maroi et al., 2001; Marois et al., 2002**). On suspecte également les rongeurs, les mouches et autres insectes à transmettre l'infection (**Kleven, 1989**).

La transmission verticale s'effectue par l'intermédiaire de l'œuf embryonné infecté au cours de sa formation dans l'ovaire, ou bien lors de son passage dans l'oviducte, et ceci, par voie hématogène ou à partir des sacs aériens. Ainsi, MG fut isolée à partir de l'oviducte des poules et du sperme des coqs infectés. On a rapporté que MG survit dans les voies nasales des humains pendant 24 heures ; sur la paille, le coton et le caoutchouc pendant 2 jours, sur les cheveux humains pendant 3 jours et sur des plumes pendant 2-4 jours comme cités par Ley, 2003 (**Mathengtheng, 2007**). La transmission sexuelle (*M.iowae*, *M.meleagridis*) est prouvée surtout par l'insémination artificielle. *M.meleagridis* colonise l'ovaire dès la ponte et assure ainsi sa pérennité verticale (**Bigland et al., 1968**). Dans l'étude réalisée par Grant, 1987 (**Abdul-Rahman et al., 1996**) la transmission verticale a diminué avec le temps, ainsi que le taux de mortalité embryonnaire. Cependant, dans toute cette

étude, bien que la présence de *M. iowae* dans l'oviducte ait diminué, sa présence dans le cloaque est toujours confirmée.

Dans le cas de MS, la transmission s'effectue horizontalement, par contact direct. La propagation de ce microorganisme se fait de la même manière que pour MG (**Bencina *et al.*, 1988**), à une vitesse toutefois moins importante (**Weinack *et al.*, 1983**). Dans la plupart des cas, la mycoplasmoses à MS se propage par voie aérienne. La transmission verticale de MS existe mais pas de façon régulière chez les oiseaux infectés aussi bien par la voie naturelle que de façon expérimentale (**Maroi *et al.*, 2001**). En effet, dans le cas de MS, la contamination de l'oeuf résulterait de l'infection de l'ovaire ou de l'oviducte par voie hématogène ou à partir des sacs aériens, ce qui explique l'irrégularité de la transmission. Cependant, *M. synoviae* peut persister sur des plumes au delà de 2 ou 3 jours à la température ambiante (**Marois *et al.*, 2005**)

Toutes fautes d'élevage aggravent le pronostic. Les lésions sont dues à la virulence même des mycoplasmes, associées à la réponse immunitaire qu'ils suscitent.

Cette transmission indirecte est relativement surprenante pour des bactéries sans paroi, réputées fragiles vis-à-vis de chocs osmotiques, de la chaleur, des détergents et des désinfectants.

X.4. Aspects cliniques

Les mycoplasmes forment un grand groupe de micro-organismes procaryotes avec plus de 190 espèces distinguées des bactéries ordinaires par leur petite taille, leur génome minutieux (**Rottem, 2003**).

Les oiseaux abritent une vingtaine de sérotypes de mycoplasmes. Les espèces les plus pathogènes sont : *M. gallisepticum*, *M. synoviae*. Puis viennent en fonction des circonstances :

M.meleagridis, *M.iowae*. Les autres espèces sont considérées comme inoffensives la plupart du temps (**Gordon, 1979; Villate, 2001**).

D'autres mycoplasmes aviaires peuvent montrer une certaine pathogénicité dans certaines circonstances. Par exemple, *M. gallinarum* a été impliqué dans une manifestation de la maladie respiratoire chez les poulets de chair et *M. pullorum* a été associé à la mortalité d'embryon de dinde en France (**Kleven, 1998**).

X.4.1. *Mycoplasma gallisepticum*

A l'instar des autres mycoplasmes, *M. gallisepticum* est d'une taille minuscule, il est doté d'une information génétique minime et il est totalement dépourvu de paroi bactérienne. C'est ce qui explique l'interdépendance étroite entre *M. gallisepticum* et l'animal hôte, ainsi que les difficultés d'isoler l'organisme *in vitro* (**Levisohn and Kleven, 2000**).

La maladie respiratoire chronique chez la poule (MRC) et la sinusite infectieuse chez la dinde résultent d'infections par *M.gallisepticum* associées le plus souvent à d'autres agents infectieux, tels des virus sauvages ou vaccinaux (virus de la maladie de Newcastle, bronchite infectieuse, laryngotrachéite infectieuse, rhinotrachéite infectieuse,), des bactéries (*E.coli*, *Haemophilus*, *Pasteurella*..) ou des parasites (*Aspergillus*...) (**Adler et al., 1962; Kleven, 1998; Nhu et al., 2003**). Elle peut infecter également le canard et la perdrix (**kempf, 1996**).

Des études récentes ont indiqué que les souches de *M gallisepticum* diffèrent nettement dans leur pathogénicité pour les poulets (**Razin, 1975; Rosengarten et al., 2000; Valks and Burch, 2002**) et que les passages *in vitro* dans le milieu artificiel affectent sa virulence (**Brown et al., 2007**)

Selon Kleven, 1990 (in **Valks and Burch, 2002**) l'incidence de la maladie est favorisée par l'intensification de la production avicole et entraîne des pertes économiques du fait du retard de croissance, de l'augmentation des indices de consommation de 10-20%, des saisies à l'abattoir, des

baisses de productions d'œufs commercialisables de 10-20% et des diminutions d'éclosabilité des poussins et des dindonneaux de 5-10%.

L'effet de ces agents pathogènes s'ajoute à celui de facteurs prédisposant tels que les mauvaises conditions d'ambiance (taux d'ammoniac excessif, poussière, humidité, plumes d'oiseaux, ventilation mal réglée.), les stress subis par les oiseaux (vaccination, transport, débecage...), les carences et le parasitisme pour faciliter la propagation de ce microorganisme (**Hudson et al., 2006**).

La transmission *in ovo* de *M. gallisepticum* entre les sujets reproducteurs contaminés et leur progéniture est la principale voie de propagation de l'infection et un sujet de préoccupation majeur pour les échanges internationaux (**Levisoh and Kleven, 2000**).

Les manifestations cliniques, lésionnelles, de même que la contagiosité des infections à *Mycoplasma gallisepticum* sont dépendantes :

- De l'âge des animaux ; les jeunes sont plus sensibles que les adultes ; poussins de 5-11 jours d'âge (**Yamamoto and Bigland, 1964**).
- De la voie d'entrée des germes dans l'organisme. La voie d'entrée la plus importante est la voie respiratoire, par contact ou par inhalation entre animaux excréteurs et animaux sains, à l'occasion des différentes manipulations d'élevage. La contamination se fait aussi d'une façon non négligeable au moment de l'éclosion. L'inoculation par voie intraveineuse ou à travers les coussinets plantaires peut provoquer l'apparition de troubles nerveux et articulaires (**Gaillard-Perrin, 1984**).
- De la dose ; son effet est négligeable lors d'inoculations expérimentales (**Gaillard-Perrin, 1984**).
- De la virulence des souches ; ce serait le facteur le plus important dans la genèse des symptômes et l'évolution de la maladie.

a) Incubation et symptômes

L'infection due à *M. gallisepticum* se manifeste par une grande variété de signes cliniques, mais même lorsqu'elle sévit de façon insidieuse, l'impact économique peut être important (**Kleven, 1989**). La forme clinique la plus grave est une maladie respiratoire chronique chez les volailles destinées à la consommation.

Il existe une variabilité de tropisme pour les tissus et parfois on observe un tropisme neurologique pour cette espèce (**Kleven, 1998**).

Lors d'infection expérimentale, la période d'incubation avoisine 5 à 21 jours (**Razin and Rottem, 1967; Kempf, 1992**) et des souches de MG fraîchement isolées, ayant subi peu de passages sur milieux artificiels, sont plus virulentes que les souches entretenues depuis longtemps au laboratoire (**Yagihashi et al., 1988**).

Dans les conditions naturelles, la durée d'incubation est beaucoup plus variable ; elle peut durer toute la vie de l'oiseau et l'infection n'est souvent révélée que par une séroconversion (**Mathengtheng, 2007**). De nombreux lots de poussins et de dindonneaux issus d'œufs infectés (surtout s'ils ont été soumis à des traitements antibiotiques) ne présentent de symptômes et de séroconversion que très tardivement, parfois seulement lors du pic de ponte, c'est-à-dire en période de stress (**kempf, 1996; Villate, 2001**).

L'infection par *M.gallisepticum* peut rester subclinique ou se limiter à une simple séroconversion. Dans d'autres cas, elle provoque des symptômes respiratoires qui comprennent principalement du coryza, des éternuements, du jetage et de la dyspnée. Les oiseaux les plus atteints restent prostrés, le bec ouvert. La sévérité de la maladie est considérablement augmentée par les infections secondaires avec des virus tels que la maladie de Newcastle et bronchite infectieuse, et/ou des bactéries telles qu'*Escherichia coli* (**Hudson et al., 2006**).

Chez le dindon, une sinusite suborbitaire uni ou bilatérale peut être observée. Elle empêche dans les formes les plus graves, l'ouverture des yeux et donc la prise d'aliments. La croissance des dindonneaux et des poulets de chair est ralentie.

Chez les dindes et les poules pondeuses, le taux de ponte peut être diminué (environ 10 à 15 œufs en moins par poule) et le pourcentage d'œufs déclassés paraît augmenté. On constate aussi une faible éclosabilité et des mortalités à l'éclosion (5 à 10% de mortalité embryonnaire). La morbidité est souvent élevée, et la mortalité très faible chez les adultes ou dans les formes non surinfectées peut atteindre 30% en fonction des infections concomitantes et des conditions d'ambiance et d'entretien des oiseaux.

b) Lésions

Au début de l'infection, les lésions peuvent se limiter à la présence d'une quantité importante de mucus ou à une inflammation catarrhale des premières voies respiratoires et un oedème des sacs aériens. Puis, une inflammation fibrineuse des sacs aériens et de différents organes internes (péritoine, capsule hépatique) peut être observée.

Chez la dinde, les sinus sont d'abord remplis d'un abondant mucus séreux qui est ensuite remplacé par du matériel caséux (**Villate, 2001**). Les lésions de l'appareil respiratoire sont parfois sévères chez des oiseaux présentant peu de signes cliniques. Leur intensité dépend des germes de complication de la mycoplasmosé et affecte le taux de saisie à l'abattoir. Des lésions de ténosynovite, d'arthrite ou de salpingite caséuse sont parfois observées lors d'infections par des souches à tropisme articulaire ou génital plus marqué.

c) Diagnostic et lutte

Dans la plupart des pays, les programmes de lutte contre *M. gallisepticum* consistent à préserver de l'infection les élevages de sujets reproducteurs. Dans les cas où il est impossible de

mettre en oeuvre une prophylaxie sanitaire, on a recours à la vaccination, notamment à l'aide de nouveaux vaccins à mycoplasmes vivants.

Des progrès majeurs ont été accomplis ces dernières années en matière de diagnostic. La prophylaxie se fonde sur des programmes de dépistage sérologique utilisant l'épreuve d'agglutination sur lame ou des épreuves immuno-enzymatiques. Les réactions positives à l'épreuve d'agglutination sur lame doivent être confirmées par d'autres épreuves sérologiques et/ou par des tests démontrant la présence du mycoplasme. En principe, on peut soit isoler *M. gallisepticum*, soit identifier son acide désoxyribonucléique à l'aide de méthodes moléculaires. L'amplification en chaîne par polymérase est une méthode alternative, à la fois plus rapide et plus sensible que les méthodes traditionnelles de mise en culture qui font appel à des techniques spécialisées et longues. Les méthodes récemment développées de typage moléculaire offrent de nouvelles perspectives pour les études épidémiologiques et l'identification des réservoirs d'infection.

X.4.2. *Mycoplasma synoviae*

Comme pour MG, le pouvoir pathogène de MS est exacerbé lors d'association avec des bactéries et des virus à tropisme respiratoire ou articulaire. C'est l'agent essentiel de la synovite infectieuse du poulet de 1 à 4 mois et du dindon de 10 à 24 semaines (**Villate, 2001**).

L'infection de l'appareil respiratoire par MS est souvent inapparente pour le poulet ou le dindon. Elle n'est révélée que par la séroconversion. Lors de formes cliniques, les symptômes et les lésions de l'appareil respiratoire sont similaires à ceux observés avec MG, mais ils sont généralement moins graves.

Lors de troubles articulaires (synovite infectieuse), l'infection par M.S. chez les animaux en croissance se caractérise par une faiblesse progressive des membres avec gonflement des articulations pouvant aller jusqu'à empêcher les animaux à se tenir debout, ainsi qu'une pâleur de la crête et des barbillons. Les lésions consistent en un œdème de la membrane synoviale, des tissus péri articulaires et des gaines tendineuses. Un exsudat visqueux puis crémeux, voire caséeux, chez

le poulet, est retrouvé dans les articulations des pattes, qui sont amyotrophiées, ainsi que, dans les formes les plus graves, au niveau du crâne et des vertèbres cervicales. Des ampoules de bréchet sont fréquemment observées.

Lors de troubles respiratoires, les symptômes observés, lorsqu'ils existent, sont les mêmes que pour MG, mais, là encore, les manifestations cliniques et l'évolution de la maladie dépendent de la voie d'entrée, de la virulence et du tropisme des souches.

Inoculé par aérosol, MS provoque l'apparition des signes respiratoires, inoculé au niveau des coussinets plantaires, des signes articulaires. La gravité des symptômes observés et le degré de transmission verticale peuvent varier en fonction des souches (**Gaillard-Perrin, 1984**).

M.synoviae entraîne des pertes économiques importantes en raison de la baisse de production d'œufs, de retards de croissance et de saisies de carcasses du fait des lésions d'aérosacculites ou d'arthrites.

Le diagnostic sérologique de l'infection pose des difficultés en raison de la communauté antigénique entre MG, MS et d'autres espèces de mycoplasmes aviaires (**Ben Abdelmoumen et al., 1999**).

X.4.3. *Mycoplasma iowae* (MI)

Le pouvoir pathogène de ce mycoplasme, diagnostiqué plus récemment, est moins connu que celui de MG, MS, ou MM Sa croissance sur milieu de culture est très lente et les colonies ne sont visibles qu'après 2 semaines de culture (**Boyle et al., 1995**). Ce mycoplasme affecte surtout la dinde reproductrice puis la poule. Dans les conditions naturelles, l'infection par *M.iowae* peut se traduire par une éclosabilité réduite (de 5% à 20%) en fin d'incubation due à des mortalités embryonnaires tardives (du 18 au 24^e jour d'incubation). Les embryons morts sont de petites tailles, congestionnés et présentent un œdème de la tête et du cou, des dépôts d'urates à la surface du corps et au niveau des uretères, une hépatite et une paralysie des pattes (**Kempf, 1996**).

L'inoculation de *M.iowae* au dindonneau de un jour entraîne des aérosacculites, des retards de croissance, des anomalies de plumage et des déformations des pattes (chondrodystrophies, courbures des os, ruptures des tendons fléchisseurs des doigts) (**Zhao and Yamamoto, 1990**).

XI. Diagnostic

A. Diagnostic sérologique

A cause des réactions non spécifiques et des communautés antigéniques existant entre la plupart des espèces de mycoplasmes aviaires (**Roberts and Olesiuk, 1966; Ben Abdelmoumen et al., 1999**), les tests sérologiques manquent de spécificité et s'avèrent, dans certains cas, inefficaces. Le dépistage sérologique des infections à mycoplasmes met en évidence dans le sérum ou le vitellus, des anticorps d'origine infectieuse, maternelle ou vaccinale. Les techniques sérologiques les plus employées pour le diagnostic sérologique de MG et MS sont l'inhibition de l'hémagglutination (IHA) (**Brown et al., 1991**), l'agglutination rapide sur lame (ARL) décrite initialement par Adler, 1954 (**Nougayrede et al., 1984**), l'immunofluorescence et l'immunoperoxydase sont les méthodes les plus appropriées pour l'identification des espèces de mycoplasmes dans les culture mixtes (**Bencina and Bradbury, 1992**). Il y a également le test de microimmunofluorescence ou les tests immuno-enzymatiques (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (ELISA) (**Kempf et al., 1993**).

L'inhibition de l'hémagglutination est plus spécifique que l'ARL qui présente souvent des réactions positives non spécifiques particulièrement dues à la grande fréquence d'utilisation des vaccins inactivés (**Bradbury and McCarthy, 1990**). L'IHA est utilisé comme un test de confirmation à cause de sa grande spécificité. Elle détecte principalement les IgG d'apparition plus tardive que les IgM détectées par l'ARL. La difficulté de l'utilisation de l'IHA est liée à la préparation et à la conservation des antigènes hémagglutinants. Le test de micro-

immunofluorescence a été utilisé pour déceler les anticorps vis-à-vis des mycoplasmes dans les sérums d'oiseaux. Après que sa spécificité a été établie, ce test a été appliqué à la détection de MS chez des poulets et des dindes infectés expérimentalement et naturellement. Ce test est considérablement plus sensible que l'ARL ; de plus, il permet de détecter les réagissants précocement chez les oiseaux infectés expérimentalement et les titres obtenus sont nettement plus élevés chez les oiseaux infectés naturellement et expérimentalement.

Les tests ELISA sérologiques commercialisés peuvent présenter un manque de spécificité ou de sensibilité. Ainsi, le diagnostic bactériologique, qui est basé sur l'isolement de l'agent étiologique suivi de l'identification de ce dernier, constitue un outil sur et plus fiable que le dépistage sérologique.

B. Diagnostic bactériologique

B.1. Isolement

Compte tenu de la diversité du tropisme des mycoplasmes aviaires, ces agents peuvent être prélevés dans les poumons, les sacs aériens, la trachée, les yeux, l'œsophage, le cloaque ou dans les produits biologiques tels que le liquide sinusal, le liquide synovial ou dans les œufs provenant de poulets infectés (**Rosenbasch, 1994**). Le choix du prélèvement varie en fonction des commémoratifs ou des signes cliniques lorsqu'ils sont présents. Les prélèvements doivent être effectués sur 10% des animaux repartis uniformément dans l'élevage. La recherche de tous les mycoplasmes aviaires se fait par mise en culture directe sur milieu de Frey (**Withford *et al.*, 1994**) contenant 15% de sérum de porc, de bovin ou de cheval, 10% d'extrait de levure, des antibiotiques ou des inhibiteurs (pénicilline et acétate de Thallium), de l'arginine et du glucose. Sur un tel milieu, la croissance de tous les mycoplasmes est favorisée, à l'exception de MS qui nécessite la nicotinamide adénine Dinucleotide (NAD) et la cystéine pour sa croissance (**Adler *et al.*, 1974**; **DaMassa and Adler, 1975**). L'incubation des milieux solides et liquidesensemencés doit se faire au minimum pendant cinq à sept jours à 37°C et en présence de 5% de CO₂ pour les milieux

solides. Le plus souvent, la croissance des mycoplasmes n'est pas évidente après une si brève période d'incubation. Pour obtenir de meilleurs résultats, deux à trois passages sériés aveugles de trois à cinq jours d'intervalle permettent d'augmenter le nombre des isolats. Une éventuelle croissance des mycoplasmes dans le bouillon se manifeste par un changement de pH du milieu accompagné d'une légère turbidité appréciée à l'oeil nu après agitation du milieu de culture. Une croissance sur milieu solide se manifeste par l'apparition à la surface de la gélose des colonies de mycoplasmes typiques dite "œufs sur le plat". Dans certains cas, les formes L de bactéries sont souvent confondues avec les mycoplasmes et présentent quasiment le même aspect sur milieu solide. La distinction, se fait par une bonne visualisation à la loupe binoculaire de la partie périphérique des colonies des formes L des bactéries qui est légèrement plus granuleuse correspondant à des corps élémentaires (**International Committee on Systematic Bacteriology, 1972**). Cette distinction se fait aussi par la coloration de Diènes ou seules les colonies de mycoplasmes se colorent. Une fois les colonies typiques de mycoplasmes sont clonées et purifiées, la culture finale servira comme culture primaire pour l'identification biochimique, sérologique ou moléculaire des microorganismes.

B.2. Identification

L'identification se base sur l'étude des caractères cultureux, biochimiques, sérologiques et moléculaires.

B.2.1. Caractères cultureux

L'étude des caractères cultureux fournit très peu de renseignements concernant d'une part, la morphologie des mycoplasmes en notant qu'il n'y a pas de différences énormes entre les colonies des différents sérotypes, et d'autre part, la durée de croissance, puisque la plupart des mycoplasmes peuvent mettre trois semaines et plus pour croître. Le besoin absolu de MS en Nicotinamide adénine Dinucleotide et en cystéine constitue une particularité de son caractère cultural.

B.2.2. Tests biochimiques

En 1967, Fabricant et Freundt (**Fabricant and Freundt, 1967**) ont attiré l'attention sur le manque de tests de laboratoire simples pour la caractérisation des mycoplasmes et depuis un certain nombre de procédés sérologiques et biochimiques ont été élaborés à cette fin.

Les tests biochimiques semblent avoir été adaptés aux méthodes bactériologiques existantes (**Aluotto et al., 1970; Bradbury, 1977**), mais souffrent de l'inconvénient que des résultats sont obtenus relativement lentement et que les résultats ne peuvent pas établir une caractérisation très précise (**Ben Abdelmoumen et al., 2005**). Cependant, certains tests sont utilisés pour la caractérisation des souches de mycoplasmes.

Il est indispensable avant toute étude subséquente de différencier les acholeplasmes des mycoplasmes. Le test le plus utilisé est celui de la digitonine, qui, par ses propriétés détergentes au niveau de la membrane, confère aux mycoplasmes la caractéristique d'être sensibles à une proportion de 1.5% de digitonine (**Poveda, 1970**) et aux Acholeplasmes d'être résistants. Il est aussi important de distinguer entre le genre *Ureaplasma* et *Mycoplasma* qui appartiennent tous les deux à la famille des *Mycoplasmataceae*. Seul le genre *Ureaplasma* produit une uréase avec laquelle il hydrolyse l'urée, alors que le genre *Mycoplasma* en est dépourvu. Le comportement des Mollicutes vis-à-vis du glucose constitue une caractéristique biochimique importante, puisqu'il engendre la subdivision des Mollicutes en deux groupes (les fermenteurs et non fermenteurs) selon leur possibilité de métaboliser ou non ce sucre. Une autre activité fondamentale et nécessaire à rechercher, c'est l'activité phosphatasique que possèdent les mycoplasmes et qui consiste en l'hydrolyse du phénolphtaléine diphosphate, contenu dans le milieu, en phénol phtaléine libre sous l'action d'une phosphatase, tel est le cas de MM. D'autres tests biochimiques peuvent faciliter l'identification, mais leur intérêt est limité. Ce sont les tests d'hémolyse, d'hémadsorption, de la réduction du chlorure de triphényl tétrazolium, de la digestion du sérum, et le besoin en coenzyme (**Aluotto et al., 1970**).

Les caractères biochimiques principaux déjà cités (sensibilité à la digitonine, utilisation du glucose, hydrolyse de l'arginine et l'activité phosphatasique) présentent un intérêt indispensable à la mise en oeuvre des tests d'identification sérologique. Cependant, ils ne peuvent en aucun cas être considérés comme une identification définitive.

B.2.3. Tests sérologiques

L'identification sérologique des mycoplasmes aviaires associée à l'identification biochimique, préalablement effectuée sur des isolats de mycoplasme, constitue un outil efficace et sûr dans le dépistage et la mise en évidence de l'agent responsable de telle ou telle mycoplasmosé.

L'identification définitive des espèces de mycoplasmes aviaires repose sur les tests sérologiques les plus couramment pratiqués telle que l'agglutination rapide sur lame décrite initialement par **Adler (1954)** (voire partie matériels et méthodes) et qui représente est une réaction entre des cellules entières de micro-organismes et des agglutinines. Les agglutinines sont des anticorps pouvant provoquer des agglomérations de cellules. Se fixant à la surface des bactéries ou des cellules qui ont induit leur production, elles agissent comme agents de pontage entre celles-ci et les agglutinent. Les agglutinations ainsi produites se voient à l'œil nu.

L'inhibition de croissance (**Clyde, 1983**) est basée sur l'utilisation d'anticorps spécifiques, en présence desquels les mycoplasmes ne peuvent se multiplier. Ainsi donc il s'agit d'une réaction antigène -anticorps réalisée avec une quantité déterminée de mycoplasmes, étalée sur un milieu solide (gélose) et incubée en présence de différents antisérums qui sont choisis en fonction des caractères biochimiques de la souche à identifier. La réaction est considérée positive si après une période d'incubation à 37° C, les mycoplasmes ne poussent pas à proximité du disque imprégné d'antisérum. L'inhibition est nulle lorsqu'il n'existe pas de zone d'inhibition autour du disque.

La technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) a pour principe la visualisation des anticorps fixés sur les colonies ou sur les empreintes des colonies de mycoplasmes par l'intermédiaire d'un sérum antiglobuline marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine. Ce test doit être

toujours réalisé par comparaison à des contrôles de référence positifs et négatifs. D'autres tests sérologiques présentent une importance considérable dans l'identification des mycoplasmes; ce sont les tests de fixation du complément, d'immunoperoxydase, et d'ELISA. Le test ELISA fut développé de manière très classique, en adoptant les mêmes principes de la technique de l'IFI, à l'exception de l'enzyme utilisée dans le test d'ELISA qui est toujours la peroxydase ou la phosphatase alcaline à la place de la fluoresceine qui s'attache aux antiglobulines dans le test d'IFI. La technique d'ELISA est utilisée pour le dépistage soit des anticorps anti-mycoplasme dans le sérum (**Ansari et al., 1983**), soit de l'antigène des différentes espèces de mycoplasmes par l'intermédiaire d'un antiserum spécifique (**Ben Abdelmoumen and Roy, 1995**) ou des anticorps monoclonaux. Cependant, la confusion des résultats des essais sérologiques des mycoplasmes d'origine animale et la confirmation de l'infection par la culture qui peut prendre de 1 à 3 semaines ont conduit à développer des méthodes de diagnostic plus sensibles ; les outils moléculaires (**Kempf et al., 1993**).

B.2.4. Identification moléculaire

Même bien établies, tous ces moyens d'identification ont quelques inconvénients importants. Les caractéristiques morphologiques et biochimiques ne sont en général pas distinctives, alors que des réactions sérologiques croisées sont très fréquentes.

L'introduction des techniques basées sur la biologie moléculaire a fait progresser la recherche d'un grand pas. Les deux dernières décennies furent marquées par une série de succès dans le diagnostic moléculaire grâce à l'apparition de techniques d'hybridation in situ et d'amplification génique. En se basant sur ces deux méthodologies, des sondes nucléaires spécifiques de mycoplasmes aviaires comme par exemple, MG et MS (**Young et al., 1985; Hyman et al., 1988; Colleie, 1996; Ben Abdelmoumen et al., 1999**) furent développées. Ces techniques permettent de détecter plusieurs espèces dans le même échantillon mais ne peuvent pas les identifier. La réaction d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) s'est aussi avérée être une technique puissante et

innovatrice pour l'identification de séquences d'acides nucléiques spécifiques des mycoplasmes aviaires (**Santha *et al.*, 1987; Zhao and Yamamoto, 1993a; Zhao and Yamamoto, 1993b**). L'utilisation des empreintes génétiques a permis de comparer différentes espèces de mycoplasmes aviaires entre elles, et de montrer une relative hétérogénéité des différentes souches au sein d'une même espèce (**Ben Abdelmoumen *et al.*, 2005**). Par exemple, au sein de MG, il existe des souches de références isolées de poule ou de dinde, souches vaccinales et des souches variantes à pouvoir pathogène et transmissibilité réduits. Le dépistage sérologique a pu être reconsidéré en utilisant des protéines recombinantes, ce qui a conduit à l'amélioration de la spécificité et par conséquent, de la fiabilité de ces tests.

XIII. Contrôle des mycoplasmoses aviaires

Compte tenu des modalités de la transmission des mycoplasmes chez les oiseaux (horizontale ou verticale), les programmes pour l'éradication des infections mycoplasmiques se sont surtout concentrés pour empêcher la transmission verticale (même si la transmission horizontale peut se produire) (**Boyle *et al.*, 1995**) et compte tenu de l'avantage que présente le diagnostic bactériologique à savoir isolement et identification, il serait intéressant de mieux adapter des opérations de prophylaxie et même des interventions thérapeutiques pour éradiquer une éventuelle mycoplasme.

Les mesures de contrôle concernent essentiellement l'amélioration de l'hygiène, la réalisation de tests réguliers pour la détection de l'infection mycoplasmique par des méthodes appropriées et l'application des antibiotiques appropriés pour le traitement ou la vaccination (**Kempf, 1998**).

Ainsi une prophylaxie sanitaire et médicale, tant au niveau des adultes ou des animaux en croissance qu'au niveau des oeufs, serait d'un grand intérêt. Le traitement des mycoplasmes par les antibiotiques est très limité du fait qu'ils présentent une résistance intrinsèque. La diminution de l'efficacité des antibiotiques vis-à-vis des mycoplasmes aviaires est un phénomène couramment

observé chez la volaille et surtout chez les poulets de chair (**Zanella et al., 1998**). L'effet d'un antibiotique sur ces microbes pathogènes à réplication intracellulaire dépend de sa capacité à pénétrer les phagocytes. Ni les lactames ni les aminoglycosides ne sont en activité contre les bactéries phagocytées parce que leurs concentrations intracellulaires restent basses. Les macrolides, les quinolones, la rifampicine et la clindamycine s'accumulent aisément dans les phagocytes mais certains ne peuvent pas être aussi efficaces que prévu ; par exemple, la clindamycine a peu d'activité contre les cocci intracellulaires quoiqu'elles pénètrent aisément dans les macrophages. En outre, les médicaments qui pénètrent mal les macrophages par exemple - les lactames, démontrent une activité aux analyses de CMI mais sont médicalement inefficaces (**Bébéar and Bouanchaud, 1997**).

Le traitement comporte l'emploi d'ATB qui empêchent la réplication d'ADN et la synthèse protéique telle que les tétracyclines, les Fluoroquinolones, les Aminoglycosides et certains Macrolides (**May et al., 2009**).

Beaucoup d'agents antimicrobiens, tels que des macrolides et les lincosamides (par exemple, tylosine, spiramycine, lincomycine, et clindamycine), des tétracyclines, la tiamuline, et les Fluoroquinolones (par exemple, enrofloxacin et danofloxacin), possèdent in vitro une bonne activité contre les divers mycoplasmes vétérinaires (**Bouchardon et al., 2002**). Bien que les macrolides et les tétracyclines aient été connus comme étant des antibiotiques efficaces contre les espèces de mycoplasmes, une résistance à certains de ces composés a été produite (**Hannan et al., 1997**). MG est connu pour être sensible à l'enrofloxacin (**Stipkovits and Burch, 1997**). Cependant, dans les infections expérimentales et naturelles, le traitement avec des fluoroquinolones réduit les signes cliniques mais ne supprime pas l'infection (**Reinhardt et al., 2005**). Ces échecs thérapeutiques peuvent être dus au développement de la résistance.

La Tiamuline est l'agent le plus efficace contre les divers mycoplasmes. **Valks and Burch, (2002)**, rapportent que ces microorganismes n'ont pas développé de résistance durant les 25 dernières

années à l'opposé de la tylosine, l'oxytétracycline, la lincomycine, mais il a un spectre étroit d'activité contre les bactéries qui se retrouvent régulièrement en tant qu'agents infectieux secondaires dans des infections de mycoplasmes et est normalement employé seulement chez les porcs. **Nascimento et al., 2005** rapportent, par contre, que la tylosine est l'antibiotique le plus efficace contre l'infection mycoplasmaïque mais **Stipkovits and Burch (1997)** appuient les résultats de **Valls et al.** tandis que **Tanner et al. (1993)** rapportent que la danofloxacin est plus efficace que la tylosine dans la prévention des élevages des lésions d'aérosacculites dues à MG. La spectinomycine, la lincomycine et la gentamicine sont plutôt utilisées pour le traitement des infections à Entérobacteriaceae.

XIII. Vaccination

La vaccination est l'approche la plus prometteuse pour le contrôle des mycoplasmoses aussi bien chez l'homme que chez l'animal (**Ellison et al., 1992**) mais elle reste comme même limitée à quelques infections spécifiques parce que seulement quelques vaccins sont disponibles (**Hannan et al., 1997**).

Des vaccins atténués et inactivés sont aujourd'hui valables pour MG (**Javed et al., 2005**) et sont utilisés seulement dans quelques pays pour les élevages de poulets de chair ou de poules pondeuses. Les vaccins vivants atténués à base de souche F de MG ne peuvent être recommandés pour les dindes. Le vaccin peut être administré aux oiseaux à l'âge de trois à 20 semaines par voie intranasale, intraoculaire, dans l'eau de boisson ou par inhalation. Quant aux vaccins inactivés à base de souche F, ils sont commercialisés dans certains pays et ils peuvent être administrés aux oiseaux une à deux fois avant la ponte à l'âge de 11-20 semaines. L'immunité par un vaccin inactivé dure plus de trois mois quand il est administré avant une éventuelle infection naturelle par les mycoplasmes.

En général, ces vaccins permettent seulement de minimiser les pertes économiques dues à MG, en réduisant le développement et l'évolution des signes cliniques et en améliorent la production des œufs de consommation mais ne peuvent empêcher la colonisation de MG de la région respiratoire de poulet (**Javed *et al.*, 2005**).

DEUXIEME PARTIE
ETUDE PRATIQUE

MATERIEL

1. Etude descriptive des exploitations aviaires dans la région de Batna

L'enquête épidémiologique entreprise lors de cette étude a été menée sur 148 élevages avicoles avec 93 de poulets de chair et 55 de poules pondeuses.

Ces élevages sont répartis sur 24 communes de la région avec au minimum 1 élevage par commune (tableau n° III). L'effectif de cheptel varie entre 2300 et 50000 pour les poules pondeuses et 1000 et 10000 pour les poulets de chair.

Tableau n° III : Répartition des élevages par type de production et par commune.

Commune	Elev. Poules pondeuses	Elev. Poulets de chair	Total
Oued Chaaba	3	6	9
Ain Touta	5	9	14
Aouled Aouf	12	2	14
Fis Dis	6	1	7
El Madher	1	-	1
Seriana	2	1	3
Ain Yagout	7	24	31
Timgad	-	1	1
Oued Taga	-	1	1
Ayoun Al Assafer	1	6	7
Bouzina	-	1	1
Mâafa	-	1	1
Ras El Ayoun	1	-	1
N'Gaoues	4	2	6
Sefiane	9	17	26
Ain Djasser	2	-	2
Segana	-	2	2
Doufana	-	1	1
Chemora	-	8	8
Ichemoul	1	4	5
Tazoult	1	-	1
Azzab	-	2	2
Arris	-	1	1
Merwana	3	-	3
Total	58	90	148

2. Elevages

La wilaya de Batna est située à l'est du territoire Algérien, elle est constituée de 61 communes et possède 1794 bâtiments d'élevages agréés recensés par l'inspection vétérinaire de la wilaya de Batna (direction des services agricoles) avec 914 de bâtiments de poulets de chair et 880 de bâtiments pour poules pondeuses. Notre étude a été réalisée dans 27 élevages de production tous privés où la concentration avicole industrielle était importante, se répartissant sur 13 communes avec au minimum un élevage par commune. (Tableau n° IV) : poules pondeuses (n=11), poulets de chair (n= 16).

Les oiseaux prélevés au cours de cette enquête étaient d'apparence saine ou présentaient des lésions respiratoires du poumon, des sacs aériens ou de la trachée chez les cadavres et des symptômes de conjonctivite (photo n°1), de prostration (photo n°2), de sinusites (photo n°3). L'effectif des volailles par élevage variait entre 2500 et 7000. Les poulets de chair étaient élevés au sol sur une litière de paille. Les poules pondeuses étaient élevées en cage.



Photo 1 : Animaux présentant des signes de conjonctivite.





Photo 2 : les oiseaux sont incapables de se redresser.

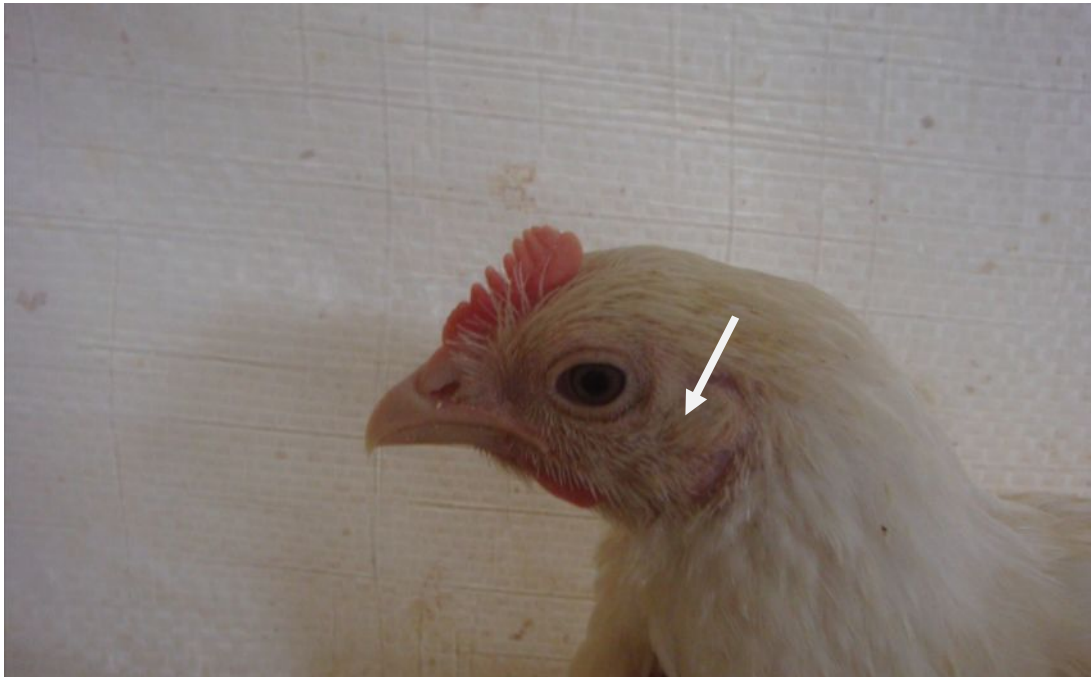


Photo 3 : sinusite chez les oiseaux due à MG.

L'ensemble des élevages visités a été soumis à un questionnaire porté sur une fiche de renseignements. Les informations recueillies au près des éleveurs visaient à établir une situation épidémiologique de la mycoplasmosse dans la wilaya de Batna afin de mettre en relief les modalités de transmission, les facteurs aggravants et déclenchant de la maladie, de connaître l'incidence et la durée de l'épisode infectieux, les différents vaccins administrés aux oiseaux et l'antibiothérapie appliquée (*cf.* annexes).

L'étude expérimentale s'est étalée sur deux années, depuis Octobre 2008 jusqu'en Janvier 2011.

3. Prélèvement

Les échantillons de sang ont été prélevés au niveau de la veine alaire de 505 oiseaux de différentes tranches d'âge (252 de poules pondeuses et 253 de poulets de chair) et transportés au laboratoire sous froid. Tous les élevages n'étaient pas vaccinés contre la mycoplasmosse (Tableau N°II).

Tableau N°IV : Répartition des prélèvements pour sérologie et bactériologie en fonction des zones d'élevage.

Communes	Nombre d'élevages	Nbre de Plvt pour sérologie	Nbre de plvt pour bactériologie
El Madher	1	37	37
Ain Touta	7	90	120
Tazoult	4	25	35
Ain Yagout	1	30	50
Oued Chaaba	3	25	40
Arris	1	30	30
Djerma	1	35	35
Boumia	1	35	35
Merouana	1	28	28
Lambiridi	2	30	26
Ouled Aouf	1	35	35
	3	60	72
Sefiane	1	45	45
Seriana			
Total	27	505	563

Pour l'isolement de *Mycoplasma gallisepticum* et *Mycoplasma synoviae*, les prélèvements ont concerné des sujets vivants et des cadavres récents ou rapidement congelés (**Razin, 1978 ; Manuel Terrestre De L'oise, 2008**).

A cause de la diversité du tropisme des mycoplasmes aviaires, le choix du prélèvement varie en fonction des commémoratifs ou des signes cliniques lorsqu'ils sont présents (**Ben abdelmoumen, 1996**). Les échantillons comportaient des écouvillonnages trachéaux, cloacaux, de fente palatine prélevés sur des sujets vivants ; des écouvillonnages du sinus infra orbitaire et des tissus d'organes (trachée, poumons et sacs aériens) sur des cadavres (**Manuel Terrestre de l'OIE, 2008**). Un total de 563 oiseaux a été examiné dans cette étude (Tableau n° II). Chaque échantillon correspondait à un animal en fonction de la lésion la plus intense (Tableau N° III).

Tableau N° V : Répartition des échantillons en fonction des organes prélevés.

<i>Organe prélevé</i>	<i>Nbre d'échantillons</i>
	<i>Animal vivant</i>
Trachée	93
Fente palatine	89
Cloaque	63
	<i>Cadavres</i>
Trachée	97
Poumons	71
Sacs aériens	71
Sinus infra-orbitaire	79
Total	563

4. Transport

Des cadavres récents sont collectés, mis dans une glacière pour un éventuel transport au laboratoire. Les cadavres peuvent être congelés rapidement à -20°C et utilisés ultérieurement. (**Mathengtheng, 2007**). Les prélèvements sur les sujets vivants ont été mis dans 2 ml de milieu de Frey et transportés sous froid.

5. Les souches de références

Des souches de références MG ATTC 15302 et WU1853 ont été obtenues à partir du centre national de recherche sur la santé animale, Dokki, Egypte utilisées comme contrôle positive et cultivées sur un bouillon PPLO pour mycoplasmes.

6. Milieux de culture

Voir en annexes.

7. Les composants du milieu de culture

7.1. Les inhibiteurs

- L'acétate de thallium (Sigma-Aldrich) : dissoudre 5grs dans 100 ml d'eau distillée. Stériliser par filtration et conserver à -20°C . L'acétate de thallium doit être ajouté après stérilisation du milieu et jamais avant car ce produit est très sensible et peut être détruit par la température de stérilisation (**Weisburg *et al.*, 1989**).

- La solution de pénicilline : la benzylpénicilline G sodique est dissoute dans 5 ml d'eau distillée stérile et conservée à 4°C pour une durée d'une semaine (**Rozina, 2000**).

7.2- Les enrichisseurs

- Sérum de cheval le sang est obtenu des chevaux de course de la wilaya de Barika. On laisse le sang à décanter à la température ambiante du laboratoire toute la nuit. Ensuite, on procède à une

centrifugation à 375 g pendant 20 mn pour se débarrasser de tous les globules rouges. Le sérum est chauffé à 56°C pendant 30mn. La stérilisation se fait par filtration (filtre à 0.22 µm) et le sérum est partagé en aliquotes. Conservation à -20°C.

- Extrait de levure disponible dans le commerce (diagnostics Pasteur). Dissoudre 25 grs dans 100 ml d'eau distillée, stériliser par filtration. Conserver à -20°C.
- Glucose en qualité de réactif (A.M.P.E.R industrie). 10 grs est dissoute dans 100 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 7.8-8 avec du NaOH 0.1 M. il est stérilisé par filtration et conservé à 4°C.
- Le nicotinamide adénine dinucléotide (Sigma) 0.2 grs est dissous dans 100 ml d'eau distillée. Stériliser par filtration, conserver à -20°C.
- La L-cystéine préparée comme pour la solution du NAD.

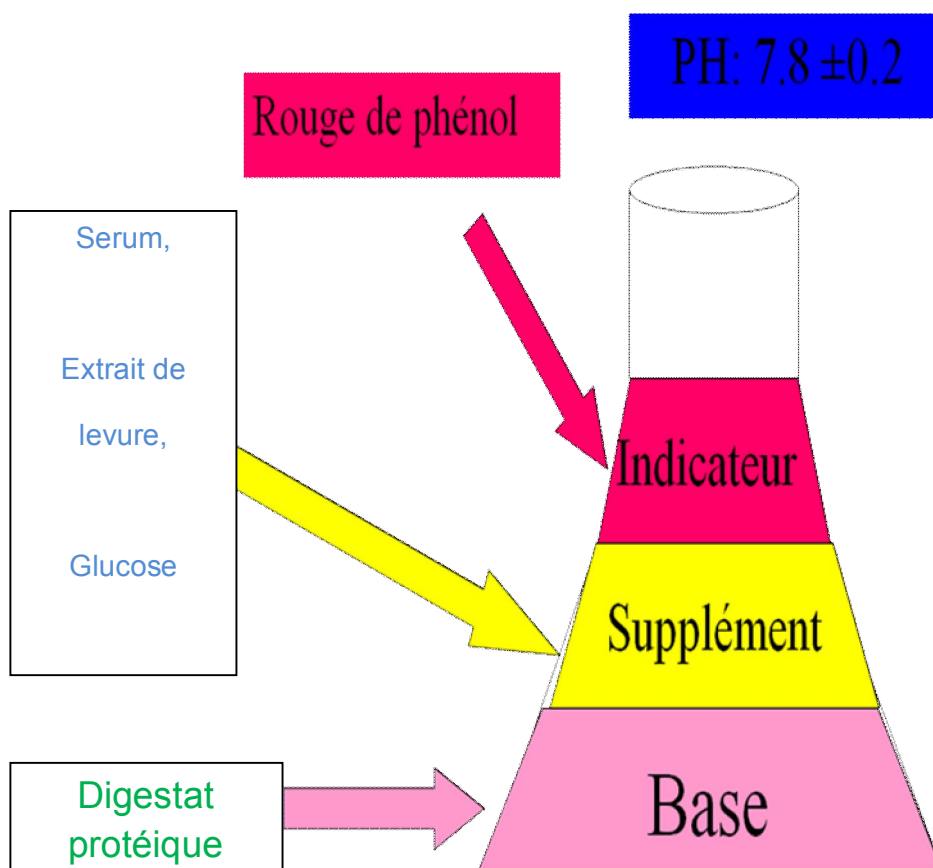


Figure 4 : Schéma représentatif de la composition du milieu de culture pour mycoplasmes.

7.3. Le rouge de phénol (indicateur coloré)

0.1 de rouge de phénol (Merck) est broyé dans Na o 0.1 M (2.8 ml) puis le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. Le mélange est ensuite autoclavé à 115°C sous une pression d'une atmosphère pendant 30 mn puis conservé à 4°C.

8. Isolement

Le milieu utilisé est le milieu de Frey contenant 15% de sérum de cheval, 10% d'extrait de levure, des antibiotiques et des inhibiteurs (pénicilline et acétate de thallium), de l'arginine et du glucose (**Zhao and Yamamoto, 1990; Bradbury, 1998**).

Sur un tel milieu, la croissance de tous les mycoplasmes est favorisée, à l'exception de MS qui nécessite le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et la cystéine pour sa croissance (**Razin, 1978**).

Le milieu gélosé pour la culture des mycoplasmes a les mêmes constituants que le milieu liquide. Il faut néanmoins, éliminer le rouge de phénol et ajouter 10 grs de noble agar. Ajuster le pH du milieu à 7.8.

9. Solution de digitonine pour différencier les Acholeplasmes des Mycoplasmes (Enro and Stipkovits, 1973)

- Ajouter 75 mg de digitonine à 5 ml d'éthanol (95%). Faire chauffer cette solution à 56 ° C pendant 30 mm.
- Imprégner des disques de papier filtre stériles (6 mm de diamètre) de 25 µl de la solution préparée.

- Laisser sécher à l'étuve à une température de 37 ° C pendant 6 h, et conserver à 4° C.

10. Colorant de Diènes (selon Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990)

La coloration de Diènes permet la distinction entre les souches de mycoplasmes et les bactéries L formes puisque seules les colonies de mycoplasmes se colorent

11. Identification biochimique et sérologique des souches isolées

L'identification des souches de mycoplasmes isolées sur milieux gélosés et clonés repose sur le test de la digitonine pour différencier les Acholeplasmes des Mycoplasmes, les caractères biochimiques (fermentation du glucose, hydrolyse de l'arginine), et sur un test sérologique des colonies (test de l'inhibition de la croissance). Pour cela, différents milieux sont utilisés :

* Le milieu glucosé pour l'identification des différentes souches fermentant ou non le glucose selon **Sabry, 1968** (voire annexe).

* Le milieu arginine pour l'identification des différentes souches hydrolysant ou non l'arginine selon **Sabry, 1968** (voire annexe).

12- Matériel utilisé pour la PCR

18 souches de MG et 18 souches de MS, isolées au cours de la présente étude ont été utilisées pour identification par la PCR. Ce test fut réalisé dans le laboratoire national de pathologie aviaire, Ploufragan de l'AFSSA en France (LNPA). Cette technique présente plus de spécificité que toutes les autres techniques d'identification des microorganismes en général et des

mycoplasmes en particulier à cause de la communauté antigénique existant entre les différentes espèces de mycoplasmes surtout MG et MS (**Ben Abdelmoumen, 1996**)..

Le principe est d'amplifier un segment déterminé d'ADN des microorganismes qu'on veut identifier. Cette amplification produit une bande sur un gel qui est spécifique par sa taille pour chaque virus ou bactérie à identifier.

- Une centrifugeuse pour microtube.
- Microtubes stériles de 1,5 ml et 2 ml.
- Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl.
- Gants latex non poudrés.
- 2 bain(s)-marie, bloc(s) chauffant(s) et/ou étuve(s).
- Un thermocycleur avec son consommable pour PCR: tubes PCR de 0,2 ml.
- Un vortex.
- Embouts (pointes) pour micropipettes.
- Eau distillée stérile.
- De l'eau peptonnée.
- Ethanol 96-100%.
- Polaroid films et camera.

Amorces

Les amorces MG possèdent les séquences suivantes :

- MG-14F: 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'
- MG-13R: 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'

Les amorces MS possèdent les séquences suivantes :

- MS-F : 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3'
- MS-R : 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'

Réaction d'amplification en chaîne

Le mélange de réaction doit être préparé dans un local séparé et propre en utilisant un jeu de pipettes dédiées. Pour une réaction de PCR de 50 μ l, le mélange est le suivant :

H2O ultra pure	35,75 μ l
Tampon de PCR	10 X 5,00 μ l
dNTP (10 mM)	1,00 μ l
Amorce F (20 pmole/ μ l)	0,50 μ l
Amorce R (20 pmole/ μ l)	0,50 μ l
Taq (5 U/ μ l)	0,25 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	2,00 μ l.

METHODES

1. Etude descriptive

Une visite a été effectuée à chaque élevage pour constater de nous même de l'état des bâtiments d'élevage sur la base d'une fiche de questionnaire (annexes) et par l'entretien avec le personnel et les vétérinaires qui s'occupent des élevages.

2. Analyses sérologiques

La recherche des anticorps dirigés contre les deux espèces de mycoplasmes (MG et MS) a été réalisée par la méthode d'agglutination rapide sur lame (ARL) effectuée selon la technique décrite en France avec un antigène du commerce: M.G. (antigène inactivé coloré pour ARL, Soleil diagnostics, France).

La qualité de l'antigène est contrôlée par un sérum négatif de poule (EOPS : Exempt d'Organismes pathogènes Spécifiés), un sérum positif vis-à-vis de *Mycoplasma gallisepticum* MG15 et un sérum positif vis-à-vis de *Mycoplasma synoviae* MS14.

Après coagulation du sang (2 heures à température ambiante), le sérum est centrifugé à 1500 tours pendant 15 mn et inactivé à 56°C pendant 30 mn. Il est ensuite dilué au 1/5^{ème} pour limiter les réactions non spécifiques (Nougayrede *et al.*, 1984 ; Stanley *et al.*, 2001). Le sérum est alors transvasé dans des tubes stériles et conservé à +4°C jusqu'à utilisation dans les 48 heures.

Sur une plaque de verre préalablement lavée, rincée et séchée, 25µl de sérum et 25µl d'antigène sont déposés et agités à la température ambiante (25°C). Tourner la lame pendant 2 mn.

La lecture de la réaction se fait selon Stanley *et al.* (2001) ;

- La réaction est considérée positive lorsque les agglutinats apparaissent dans les deux minutes.
- La réaction est considérée négative lorsqu'aucun flocculat visible à l'œil nu ne s'est formé au bout de deux minutes.

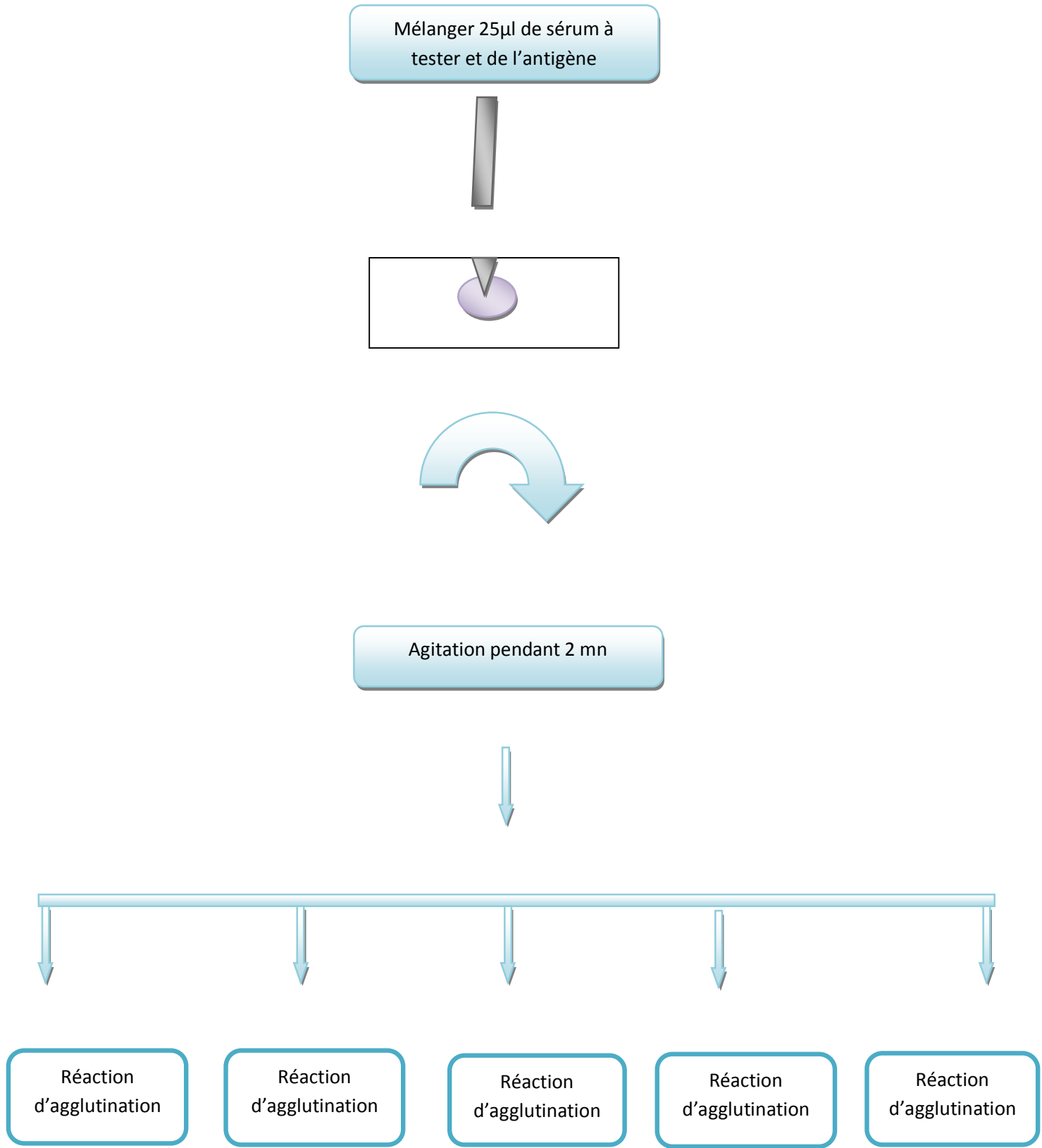


Figure 5 : Protocole de l'analyse sérologique avec le test d'ARL

3. Reconstitution du milieu de culture

Pour la culture des différentes espèces de mycoplasmes, les milieux suivant liquides ou gélosés sont satisfaisants :

- Partie A : base pour Pleuropneumoniae like organism (PPLo) sans cristal violet (21 g) et eau distillée (700 ml).
- Partie B : elle regroupe tous les autres constituants stériles à savoir ; sérum de cheval, extrait frais de levure, solution de glucose, acétate de thallium, solution de pénicilline G et solution de rouge de phénol.

La partie A est autoclavée à 121°C sous une pression d'une atmosphère, pendant 15 min et après refroidissement est ajoutée à la partie B, qui a au préalable été stérilisée par filtration.

Pour obtenir le milieu gélosé, ajouter au milieu liquide (partie A) 10 gr de gélose noble. Autoclaver comme décrit précédemment et conserver au bain-marie à 56°C. Les constituants de la partie B, sauf le rouge de phénol, sont mélangés séparément, puis incubés à 56°. Les parties A et B sont mélangées délicatement pour éviter la formation de bulles d'air puis sont réparties dans des boîtes de Petri de 50 mm de diamètre, à raison de 7 à 9 ml par boîte. L'excès d'humidité peut être éliminé par une courte incubation à 37°C. Les boîtes sont ensuite stockées à l'abri de l'air à environ 4°C pendant au maximum 4 semaines (**Grumbles *et al.*, 1953; Woldehiwet *et al.*, 1990; Abdelatif, 1999**).

4. Ensemencement

- **Pour les sujets vivants** Les échantillons sont d'abord déchargés dans 2 ml du milieu liquide pour mycoplasmes. L'acidification du milieu doit être recherchée chaque jour et est indiquée par le virage du rouge à l'orange ou au jaune de l'indicateur (rouge de phénol).

Changement de
couleur

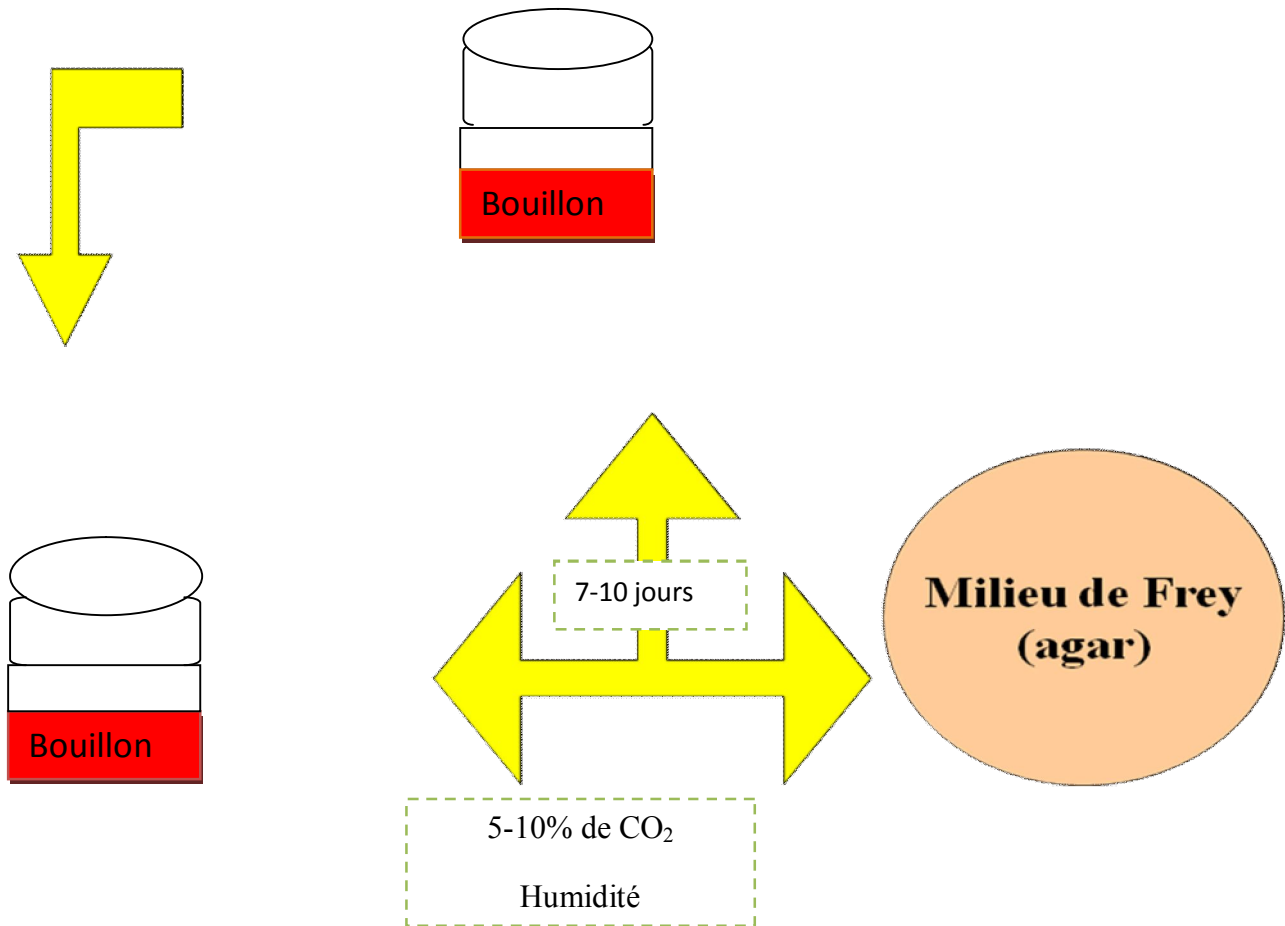


Figure 6 : Schéma d'isolement chez les sujets vivants

- **Pour les cadavres** Environ 0.5 g des échantillons de tissus (poumons, sacs aériens, et la trachée) a été, coupé avec des ciseaux stériles et aseptiquement placé dans un mortier stérile également. Les échantillons de tissus étaient broyés en utilisant du sable stérile. 5 ml du bouillon PPLO y sont ajoutés. A partir de cette suspension, ensemençer un bouillon avec environ 0.2 ml (**Rozina, 2000**).

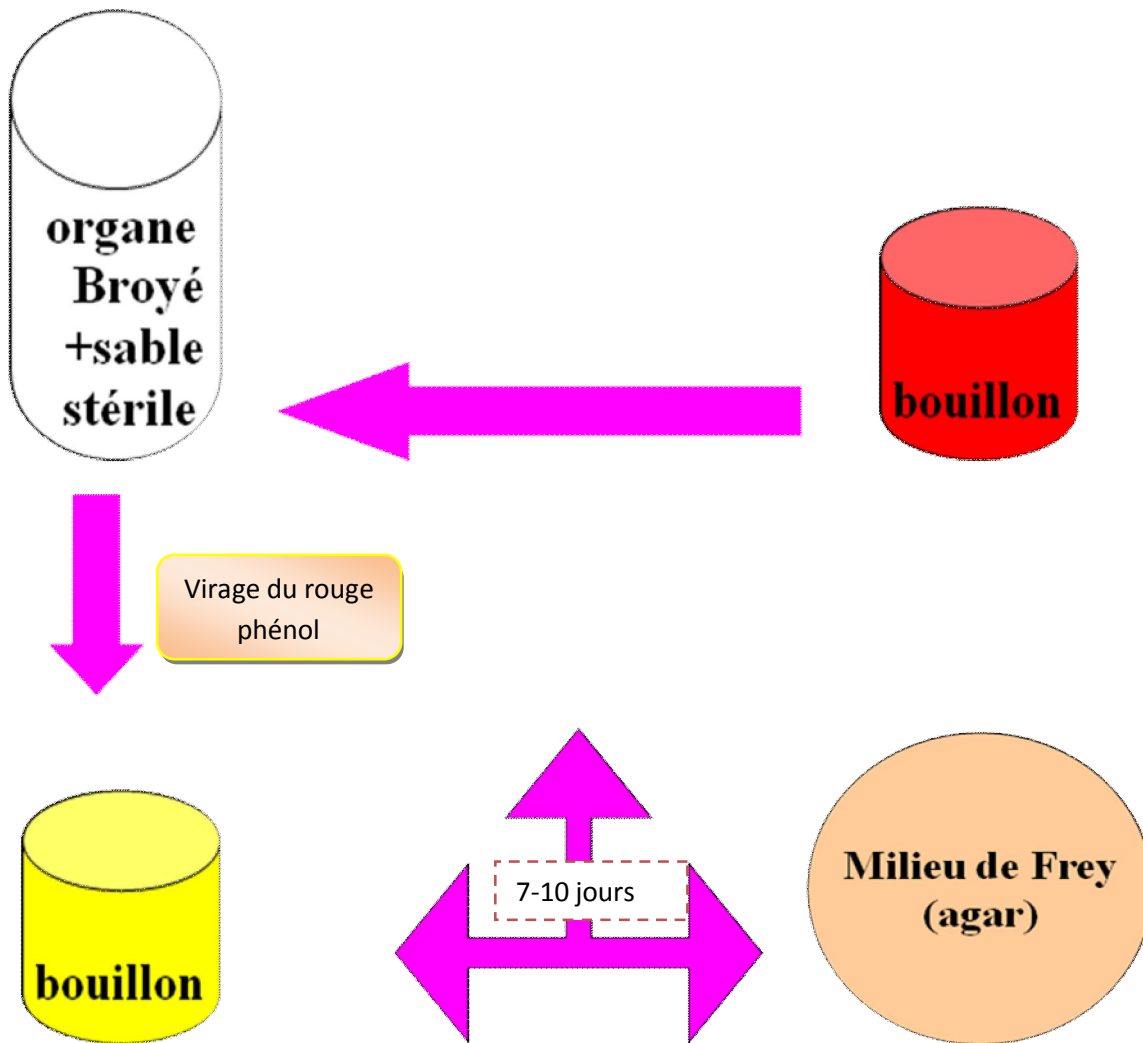


Figure 7 : Schéma d'isolement chez les cadavres

Dès qu'une croissance est observée (constatée par un virage de la couleur accompagné par une légère turbidité), on fait un autre passage sur milieu liquide pour enrichissement avec 0.2 à 0.3 ml.

La règle est d'ensemencer immédiatement sur milieu gélosé après virage de la couleur car ces cultures peuvent mourir si le milieu devient trop acide en particulier pour MS (**Bradbury, 1998**). S'il n'y a pas de changement de couleur, une subculture sur milieu gélosé est réalisée après 7-10 jours car la présence de mycoplasmes hydrolysant l'arginine (donc alcalinisant) peut masquer le changement de couleur (**Manuel terrestre de l'OIE, 2008**). Il peut être nécessaire de réaliser des dilutions jusqu'à 10^{-3} pour permettre l'isolement des souches à croissance lente qui sont supplantées

par la croissance rapide de saprophytes en bouillon. Les géloses ensemencées sont incubées à 37°C dans une jarre à CO₂. Les cultures ne doivent pas être considérées comme négatives avant au moins 20 jours (figure n°1).

On observe les boîtes de Pétri au bout de 2 jours au moyen d'un microscope à inversion, ensuite chaque jour pendant 7-10 jours pour une éventuelle croissance de mycoplasmes. Dans les cas positifs, des blocs de gélose sont transférés dans des tubes de milieu liquide pour PPLO pour un éventuel clonage (Stipkovits *et al.*, 1975 ; Sharaf, 2004).

5. purification de la souche

Une culture pure est essentielle pour des études déterminatives. Les isolats sont dans beaucoup de cas un mélange d'espèces. Pour cette raison, le clonage des espèces de Mollicutes est essentiel.

Le clonage commence par la filtration d'une culture en bouillon à travers un filtre dont les tailles de pore peuvent maintenir toutes les autres bactéries. Avec les Mollicutes, ce ci est réalisé en employant des filtres de 450 nanomètres. Le filtrat des dilutions est alors cultivé sur milieu solide. Des colonies sont plus tard sélectionnées à partir des boîtes de Pétri ensemencées ou seulement quelques colonies se sont développées. Le clonage par filtration est réalisée au moins 3 fois (Brown *et al.*, 2007).

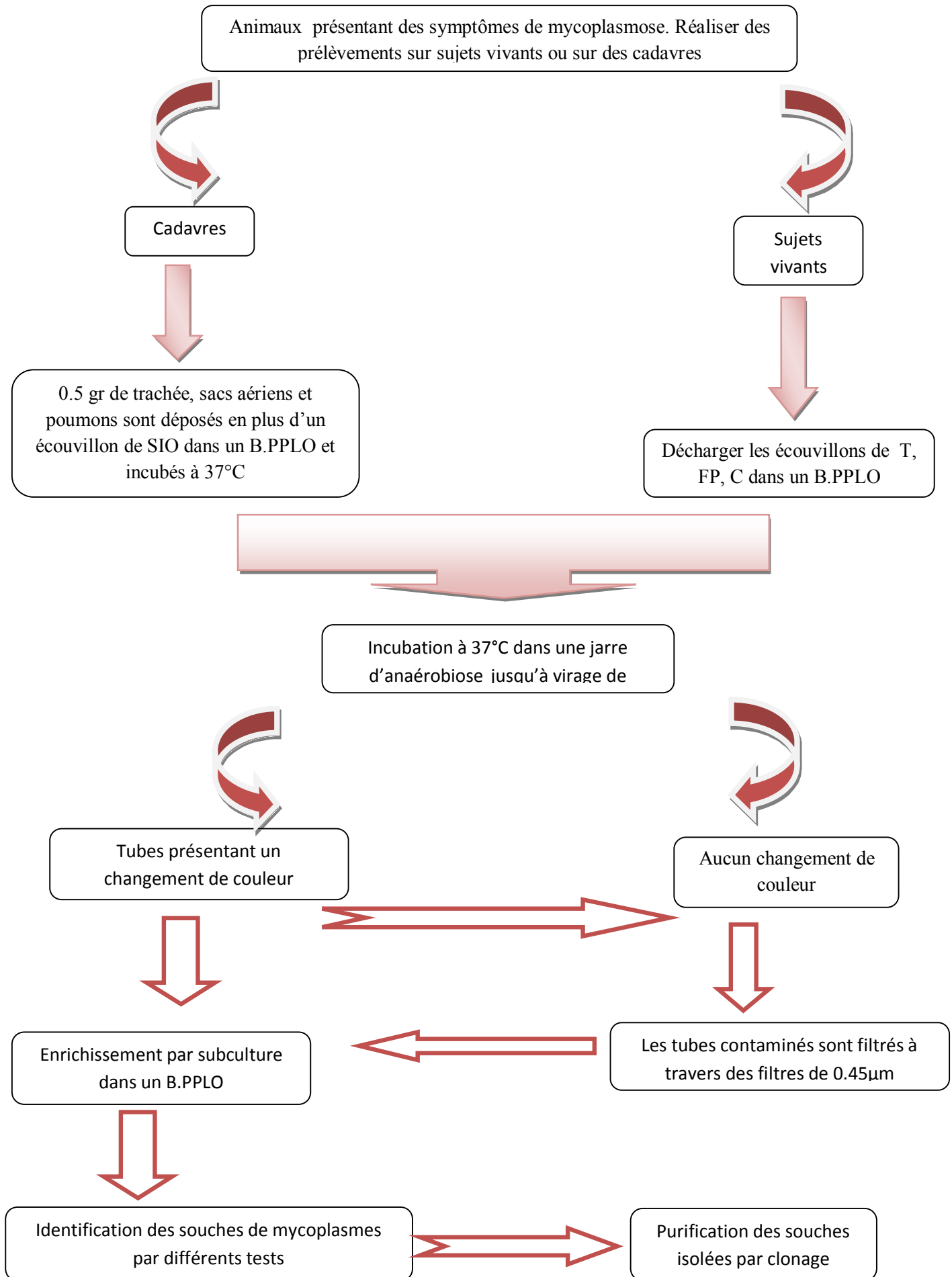


Figure 8 : Logigramme d'isolement des souches de mycoplasmes

6. Identification

Elle peut être réalisée par l'intermédiaire des techniques suivantes (figure n°2) :

a- Aspect de la colonie

Les colonies des mycoplasmes présentent un aspect typique d'œuf sur plat (photo n°1) avec un faible diamètre pouvant varier de 500 μm à 2 mm.

b- Coloration de Diènes

Découper 1 cm^2 de la géloseensemencée de colonies de mycoplasmes et placer la colonie côté bombée vers le haut sur une lame en verre. Placez doucement une lamelle qui a été enduite du colorant de Diènes sur la gélose. Les colonies de mycoplasmes maintiendront la coloration. La plupart des colonies bactériennes demeureront non colorées. La confirmation finale peut être faite dans 30 mn (Goll, 1994).

c- Test de la digitonine

Les souches de référence étaient *Mycoplasma gallisepticum* ATCC 15302 et *Mycoplasma synoviae* WVU 1853.

- Avant de procéder au test, placer les géloses dans l'étuve à 37°C pour les faire sécher.
- Préparer les dilutions des souches de références et des souches à tester dans le bouillon préparé avec 20% du sérum. Trois dilutions peuvent être suffisantes pour des souches avec une capacité de croissance moyenne cependant, les souches à croissance lente ont besoin de deux dilutions (Poveda, 1998).
- Ensemencer avec 200 μL de la suspension bactérienne la boîte de Pétri par la technique de la goutte.
- Placer un disque imbibé de digitonine au centre.

- Incuber les géloses à 37°C.

- Examiner les géloses à 24 h intervalles avec un stéréomicroscope, et mesurer les zones d'inhibition autour du disque de digitonine tout en comparant les résultats à la souche de contrôle. Les Mollicutes stérol-dépendants sont inhibés par la digitonine à 1.5% montrant des zones d'inhibition de 5-20 millimètres (**Erno and Stipkovits, 1973**).

d- Fermentation du glucose

Ajouter 1 ml de la suspension bactérienne à 2 ml du milieu de glucose. Incuber à 37°C avec un tube contrôle. Examiner tous les tubes journallement jusqu'au 7^{ème} jour pour une finale identification.

- Réaction négative : aucun changement de la couleur.
- Réaction positive : virage de la couleur vers le jaune ou l'orange.

e- Hydrolyse de l'arginine

Ajouter 1 ml de la suspension bactérienne suspectée de contenir des mycoplasmes à 2 ml du milieu d'arginine, ensuite incuber à 37°C avec des tubes contrôle. Examiner les tubes chaque jour et jusqu'au 7^{ème} jour avant de conclure que le test est négatif.

- Réaction négative : aucun changement de la couleur
- Réaction positive : virage vers le rouge noirâtre ou vers le violet.

f- Test de l'inhibition de la croissance

Le test d'inhibition de la croissance est fondé sur le fait qu'un immunosérum spécifique de titre élevé ajouté au milieu de croissance des mycoplasmes empêche la croissance de l'espèce homologue de mycoplasmes contre laquelle l'immunosérum a été produit. La vitesse de croissance du micro-organisme peut influencer l'inhibition de croissance et il est judicieux de retarder la croissance au départ en incubant à 27°C pendant 24 h, puis de poursuivre ensuite l'incubation à 37°C (**Manuel terrestre de l'OIE, 2008**).

- Utiliser une culture jeune de mycoplasmes en bouillon âgée de 24-48 h.
- Ensemencer deux dilutions (10^{-1} , 10^{-3}) avec 50µl de la suspension de mycoplasmes.
- Placer un disque imbibé de l'immunsérum anti MG et anti MS au centre.
- Incuber à 27°C pendant 24 heures.
- Poursuivre la croissance à 37°C
- Après 24 h, examiner les boîtes pour la croissance. Vérifiez s'il existe une zone d'inhibition au tour du disque visible à l'œil nu. Elle devrait être supérieure à 2 mm, de préférence > 5 mm.
- Si aucune zone n'est visible à l'œil nu, examiner les géloses avec un stéréomicroscope à la recherche de signes d'inhibition, de réduction progressive sur le nombre de colonies ou de la taille des colonies autour du disque (**Poveda and Robin, 1998**).

Examiner quotidiennement pendant 7 jours.

g- Identification des souches de *Mycoplasma gallisepticum* et de *Mycoplasma synoviae* par la technique de PCR

Des échantillons de souches de mycoplasmes (MG et MS) cultivées sur milieu liquide de PPLO ont été utilisés. Il faut tout d'abords procéder à l'extraction de l'ADN des souches à identifier.

1- Extraction de l'ADN selon Liu *et al.* (2001) et Lauerman *et al.* (1995).

- Il faut centrifuger 5 ml de chaque tube correspondant à une souche pure de MG et MS à 14000 t/mn pendant 5 mn à 4°C.
- Le surnageant est délicatement ôté à l'aide d'une pipette Pasteur et le culot est suspendu dans 100 µl d'une solution de PBS (qualité PCR) à pH 7.2 puis suspendue encore une fois dans 25µl de PBS.
- Le tube contenant le culot est chauffé à une température de 95°C pendant 10 min dans un bain marie
- Ensuite, congeler le tube à une température de -20°C pendant 5min.

- Enfin, centrifuger à 14 000 t/mn pendant 5 min. L'ADN est dans le surnageant

2- Réaction d'amplification en chaîne

Un volume de 45 µl du mélange est distribué dans chaque tube de PCR. Le mélange doit être recouvert de quelques gouttes d'huile minérale de faible densité.

Les tubes de PCR sont ensuite apportés dans une autre zone propre où l'ADN de l'échantillon approprié (5 µl) est ajouté à chaque tube. Des témoins positif et négatif sont inclus à chaque série.

Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur pour les cycles suivants : 40 cycles : 94°C pendant 30 s, 55°C pendant 30 s, 72°C pendant 60 s, 1 cycle (élongation finale) : 72°C pendant 5 min et maintien à 4°C.

3- Electrophorèse

Les produits de PCR sont détectés par électrophorèse sur gel d'agarose classique, en incluant des marqueurs de taille appropriée, suivie d'un examen sous lumière UV. La taille du produit PCR pour MG est de 185 pb (**Hedia, 2005**) et pour MS est de 214pb (**Ehtisham-ul-Haque et al., 2011**) . La visualisation des produits amplifiés est réalisée dans une zone séparée du laboratoire, à l'écart des autres étapes de la procédure PCR.

- Préparer 1,5% gel d'agarose dans un tampon d'électrophorèse.
- Le produit est visualisé par addition en injectant 10µl produit amplifié par PCR avec 1.5% de gel d'agarose liquéfié dans une solution de TEA additionnée de bromure d'éthidium.
- Effectuer l'électrophorèse à 80 volts pendant 30 min.
- Observer le gel coloré par rayons UV.

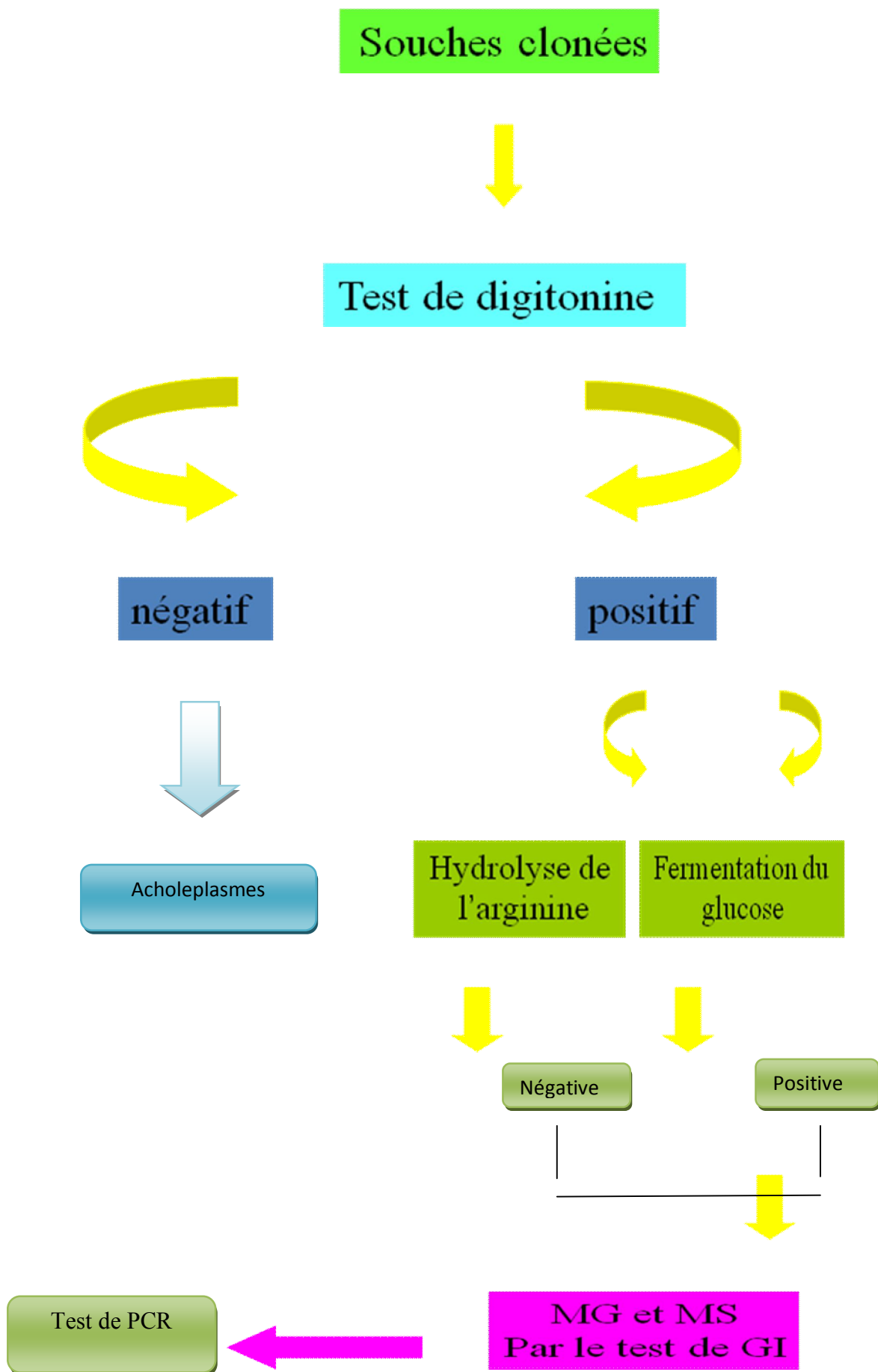


Figure 9 : Protocole d'identification des souches de mycoplasmes.

h- Etude statistique

La présence d'une relation significative entre les résultats d'ARL en fonction de différents paramètres (la zone d'élevage, l'âge, le type de production, la saison, la taille d'élevage et la souche d'oiseaux), des résultats d'isolement en fonction de la zone de prélèvement ont été étudiés par le test statistique de corrélation à l'aide du logiciel GraphPadPris(**Motulsky,1999**).

La comparaison des pourcentages des résultats de l'influence de la saison sur l'évolution de l'infection mycoplasmique et de l'isolement en fonction du type de production a été réalisée à l'aide du test Chi-deux. Toute valeur de $P < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative

RESULTATS

Sur les 1794 bâtiments avicoles recensés par l'inspection vétérinaire, seulement 27 élevages ont été visités. Ceci représente 1.5% de la totalité des élevages de la wilaya.

1. Etude descriptive des exploitations aviaires de la région

La maladie respiratoire chronique des volailles ne cesse de causer une baisse des performances zootechniques et parfois une mortalité importante lors de complications bactériennes dans certains élevages d'Algérie.

Plusieurs facteurs interviennent comme facteurs aggravant ou prédisposant à la dissémination des agents infectieux. Le tableau n° VI récapitule les résultats des facteurs de l'ambiance, des normes de conduite de l'élevage, de la prophylaxie et de qualification du personnel.

Tableau n° VI: Typologie des élevages de poulet de chair.

	Poulet de chair	Poules pondeuses	Total
Nombre bandes/an :			
- 1 à 3 bandes	38	55	93
- 4 bandes	55	0	55
Densité des animaux (PC) :			
- 8 à 10 animaux / m ²	55	-	
- 11 animaux et + / m ²	38	-	
Nbre de PP/cage :			
- 4-5 /cage	-	37	
- Plus de 5 pp/ cage	-	18	
Taux de mortalité :			
- faible	52	44	96
- important	41	11	52
Abreuvement :			
- forage	74	49	123
- puits	19	6	25
Litière :			
- copeaux	67	-	
- paille	6	-	
- mixte	20	-	
Litière humide	63	-	
Litière sèche	30	-	
Personnel qualifié:			
- Oui	32	28	60
- Non	61	27	88
Sous contrôle vétérinaire :			
- Oui	92	55	147
- Non	1	0	1

Nettoyage :			
	87	53	140
- Oui	6	2	8
- Non			
Désinfection			
de l'environnement :			
	80	50	130
- Oui	13	5	18
- Non			
Lutte contre les rongeurs :			
	31	26	57
-Oui	62	29	91
-Non			
Clôture			
	14	9	23
- Oui	79	46	125
- Non			
Respect du vide sanitaire :			
	69	51	120
- Oui	24	4	28
- Non			
Présence de pédiluves :			
	47	43	90
- Oui	46	12	58
- Non			
Respect de la T° :			
	60	33	93
- Oui	33	22	55
- Non			
Respect de l'humidité :			
	27	31	58
- Oui	66	24	90
- Non			
Orientation des Bat.			
Dans le sens inverse des vents dominants :			
	33	33	66
- Oui	60	22	82
- Non			

Isolement des malades :			
	36	34	70
- Oui	57	21	78
- Non			
Proximité des élevages :			
	67	49	116
- Oui	26	6	32
- Non			
Symptômes de la mycoplasmosse :			
	38	28	66
- Respiratoires	36	4	40
- Articulaires	8	7	15
- Resp+Art	11	16	27
- Pas de sympt			

1.1. Répartition des élevages visités en fonction de la taille dans les deux types de production

Cette répartition est présentée dans le tableau VII.

c) Chez le poulet de chair

Les élevages ont été classés sur la base de leur capacité de production, en 3 catégories: La première catégorie a une production comprise entre 1500 et 3000 sujets par bande de poulets et la seconde catégorie a une production comprise entre 3500 et 5000 sujets et la dernière représente des cheptels de 5500 à 9000 sujets par bande élevée.

d) Chez la poule pondeuse

Pour les poules pondeuses, le classement était différent puisque la taille des élevages est plus importante que chez le poulet de chair.

La première catégorie comprend les cheptels dont la taille est comprise entre 2400 et 5000 sujets, la deuxième catégorie, un nombre allant de 7500 à 9000 sujets et finalement la dernière comptant un effectif entre 10000 et 50000 poules pondeuses.

Tableau n° VII : Répartition des élevages étudiés en fonction de la taille des cheptels selon le type de production.

Poulet de chair

Taille des élevages	1000-3000	3500-5000	5500-9000
Nombre d'élevages	31	46	16

Poules pondeuses

Taille des élevages	2400-5000 sujets	7500-9000 sujets	10000-50000
Nombre d'élevages	18	11	26

1.2. Conduite de l'élevage

La conception d'un bâtiment d'élevage avicole doit répondre à certaines normes préalablement étudiées et établies. Les élevages ayant fait l'objet de notre étude ne répondent pas pour la plupart à ces normes. Par exemple, chez le poulet de chair, 37.16 % (55/148) des élevages produisaient 4 bandes par an alors que la norme est de deux bandes pour pouvoir nettoyer le bâtiment, le désinfecter et préparer l'arrivée de la prochaine bande. Chez le poulet de chair, 40.86% (38/93) avaient une densité d'animaux supérieure à 11 poulets par m², 72.04 % (67/93) utilisaient une litière en copeaux de bois qui représente l'idéal pour les élevages avicoles mais dans 63/148 bâtiments représentant un taux de 42.56% la litière était humide favorisant la pullulation des microorganismes.

Chez les poules pondeuses, la densité des animaux par cage répondait aux normes avec 4-5 oiseaux par cage représentant 67.27% (37/55).

84.45% des élevages (125/148) n'avaient pas de clôture et donnaient accès libre à d'autres animaux tels les bovins, ovins, dindes, chiens et chats.

Le personnel n'était pas qualifié dans plus de la moitié des bâtiments (88/148).

Enfin, l'hygiène globale était évaluée visuellement comme très mauvaise dans 88 % des cas.

L'équipement se limite au strict minimum (mangeoires, abreuvoirs et radiants de chauffage) avec inexistence de systèmes de ventilation et d'isolation pour 130 élevages sur 148 ; Alors que l'hygrométrie est complètement méconnue et se traduit par une absence totale d'hygromètre dans les bâtiments, ce qui se traduit par des problèmes de maîtrise de l'ambiance, notamment en saison chaude accentuant le taux d'ammoniac dans les élevages.

De la même manière, l'éclairage n'est pas maîtrisé, ainsi même si nous avons noté une grande variabilité entre les élevages, une forte intensité lumineuse est enregistrée.

L'isolement des animaux malades se fait dans 47.29% des cheptels et même pour ces derniers, cet isolement se fait dans un coin au niveau du même bâtiment ce qui n'est pas vraiment une solution.

On a constaté que les symptômes de la mycoplasmoses étaient de nature respiratoire dans 66/148 (44.59%) des élevages, articulaire dans 40/148 (27.02%) et les deux à la fois dans 15/148 (10.13%) des bâtiments.

La lutte contre les rongeurs se fait uniquement dans 57 élevages.

2. Résultats sérologiques

Les résultats sérologiques obtenus lors de cette investigation sont présentés dans les tableaux n° VIII, IX, X, XI, XII, XIII.

Le dépistage sérologique par agglutination rapide sur lame a montré la présence d'anticorps anti-*Mycoplasma gallisepticum* et anti-*Mycoplasma synoviae* dans la totalité des élevages visités avec

au total 335 sérums positifs à MG et 353 sérums positifs à MS sur les 505 prélèvements de sérums testés donnant un taux d'infection de 66.33% et 69.90% respectivement.

Le tableau ci-après démontre que MS est plus incriminé dans les infections mycoplasmiques que MG.

Tableau n° VIII : Résultats sérologiques globaux pour le screening des mycoplasmoses à MG et MS par l'ARL

	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	<i>Mycoplasma synoviae</i>
Sérums positifs	335 (66.33%)	353 (69.90%)
Sérums négatifs	170 (33.66%)	152 (30.09%)
Total	505	505

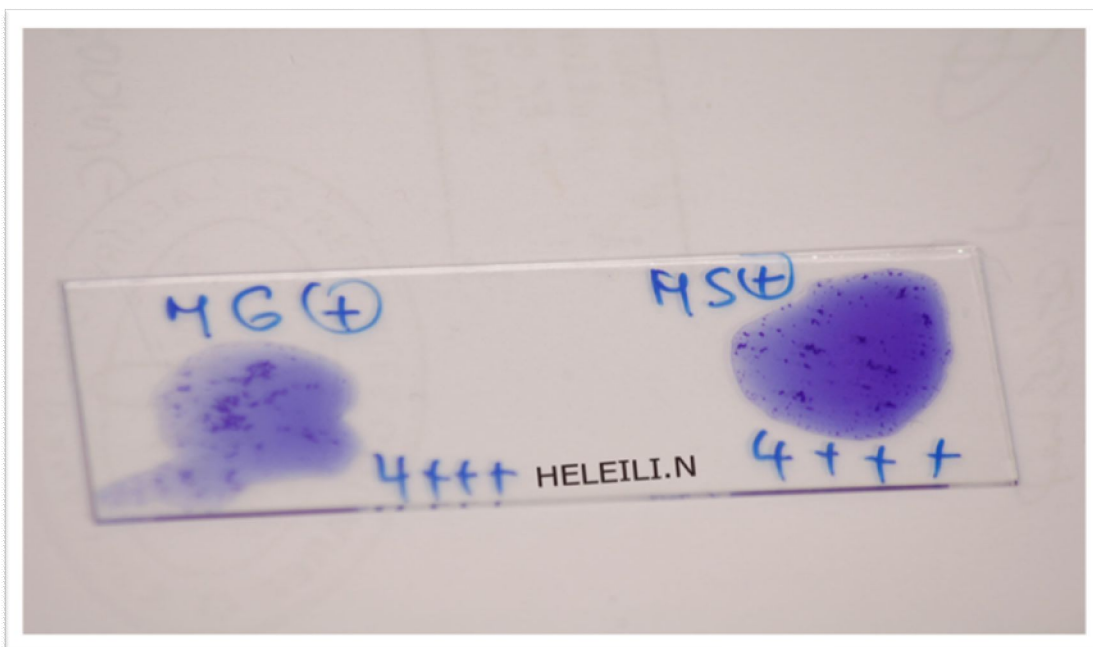


Photo 4: Test d'ARL. Les anticorps anti MG et anti MS sont mis en évidence par les agrégats formés avec l'antigène coloré en violet (intensité de réaction 4+++)

2.1. Répartition des résultats sérologiques en fonction des zones d'élevage

Les taux d'infections étaient variables en fonction des zones d'élevage mais toutes celle-ci étaient contaminées (Tableau n° IX).

La prévalence des infections à *Mycoplasma gallisepticum* et à *Mycoplasma synoviae* était significativement supérieure dans les élevages de la commune de Sefiane avec un taux de 91.66% et de 96.66% respectivement ($P < 0.001$).

Tableau n° IX : Répartition des échantillons en fonction des zones d'élevage.

Communes	Nombre d'échantillons	Sérums positifs à MG	Sérums positifs à MS	Moyenne
El Madher	37	15 (40.54%)	20 (54.05%)	47.29%
Ain Touta	90	80 (88.88%)	73 (81.11%)	84.99%
Tazoult	25	10 (40%)	16 (64%)	52%
Ain Yagout	30	17 (56.66%)	22 (64.70%)	60.68%
Oued Chaaba	25	20 (80%)	23 (92%)	88%
Arris	30	19 (63.33%)	20 (66.66%)	64.99%
Djerma	35	21(60%)	27 (77.14%)	68.57%
Boumia	35	25 (71.42%)	24 (68.57%)	69.99%
Merouana	28	18 (64.28%)	10 (35.71%)	49.99%
Lambiridi	30	15 (50%)	28 (93.33%)	71.66%
Aouled Aouf	35	20 (57.14%)	15 (42.85%)	49.99%
Sefiane	60	55 (91.66%)	58 (96.66%)	94.16%
Seriana	45	20 (44.44%)	17 (37.77%)	41.10%

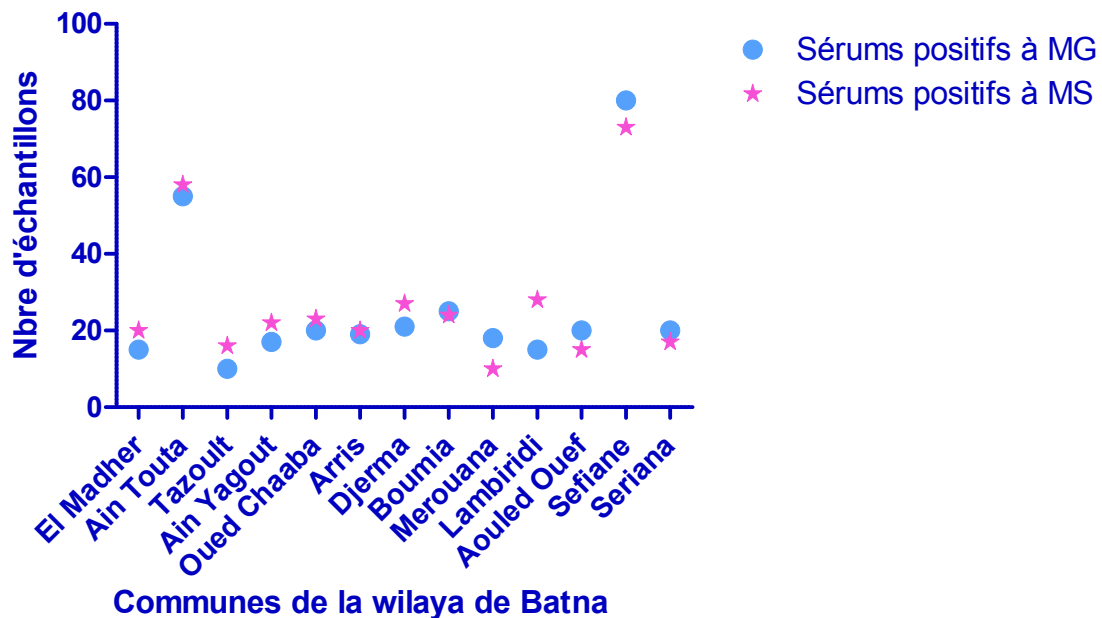


Figure 10 : Répartition des échantillons en fonction des zones d'élevage.

2.2. Résultats sérologiques en fonction de l'âge des oiseaux

L'âge constitue un paramètre très important influençant l'incidence de la mycoplasmosse (Whitford *et al.*, 1994). Il ressort de l'étude des liaisons entre l'âge et la mycoplasmosse (tableau n° X) que les jeunes sujets étaient significativement plus infectés que les sujets adultes quel que soit l'espèce en cause.

En effet, chez les poules pondeuses, la plus forte prévalence de l'infection à MG et de MS était respectivement de 75% et de 95.83% dans le groupe d'âge 52- 112 jours ($P=0.0001$ pour MG et $P=0.0002$ pour MS).

r (MG) 0.9906
r (MS) 0.9891

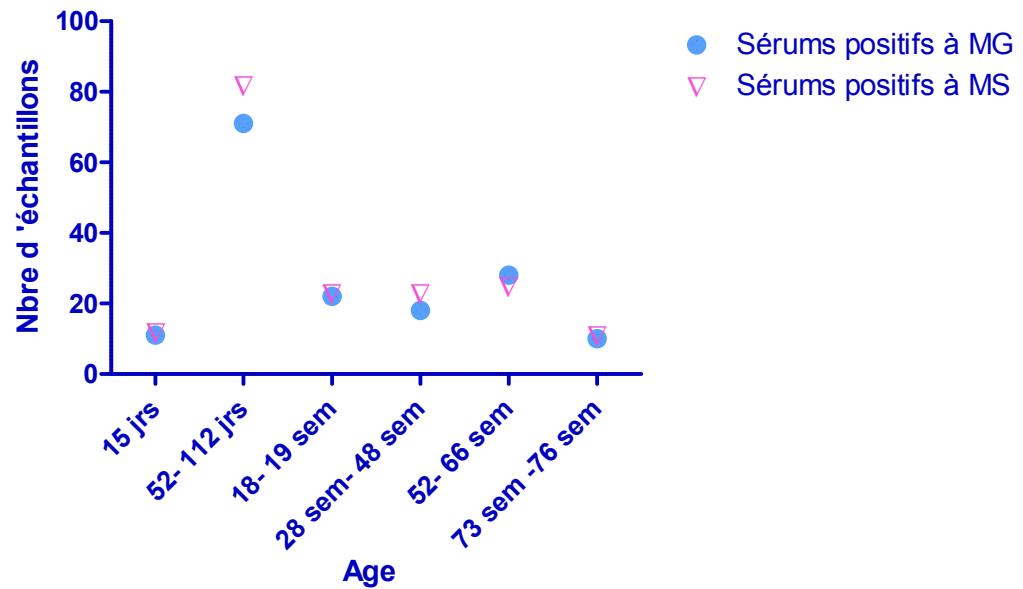


Figure 11 : Influence de l'âge sur l'infection mycoplasmique chez les poules pondeuses.

Chez le poulet de chair, la fréquence de l'infection due à MG et à MS était respectivement de 92.59% et de 88.88% chez les oiseaux de 30-39 jours d'âge (P= 0.0065 pour MG et P= 0.0013 pour MS).

r (MG) 0.9335
r (MS) 0.9702

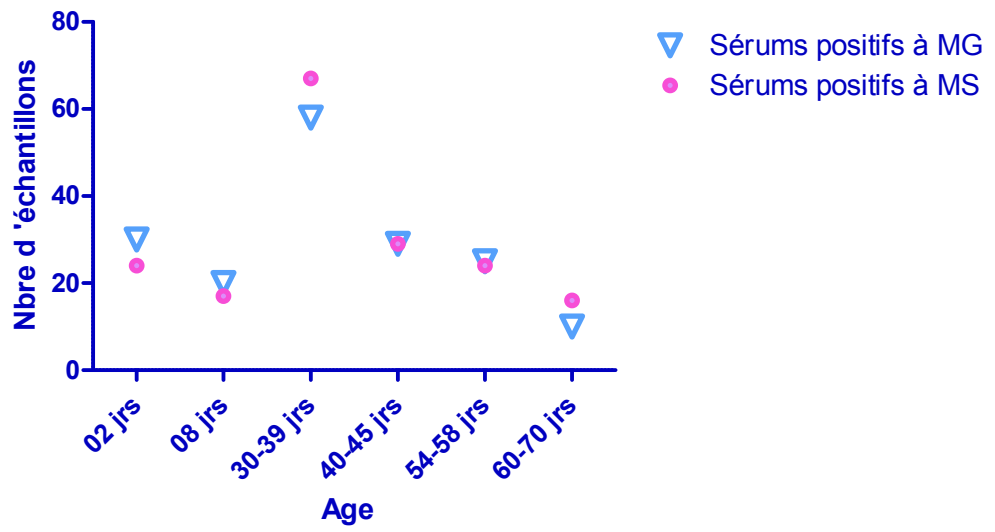


Figure 12 : Influence de l'âge sur l'infection mycoplasémique chez le poulet de chair.

Tableau n° X : Répartition des échantillons de sérums prélevés en fonction de l'âge et du type de production.

Age	Nombre de sérums	Sérums positifs	
		à MG	à MS
<i>Poules pondeuses</i>			
15 jrs	24	11(45.83%)	12 (50%)
52- 112 jrs	24	18 (75%)	23 (95.83%)
18- 19 sem	35	22 (62.85%)	23 (65.71%)
28 sem- 48 sem	110	71 (64.54%)	82 (74.54%)
52- 66 sem	38	28 (73.68%)	25 (65.78%)
73 sem -76 sem	21	10 (47.61%)	11 (52.38%)
Total 1	252	160 (62.21%)	176 (69.84%) 66.025
<i>Poulets de chair</i>			
02 jrs	40	30 (75%)	24 (68.57%)
08 jrs	32	20 (62.5%)	17 (53.12%)
30-39 jrs	27	25 (92.59%)	24 (88.88%)
40-45 jrs	35	29 (82.85%)	29 (82.85%)
54-58 jrs	91	58 (63.73%)	67 (73.62%)
60-70 jrs	28	13 (46.42%)	16 (64%) 55.21
Total 2	253	175 (65.91%)	177 (69.96%)

2.3. La séroprévalence de MG et MS en fonction du type de production

Le taux individuel d'infection est plus significativement élevé pour les poulets de chair ($P < 0.0001$) avec un taux de 65.91% pour *Mycoplasma gallisepticum* et 69.96% pour *Mycoplasma synoviae*.

Chez les poules pondeuses, on avait estimé l'infection causée par MG à 62.21% et celle due à MS à 69.84% (Tableau n° X).

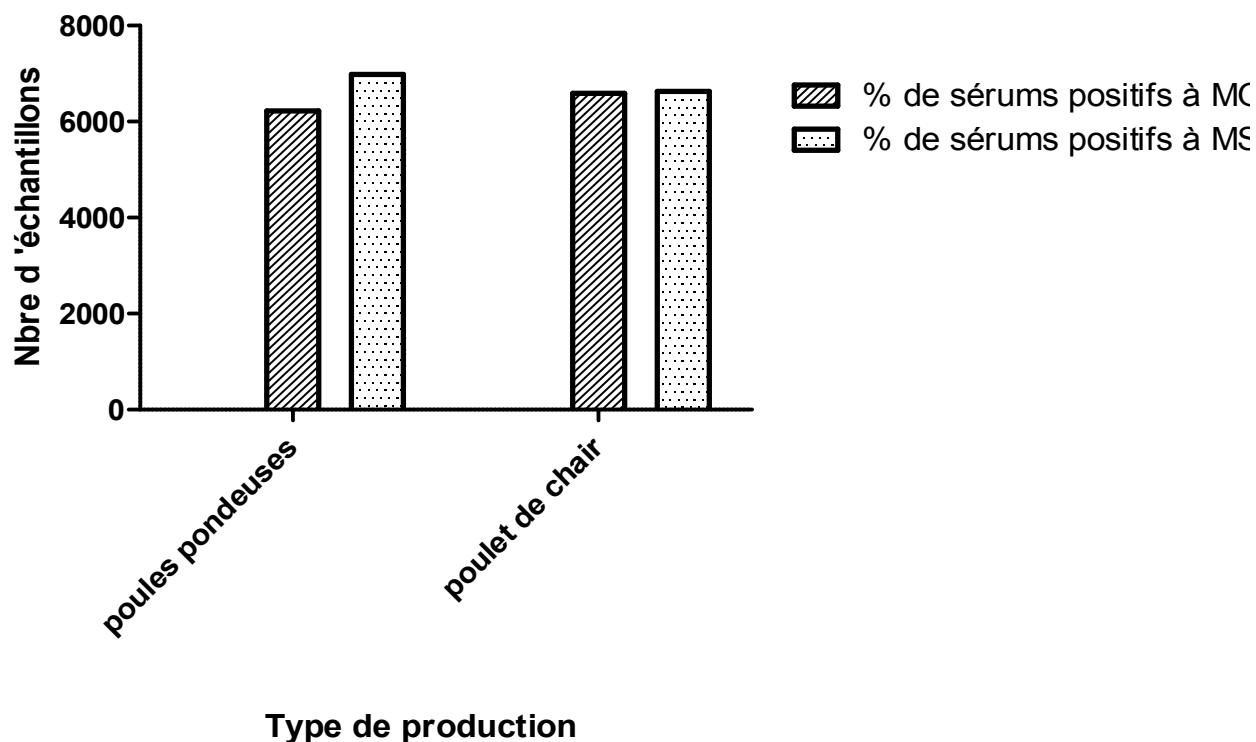


Figure 13 : Relation entre l'infection mycoplasmique et le type de production.

2.4. Résultats sérologiques selon la saison

La sérologie a indiqué également une variation du taux de l'infection en fonction de la saison (Tableau n° XI).

L'infection à *Mycoplasma gallisepticum* semble être plus dominante en hiver plutôt qu'en été avec 70.24% contre 62.73%. Cependant, l'infection à *Mycoplasma synoviae* semble être plus dominante en été avec 91.25% contre 46.69% respectivement.

Tableau n° XI : Répartition des échantillons en fonction de la saison

saison	Nombre d'échantillon	Sérums Positifs	
		à MG	à MS
Hiver	242	170 (70.24%)	113 (46.69%)
Eté	263	165 (62.73%)	240 (91.25%)

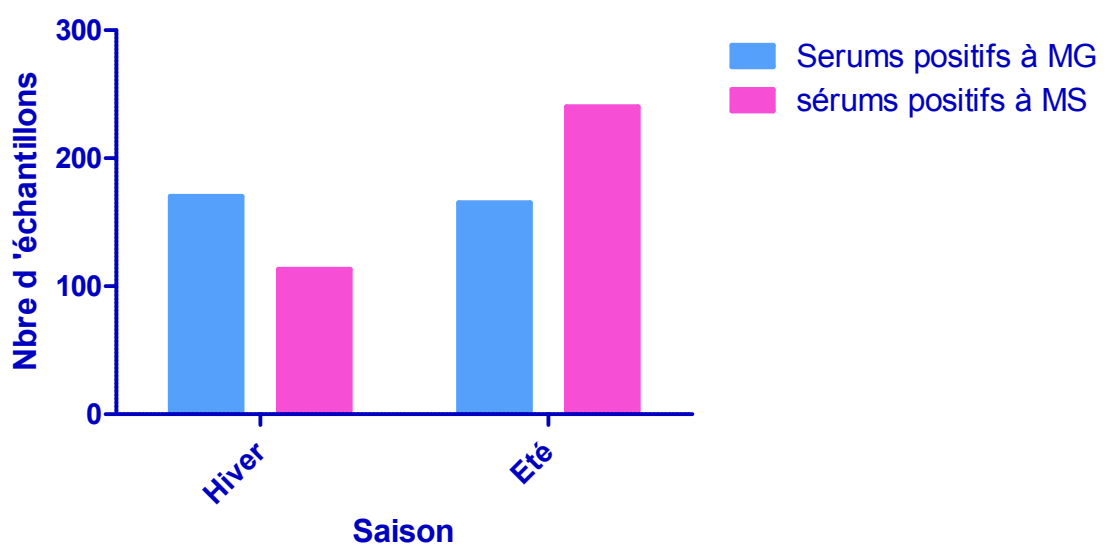


Figure 14 : l'influence de la saison sur l'évolution de l'infection mycoplasmique.

2.5. L'influence de la taille des élevages sur les résultats sérologiques

L'enquête sérologique dans la wilaya de Batna a montré que le plus fort taux d'infection (76.97%) se retrouve dans les troupeaux de grande échelle (18000 oiseaux) en comparaison avec les petits troupeaux. La relation entre le taux d'infection et l'espèce en cause était très significative avec $P=0.0002$ pour MG et <0.0001 pour MS).

Tableau n° XII : Répartition des résultats sérologiques en fonction de la taille de l'élevage.

Taille de l'élevage (Nbre d'Anx / Bât)	Nbre d'élevage	Nbre de sérums testé	Nbre d'Anx séropositifs à MG	Nbre d'Anx séropositifs à MS	Moyenne
500-1000	4	33	21(63.63%)	21(63.63%)	63.63%
1500-2000	3	17	14 (72.35%)	14 (72.35%)	72.35%
3000-4000	3	124	86 (69.35%)	86 (69.35%)	69.35%
4500-4800	4	82	60 (73.17%)	63 (76.82%)	74.99
5000	3	42	25 (59.52%)	28 (66.66%)	63.09%
6000-6500	4	74	35 (47.29%)	41 (55.40%)	51.34%
7000-7200	4	57	35 (61.40%)	42 (73.68%)	67.54%
18000	2	76	59 (77.63%)	58 (76.31%)	76.97
Total	27	505	335	353	

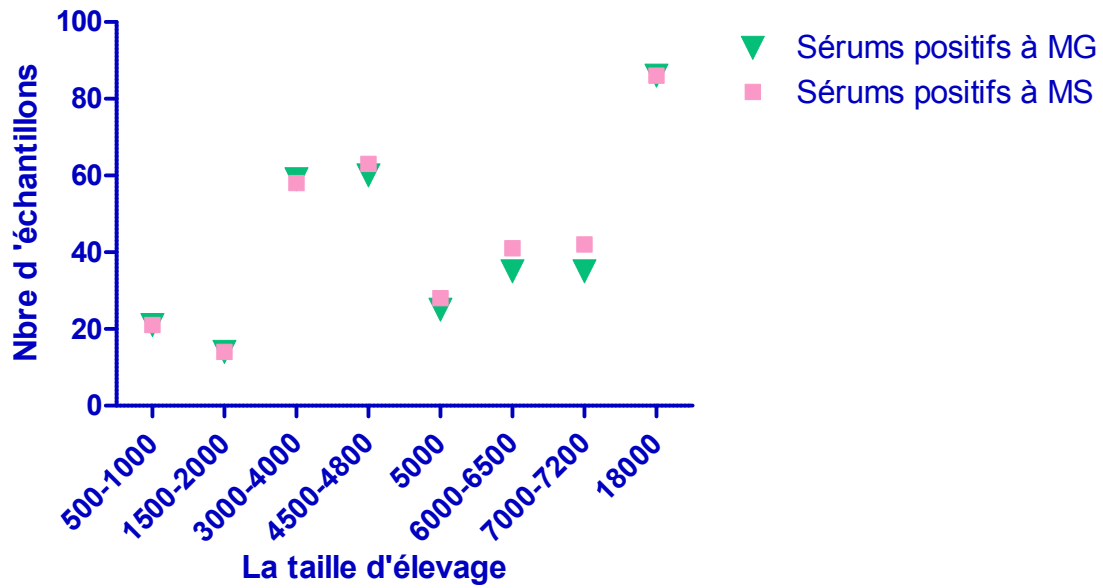


Figure 15 : Résultats de l'infection par MG et MS en fonction de la taille d'élevage.

2.6. Résultats sérologiques en fonction de la souche d'oiseaux élevés

La souche des oiseaux influe significativement sur la variation des taux d'ARL

($P=0.0374$ pour MG et $P=0.0069$ pour MS).

Le tableau n° XIII rapporte pour les poules pondeuses, que la souche Lohman semble être la plus touchée par l'infection mycoplasmique que ce soit celle causée par MG que par MS en comparaison avec la souche Isa Brown et la souche Nouveau gène.

Tableau n° XIII : Répartition des résultats sérologiques en fonction de la souche d'oiseaux

Souche d'oiseaux	Nbre de sérums prélevés	Sérums positifs à MG	Sérums positifs à MS	Moyenne
<i>Poulets de chair</i>				
ISA 15	253	175(69.16%)	177 (69.96%)	69.56%
<i>Poules pondeuses</i>				
ISA Brown	144	84 (58.33%)	96 (66.66%)	62.49%
Lohman	47	36 (76.59%)	36 (76.59%)	76.59%
Nouveau gène	61	40 (65.57%)	44 (72.13%)	68.85%

r (MG) 0.9983
r (MS) 0.9999

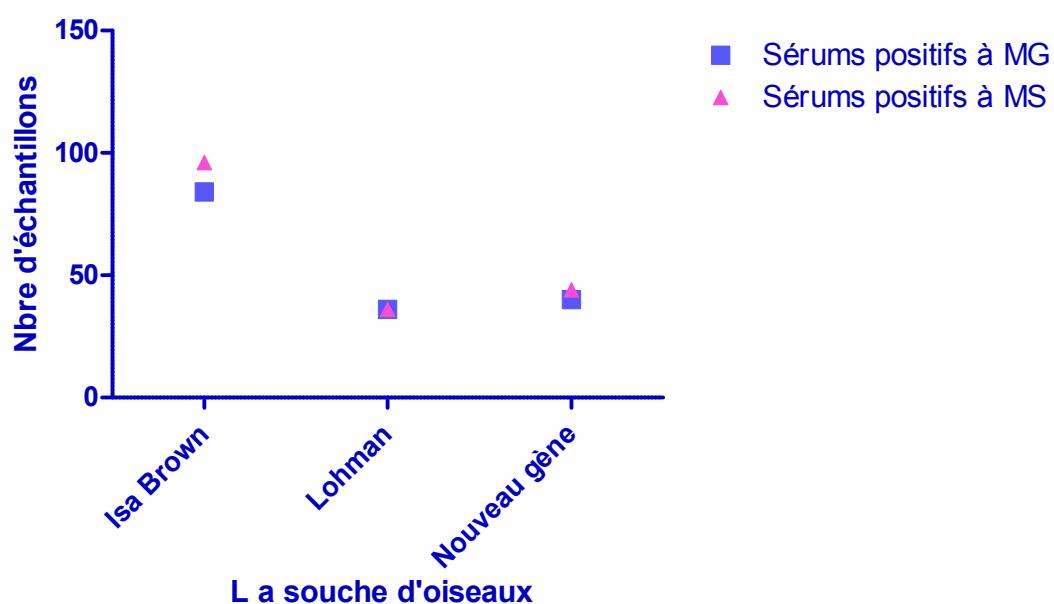


Figure 16 : Influence de la souche d'oiseaux sur la prévalence de la maladie chez la poule pondeuse.

3. Résultats de l'étude bactériologique

200 souches de mycoplasmes ont été isolés à partir de 563 échantillons soit un taux d'isolement de 35.52%.

Les photos n° 9, 10, 11, 12, 13 montrent les différents tests utilisés pour l'identification de l'espèce des souches isolées dans l'ordre de leur utilisation.

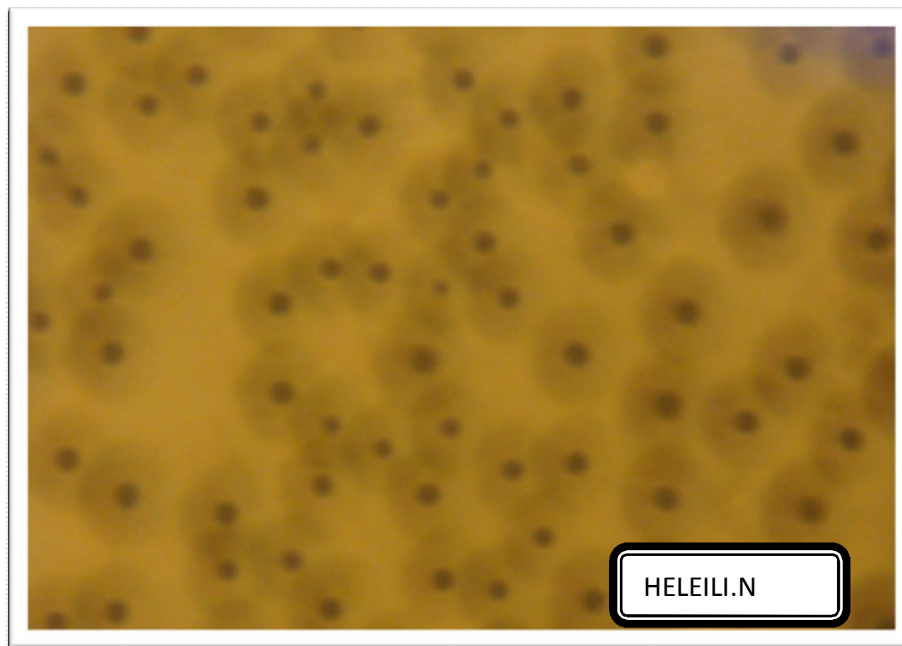


Photo 5: Aspect d'œuf sur plat des mycoplasmes sous stéréo-microscope (X40).

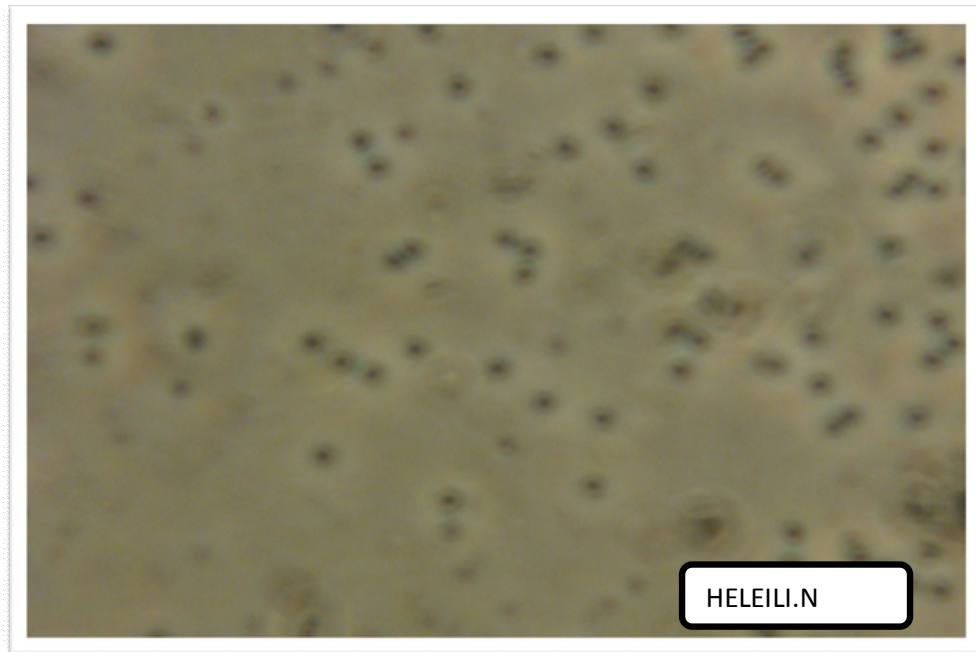


Photo n°6 : Identification des mycoplasmes par la coloration de Diènes (seules les mycoplasmes retiennent le colorant bleu).



Photo n°7 : Test de sensibilité des mycoplasmes à la digitonine (inhibition de la croissance des colonies au tour des disques de digitonine).



Photo n°8 : Test de fermentation du glucose positif (à droite) et d'hydrolyse de l'arginine négatif (à gauche).

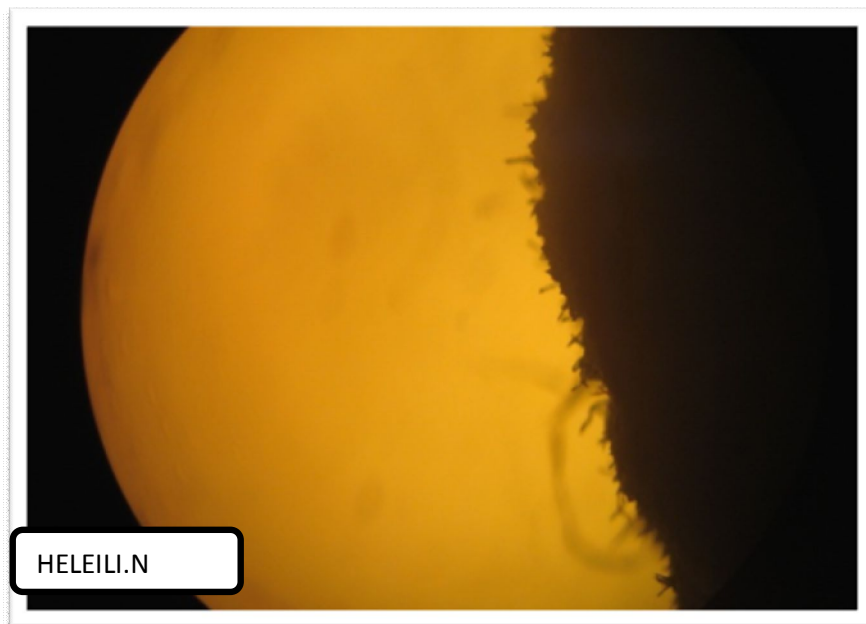


Photo n°9 : Test d'inhibition de la croissance positif observé sous stéréo microscope (absence de croissance des mycoplasmes au tour du disque imprégnés de l'antisérum spécifique).

3.1. Prévalence globale de *Mycoplasma gallisepticum* et *Mycoplasma synoviae*

134 souches de MG et 46 souches de MS ont été isolées lors de cette étude.

MG représentait quant à elle 23.8% des isolats dans les élevages visités alors que MS était incriminée dans 8.17% des infections (Tableau n°XIII).

Tableau n° XIV : Résultats globaux des échantillons positifs en culture.

Nbre d'échantillons	Cultures positives	Cultures positives MG	Cultures positives MS
563	200 (35.52%)	134 (23.80%)	46 (8.17%)

3.2. Résultats bactériologiques en fonction du type de production

Le taux de cultures positives rapporté dans notre étude pour *Mycoplasma gallisepticum* est de 14.33% pour les poules pondeuses et de 33.09% pour le poulet de chair correspondant à 40 et 94 souches respectivement. Pour *Mycoplasma synoviae*, les taux sont plus bas ; 6.45% pour les poules pondeuses et 9.85% pour le poulet de chair (Tableau n° XIV).

Tableau n° XV : proportion de cultures positives en fonction du type de production.

Type de Production	Nombre d'échantillons	Dg +tive	Taux de Mycoplasmes	Nombre de MG	Nombre de MS
Poules pondeuses	279	68	24.37%	40 (14.33%)	18 (6.45%)
Poulets de chair	284	132	46.47%	94 (33.09%)	28 (9.85%)
Total	563	200	35.52%	134 (23.80%)	46 (8.17%)

Dg : Digitonine

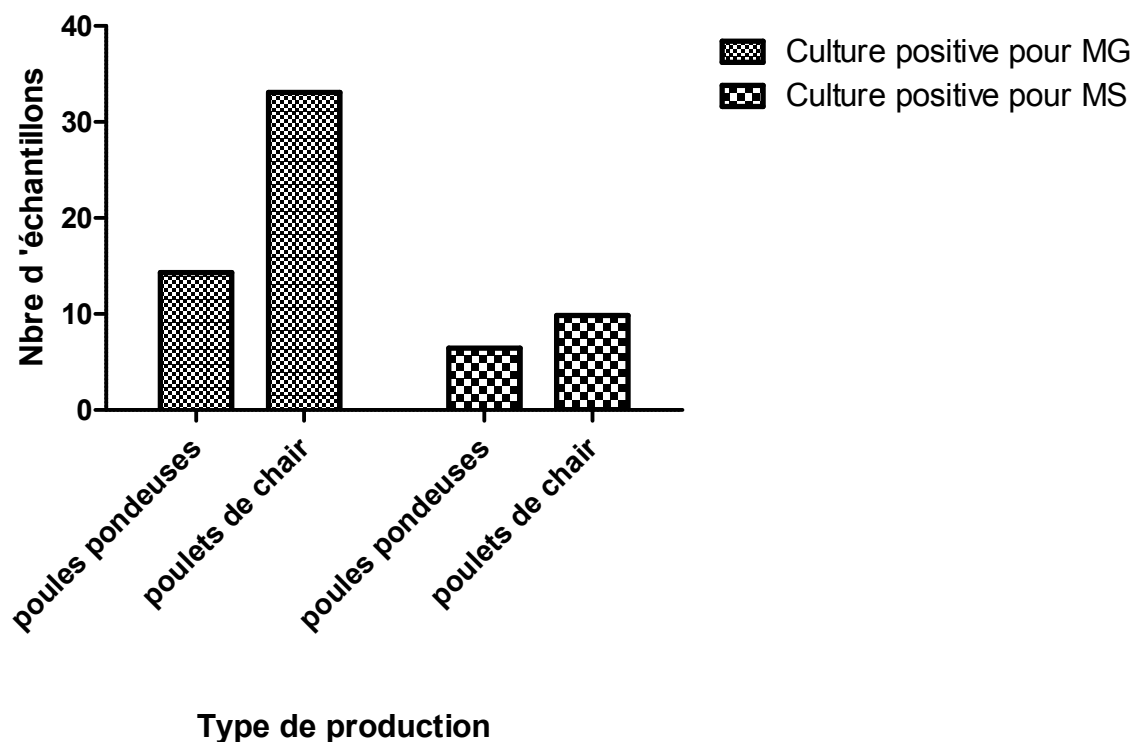


Figure 17 : Répartition des résultats de l'isolement en fonction du type de production.

3.2. Résultats des isollements en fonction des zones d'élevages

La totalité des élevages de poules pondeuses et de poulets de chair ont montré des cultures positives. Toutes les régions de la wilaya étaient contaminées par *M. gallisepticum* et *M. synoviae*.

La commune de Sefiane est fortement contaminée par MG et MS avec un pourcentage d'isolement de 25.69% suivie d'Ain Touta (23.74%).

MG sévit de manière plus importante au niveau de la commune d'Ain Touta (41.66%) tandis que l'infection par MS est plus répandue au niveau de la commune d'Oued Chaaba (15%).

Tableau n° XVI : taux des cultures positives en fonction de la zone de prélèvement.

Communes	Nombre d'échantillons	Nombre de MG isolés	Nombre de MS isolés	Moyenne d'isolement
El Madher	37	8 (21.62%)	4 (10.81%)	16.21%
Ain Touta	120	50 (41.66%)	7 (5.83%)	23.74%
Tazoult	35	6 (17.14%)	1 (2.85%)	9.99%
Ain Yagout	50	10 (20%)	3 (6%)	13%
Oued Chaaba	40	5 (12.5%)	6 (15%)	13.75%
Arris	30	3 (10%)	2 (6.66%)	8.33%
Djerma	35	2 (5.71%)	3 (8.57%)	7.14%
Boumia	35	3 (8.57%)	2 (5.71%)	7.14%
Merouana	28	6 (21.42%)	3 (10.71%)	16.06%
Lambiridi	26	1 (3.84%)	1 (3.84%)	3.84%
Ouled Aouf	35	10 (28.57%)	4 (11.42%)	21.91%
Sefiane	72	28 (38.88%)	9 (12.5%)	25.69%
Seriana	45	2 (4.44%)	1(2.22%)	3.33%

r (MG) 0.9641
r (MS) 0.6778

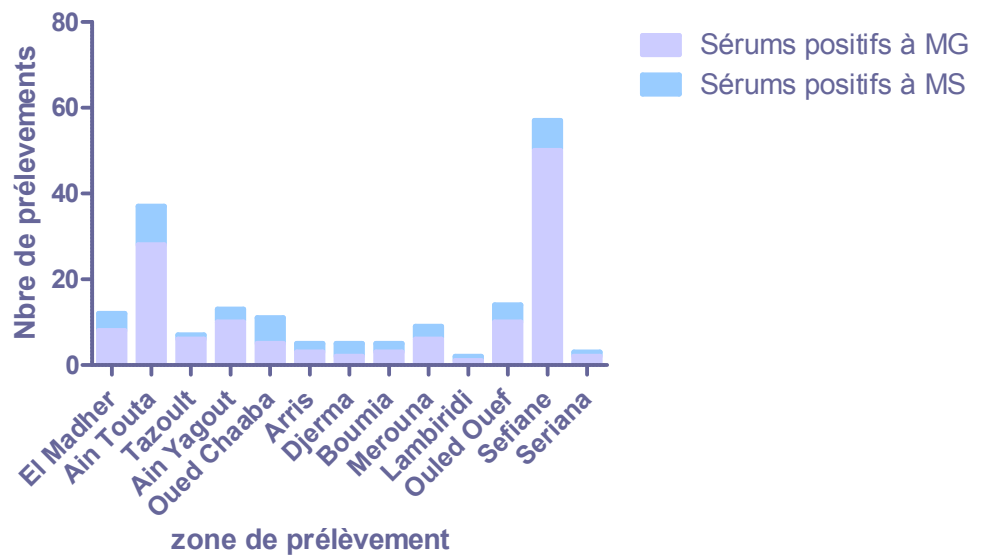


Figure 18 : Répartition des échantillons positifs en culture en fonction de la zone de prélèvement.

3.3. Répartition des échantillons positifs en culture en fonction de l'organe prélevé

Les résultats d'isolement des mycoplasmes à partir de différents sites par rapport au nombre total de prélèvements montrent que pour MG et MS, le site d'élection est représenté par les sacs aériens avec 56.33% et 15.49% respectivement.

On note l'absence d'isolement de MG à partir du sinus infra-orbitaire, de la fente palatine et du cloaque, tandis que l'isolement de MS a été réalisé au niveau des différents organes prélevés.

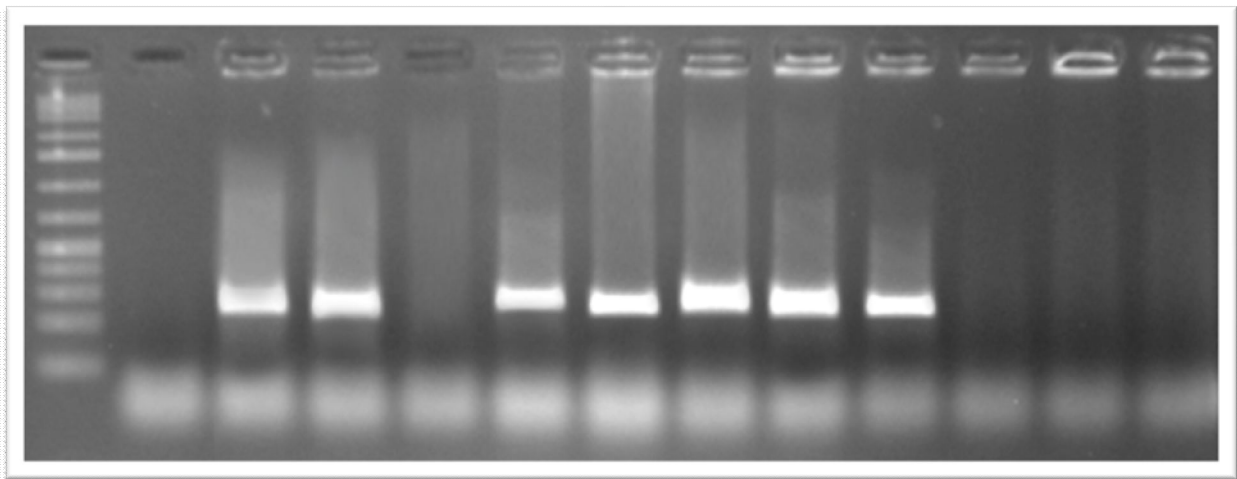
Tableau n° XVII : Répartition des échantillons positifs en culture en fonction de l'organe prélevé.

Organe Prélevé	Nombre d'échantillo n	Taux/Nbre de MG	Taux/Nbre de MS
Trachée	190	60 (31.57%)	16 (8.42%)
Fente palatine	89	0	4(4.49%)
Cloaque	63	0	6 (9.52%)
Poumons	71	34 (47.88%)	9 (12.67%)
Sacs aériens	71	40 (56.33%)	11 (15.49%)
Sinus infra- orbitaire	79	0	0
Total	563	134	46

4. Utilisation de la PCR pour l'identification des souches isolées

Sur les 18 souches identifiées comme MG par le test d'IC, 9 seulement se sont révélées positives par la technique de PCR (photo n°14).

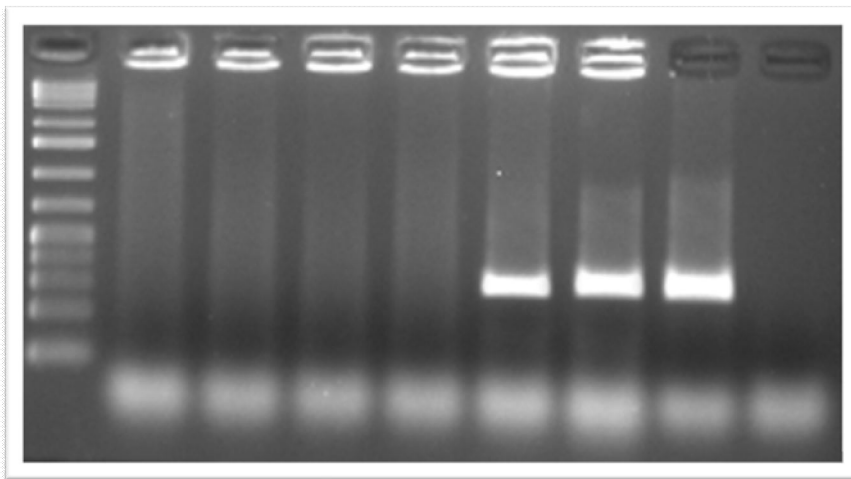
Les souches identifiées comme MS par le test d'IC toujours se sont révélées négatives par le test de PCR (La photo n°15).



(a)

Puits 1 : marqueur de poids moléculaire

Puits 2 à 13 : échantillons 1 à 12



(b)

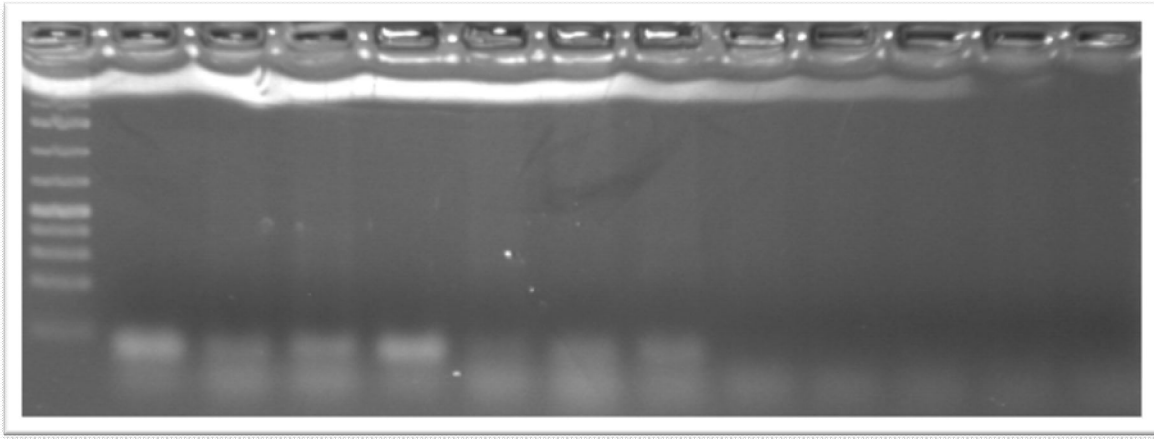
Puits 14 : marqueur de poids moléculaire

Puits 15 à 20 : échantillons 13 à 18

Puits 21 : témoin MG positif

Puits 22 : témoin négatif (eau)

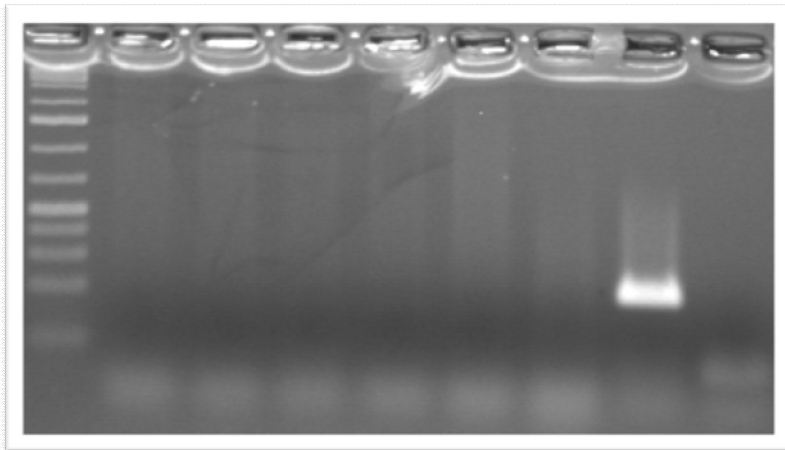
Photo 10 (a,b) : Résultats de la PCR pour les 18 souches de MG.



(a)

Puits 1 : marqueur de poids moléculaire

Puits 2 à 13 : échantillons 1 à 12



Puits 14 : marqueur de poids moléculaire

Puits 15 à 20 : échantillons 13 à 18

Puits 21 : témoin MS positif

Puits 22 : témoin négatif (eau)

Photo 14 (a,b) : Résultats de la PCR pour les 18 souches de MS.

5. Comparaison des résultats de la sérologie, de la culture et de la PCR

Le tableau n° XVIII résume les résultats obtenus en sérologie, en bactériologie pour les souches identifiées par PCR.

Tableau n°XVIII : Comparaison des résultats de la sérologie, la culture et la PCR.

N°	ARL		Culture		PCR	
	MG	MS	MG	MS	MG	MS
1	+	-	+	+	-	-
2	-	+	+	+	+	-
3	-	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-	-
5	+	-	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	-	+	+	+	-
10	+	+	+	+	-	-
11	+	+	+	+	-	-
12	-	+	+	+	-	-
13	-	-	+	+	-	-
14	-	+	+	+	-	-
15	+	+	+	+	-	-
16	+	-	+	+	-	-
17	+	-	+	+	+	-
18	-	-	+	+	+	-
Total	11	9	18	18	9	0
	(61.11%)	(50%)	(100%)	(100%)	(50%)	

En ce qui concerne les souches de *Mycoplasma gallisepticum* isolées en culture, il y avait 11 oiseaux séropositifs représentant un taux de sensibilité de 100%. Par contre, la PCR a détecté 5 cas sur les 11 animaux séropositifs soit une sensibilité de 45.45% (tableau n° XIX).

Tableau n° XIX : Sensibilité des tests de PCR, de culture et d'ARL.

<i>Mycoplasma gallisepticum</i>			<i>Mycoplasma synoviae</i>		
<i>Sérologie</i>			<i>Sérologie</i>		
Positive	Sensibilité		Positive	Sensibilité	
<i>Culture positive</i>	11	100%	<i>Culture positive</i>	9	100%
<i>PCR positive</i>	5	45.45%	<i>PCR positive</i>	0	0%

Pour *Mycoplasma synoviae*, le test d'ARL a présenté une sensibilité de 100% (9 cas positifs en culture et en sérologie). Sur les 50% des animaux séropositifs nous n'avons pu confirmer la présence de MS par la technique de PCR.

DISCUSSION

1. Résultats de l'investigation menée au niveau des élevages

- Capacité de production

L'effectif des cheptels varient entre 1000 et 9000 pour le poulet de chair et 10.000 et 50.000 pour les poules pondeuses. Ce ci est en accord avec les effectifs rapportés dans l'étude d'**Alloui et al (2003)**.

L'enquête a montré la fréquence des élevages dont la taille est de 3500-5000 sujets chez les poulets de chair et de 10000-50000 sujets chez les poules pondeuses. Ces résultats ne correspondent pas aux résultats relevés par l'enquête d'**Elgroud (2009)** qui relève la prédominance des élevages de poulet de chair de 1500-3000 et **d'Aimeur et al. (2010)** qui appuient ce taux chez les deux types de production. Ce ci prouve que les aviculteurs de la wilaya de Batna ont beaucoup investi dans ce domaine malgré toutes les contraintes qui existent sur terrain (alimentation, problèmes sanitaires...) et ce grâce aux salons qui s'organisent chaque année pour informer les éleveurs sur les paramètres de l'élevage et pour instaurer et renforcer la confiance entre l'éleveur et le vétérinaire.

L'intensification de la filière avicole, n'évolue pas sans problèmes. En effet la plupart des aviculteurs ne sont pas des professionnels et ne maîtrisent pas les règles hygiéniques fondamentales, ce qui par conséquent favorise le développement d'un environnement défavorable pour les volailles, entraînant l'émergence de pathologies diverses. Ces dernières portent atteinte à la rentabilité et à la qualité des produits. Les élevages visités présentent des imperfections relatives à la conduite d'élevage présentées ci-dessous.

- Pratique du système « tout plein-tout vide »

Une règle d'or de l'élevage est la pratique de la bande unique, un seul âge et une seule espèce par ferme de façon à respecter le système « tout plein-tout vide » (**Kermorgant, 1999**). Entre l'envoi des derniers lots à l'abattoir et la mise en place du lot suivant, un vide sanitaire doit être appliqué et la désinfection des bâtiments et du matériel est impératif. L'environnement dans les

bâtiments d'élevage représente un milieu favorable pour la multiplication de germes pathogènes et ce grâce à la température, l'humidité et d'autres facteurs liés à l'animal. Une décontamination mal faite dans le bâtiment permettra la transmission de microorganismes aux bandes de volailles suivantes ainsi que leurs produits. Or, la majorité des élevages de la wilaya pratiquent plus de deux bandes sans aucun respect du vide sanitaire.

- **Situation**

La quasi-totalité des élevages étudiés sont mal implantés se situant pas très loin d'autres bâtiments ou sont élevés d'autres volailles d'âge différent et même d'espèces différentes (124/148). Une telle situation ne permet pas d'assurer une indépendance sanitaire (Agabou, 2006) surtout si la décontamination est mal faite dans le bâtiment.

La conception du bâtiment d'élevage doit répondre à certaines normes qui semblent être absentes pour les élevages de la région de Batna. L'orientation des bâtiments dans le sens inverse des vents dominants constitue l'un des paramètres les plus importants dans la contamination des animaux et en particulier les maladies respiratoires en raison de la transmission d'agents pathogènes entre autre par inhalation. En effet, il n'y a que 66 élevages sur 148 représentant un taux de 44.59% qui respectent ce paramètre lors de la construction du bâtiment.

- **Aménagement intérieur**

Les aménagements intérieurs de la plupart des bâtiments ne facilitent pas les opérations de nettoyage/désinfection. Il s'agit surtout :

- Des murs présentent des surfaces rugueuses pouvant constituer un foyer de germes pathogènes pour les bandes suivantes (Aimeur *et al.*, 2010) surtout devant un non respect du délai du vide sanitaire malgré que 120 des élevages étudiés prétendent qu'ils le respectent.
- Du sol non bétonné est très difficile à nettoyer et à désinfecter.

- De la température et de l'humidité: de nombreux auteurs reconnaissent que la température constitue le paramètre le plus important de tous les facteurs du microclimat dans l'élevage avicole (**Alloui et al., 1997**). La présente étude a montré qu'il n'y a pas respect de la température dans la moitié des bâtiments (55/148), par rapport aux recommandations de Rokicki (1988) cité par **Alloui et al., 1997**. L'humidité constitue également un facteur déterminant dans l'élevage avicole mais malheureusement 90/148 semblent ne donner aucun intérêt à l'hygrométrie et ne daignent même pas posséder un hygromètre pour apprécier l'humidité qui doit être, selon **Le Menec (1980)**, comprise entre 50 et 75%. Les bâtiments sans un système adéquat de ventilation sont les plus contaminés, surtout lorsque la température interne et l'humidité relative sont élevées ce qui est le cas pour nos élevages (**Alloui et al., 2004**).

- **Les barrières sanitaires**

L'absence de barrières sanitaires augmente le risque d'introduction des germes par plusieurs vecteurs, notamment ;

- Les oiseaux sauvages qui s'introduisent par les ouvertures d'aérations non grillagées pour la plupart des élevages. Ils sont rendus responsables de la contamination des oiseaux par divers microorganismes ; par les mycoplasmes qui peuvent persister plusieurs jours dans l'environnement sur différents supports (**Kempf, 1992; Bouchardon et Kempf, 2008**), par les salmonelles qui persistent 36 mois dans les fèces (**Friend et Franson, 1999 ; Reed et al., 2003**), par *Pasteurella multocida* (**Pederson et al., 2003**).....etc.

- Les rongeurs sont omniprésents dans les bâtiments étudiés et ne faisant l'objet de lutte que dans 57 élevages (38.51%). Leurs méfaits sont sous-estimés. Ce sont des excréteurs de germes assurant la persistance de la contamination et la recontamination des locaux d'élevage après nettoyage/ désinfection (**Meerburg et Kiljstra, 2007**). Ils sont responsables de la transmission de *Salmonella spp* (**Davies et Breslin, 2003**), de *Pasteurella spp* (**Guard-Bouldin et al., 2004**), de *Campylobacter spp* (**Agabou, 2006**)...etc.

- Les animaux domestiques qui entretiennent les infections surtout salmonelliques
- L'absence d'un personnel qualifié contribue de façon directe à la propagation des infections d'un bâtiment à un autre. On attribue au personnel la lourde responsabilité quant à la propagation de nombreuses infections par l'intermédiaire des chaussures en raison de l'absence de pédiluves, par les vêtements souvent souillés par les déjections, par les mains...etc.
- L'absence de rotoluves favorisant l'introduction des germes par les véhicules de transport des aliments et des volailles et lors d'évacuation des effluents surtout la litière contaminée.
- L'exposition à l'ammoniac des oiseaux provoque un ralentissement de la croissance des poulets exposés et des lésions assez sévères de l'appareil respiratoire (**Kempf et al., 1988**). L'excès d'ammoniac peut également entraîner des perturbations de ponte chez les poules pondeuses (**Alloui et al., 1997**).

Les résultats de cette étude montrent que le statut hygiénique des poulaillers est en dessous des normes requises. Il est primordial que nos aviculteurs améliorent les conditions hygiéniques par l'application de nouvelles méthodes hygiéniques et surtout par le respect des barrières sanitaires, ce qui permet d'obtenir de meilleures performances de production comme celles obtenues dans le secteur public.

2. Résultats sérologiques

Cette étude a permis d'évaluer le statut de l'infection mycoplasmatique (par la sérologie et la bactériologie) dans 1.5% des élevages de la wilaya de Batna. **Rodríguez et al., 2010** ont étudié 1% des élevages en Uruguay ce qui paraît assez significatif.

Le dépistage sérologique a été réalisé par la technique d'agglutination rapide sur lame. Cette technique présente l'avantage d'être rapide, simple, de faible coût (**Vlaovic et Bigland, 1971**) mais elle manque de spécificité et / ou de sensibilité à cause des réactions non spécifiques qu'elle produit et ce pour de multiples raisons ;

- Les réactions positives restent pendant de nombreux mois même en l'absence de symptômes et peuvent aussi se produire suite à la congélation des sérums (**Cullen et Anderton, 1974**).

- Les anticorps anti mycoplasmiqes peuvent être détectés dans les sérums contaminés (**Roberts et al., 1967**) ou après l'inoculation des oiseaux avec un adjuvant de vaccins pour mycoplasmes par voie intramusculaire (**Timms et Cullen, 1972**). **Thornton (1973)** avait produit des réactions non spécifiques chez des oiseaux infectés par *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus faecalis* en utilisant un antigène mycoplasmiqes. Les travaux de **Luttrell et al., (1991)** confirment ce résultat. La mauvaise conservation des sérums ou des variations dans la production des antigènes conduisent eux aussi à ce même résultat (**Kleven, 1975**).

Par conséquent, son utilisation est fortement recommandée pour la surveillance des troupeaux plutôt que pour détecter prévalence individuelle (**Kempf et al., 1994**).

Pour cette raison et pour pallier à ces contraintes, nous avons essayé de respecter certaines conditions afin d'assurer la sensibilité et la spécificité maximales de ce test;

- Utilisation des sérums frais. Ceux-ci avaient été décomplémentés pour éviter les réactions croisées entre MG et MS et dilués à 1/5^{ème}. De plus, tous les élevages ne sont pas vaccinés contre les mycoplasmoses et donc le risque d'avoir des réactions faussement positives est écarté.

- L'évaluation de l'essai a été validée en utilisant des sérums de contrôle positifs et négatifs.

Dans notre étude, la taille des échantillons testés est conforme aux recommandations du fabricant.

Le taux moyen d'infection des élevages est de l'ordre de 68.11%. Il est plus élevé que ceux d'études similaires ; **Boucetta et al. (1997)** avec 22.56%, **Papanikolaou (2002)** avec 21%, **Sikder et al. (2005)** avec 46.88% et **Thái et al. (2009)** avec 37.83% mais il semble se rapprocher des taux d'infections rapportés par d'autres études ; **Wunderwald et al. (2002)** avec 75%, **Sarkar et al. (2005)** avec un taux de 58.90%, **Barua et al. (2006)** avec 58%, **Hossain et al. (2007)** avec 55.13%, **Osman et al. (2009)** avec 61.47%) et **Aimeur et al. (2010)** avec 40%.

Chez les poulets de chair, le taux d'infection par *M. gallisepticum* est de 65.91%. Cette valeur paraît être nettement supérieure aux valeurs de 1.25%, 49.5% et 30% rapportées respectivement par **Baruta et al. (2001)**, **Barua et al. (2006)** et **Aimeur et al. (2010)**. Pour MS, Le taux de séroconversion enregistré dans notre étude (69.96%) est presque le même que ce lui d'une étude réalisée par **Mac Owan et al. (1982)** et qui est de 64.23%.

L'infection mycoplasmique à MG chez les poules pondeuses est de l'ordre de 62.21%. Elle est vraisemblablement aussi répandue qu'au Bangladesh où le taux s'élève à 66.5% et 45.1% dans l'étude de **Barua et al. (2006)** et **Hossain et al. (2010)**. Le résultat rapporté lors de notre étude pour l'infection à MS (69.84%) semble se rapprocher de celui observé par **Nascimento et al. (2005)** avec 60% et **Kapetanov et al. (2010)** avec 40.48%.

L'enquête sérologique entreprise par nos soins, démontre l'influence de la saison sur l'infection. En effet, la mycoplasmosse sévit lourdement durant l'hiver puis son intensité décroît avec l'arrivée de l'été.

En effet, nous avons observé un taux d'infection de 70.24 % durant l'hiver et de 62.73 % durant l'été pour MG, ce qui rejoint les résultats respectifs de **Sikder et al. (2005)**, **Hossain et al. (2007)**, **Sarkar et al. (2005)**, **Hossain et al. (2010)**, **Thai et al. (2009)**. L'infection à *Mycoplasma synoviae* était, par contre, légèrement supérieure en saison chaude (91.25% contre 46.69%). Le même résultat a été enregistré par **Arbelot et al. (1997)**.

L'âge constitue, lui aussi, un facteur de variation dans la prévalence de la maladie. D'après nos résultats, les jeunes sujets sont plus atteints que les adultes. Ce ci est en accord avec les résultats d'**Osman et al. (2009)**.

L'enquête sérologique dans la wilaya de Batna a montré le plus fort taux d'infection (76.97%) dans les troupeaux de grande échelle (≥ 5000 oiseaux) en comparaison aux petits troupeaux. Cette constatation est semblable à ce qui a été démontré par **Talha (2003)** qui a enregistré 36% pour l'infection à MG dans un troupeau contenant 300 oiseaux par rapport à 33% dans un troupeau contenant 250 oiseaux. Cette intensité de l'infection dans les élevages à grande production est lié sans doute aux lacunes dans la gestion et la biosécurité (**Chandiramani et al., 1966**).

La sérologie est un bon moyen de dépistage de l'infection à mycoplasmes mais l'isolement de ces germes est un meilleur outil pour confirmer la présence de l'agent infectieux.

3. Résultats bactériologiques

Le résultat d'isolement de mycoplasmes dans les élevages visités est de 35.52%. Ce résultat est en accord avec la la fréquence d'isolement des mycoplasmes lors de l'investigation réalisée par **Pourbakhsh et al., 2010** qui rapportent un taux d'isolement de 30.74%. Par contre, il est inférieur à celui de **Behbahan et al., 2005** (81.3%) et **Buim et a.l, 2009** (72.7%).

Cette différence dans la fréquence d'isolement entre notre étude et ces différentes études pourrait s'expliquer par :

- certains chercheurs ont signalé que le milieu de culture SP4 est meilleur pour l'isolement de certaines souches fastidieuses de MG telles que la souche ts-11, par rapport au milieu de Frey (**Fritz et al., 1991**). Tous les mycoplasmes avaient été isolés sue le milieu de Frey dans notre étude.
- Il a été généralement constaté que lorsque les prélèvements sont réalisés sur des poules pondeuses, il est difficile d'isoler MG parce que les cultures sont contaminées par des mycoplasmes

pathogènes qui se développent très rapidement et très vigoureusement. Or, on constate que le nombre de souches de MG isolées lors de notre étude chez les poules pondeuses (40) représente la moitié de celui observé chez le poulet de chair (94).

143 souches de *Mycoplasma gallisepticum* ont été isolées soit un taux de 23.8%. Ce pourcentage est similaire aux taux de 23.26%, 31.6% et 20.3% rapportés respectivement par **Pakpinyo et Sasipreeyajan, 2007**, **Gharaibeh et Al Roussan, 2008** et **Aimeur et al., 2010**.

Chez les poules pondeuses, le pourcentage d'isolement pour MG est de l'ordre de 14.33% ce qui rejoint les résultats de **Helail, 1998** (13.6%). Pour les poulets de chair, notre résultat (33.09%) est plus important par rapport à celui de l'enquête tunisienne menée par **Boucetta et al., 1997**.

Le taux d'infection par MS dans les élevages visités (8.17%) est similaire à celui de **Poveda et al., 1990** (4.6%) et d'**Aimeur et al., 2010** (7.3%) et mais plus faible par rapport à celui d'**Al Khalaf et al., 2009** (19.5%). Les poulets de chair étaient plus infectés par *Mycoplasma synoviae* avec 28 souches plutôt que les poules pondeuses avec 18 souches (soit 9.95% et 6.45% respectivement). Ceci est en accord avec les résultats de **Bencina et al., 1987** (24.6% pour MG et 9.2% pour MS) mais en contradiction avec les résultats d'**Aimeur et al., 2010** qui confirment la prédominance de MS chez les poules pondeuses.

L'isolement des mycoplasmes à partir de différents organes à été réalisé afin de pouvoir déterminer le site d'élection des mycoplasmes.

En ce qui concerne *Mycoplasma gallisepticum*, les sacs aériens représentent le site d'élection avec 56.33% % suivi par les poumons (47.88%) et enfin la trachée (31.57%).

Sentías-Cué et al., 2005 et **de Shaker, 2005** appuient respectivement nos résultats pour la prédominance de MS et de MG au niveau des sacs aériens.

4. Comparaison des résultats sérologiques et bactériologiques

La discordance entre sérologie positive et culture négative peut s'expliquer par l'intervention de plusieurs facteurs : la présence d'inhibiteurs tissulaires de croissance des mycoplasmes (**Boussetta et al., 1997**), l'utilisation parfois d'écouvillons secs ce qui rend les possibilités d'isolement plus faibles et le fait que les écouvillons soient pauvres en germes ou présence de germes fragiles et peu viables (**Zain and Bradbury, 1995**), aux conditions de croissance nécessaires à leur culture fournies par le milieu artificiel (**Amin and Jordan, 1978**), le fait est que les mycoplasmes surtout MG peuvent persister longtemps dans le sérum des oiseaux aussi bien les élevages chair que ponte même après la fin de l'épisode infectieux (**Kempf et al., 1998 ; Takase et al., 2000**).

Le diagnostic des mycoplasmoses aviaires est essentiellement basé sur la culture et la sérologie. Mais la culture est longue et fastidieuse et l'isolement des mycoplasmes peut souffrir de la contamination des suspensions bactériennes par des microorganismes à croissance rapide. Le test sérologique le plus utilisé est l'ARL mais ce dernier manque souvent de spécificité en particulier au moment de la vaccination avec des vaccins inactivés. Pour toutes ces raisons, l'orientation vers les méthodes moléculaires pour la détection et la caractérisation des mycoplasmes aviaires est primordiale.

5. Résultats de l'identification moléculaire

Les résultats de la PCR donnent un taux de positivité de 50% pour les souches de MG venant rejoindre les résultats de **Behbahan et al., 2005** qui sont de 43%.

Un taux de 0% pour le test de PCR concernant les souches de MS isolées dans notre laboratoire a également été observé dans l'étude de **Salisch et al., 1999** et ce malgré une culture positive.

Nous remarquons que la PCR n'a pas présenté une sensibilité de 100% pour les souches de MG et surtout pour MS alors que cette technique est présumée être plus sensible que la culture (**Raviv et Kleven, 2009**).

Ce résultat négatif (pour MS) peut également être expliqué comme suit :

- La possibilité de perdre certaines souches atypiques de mycoplasme par la technique de PCR surtout si elles ont connu de multiples passages sur milieu artificiel (**Kempf et al., 1997 ; Ben Abdelmoumen Mardassi et al., 2005**) ce qui est le cas de nos souches.
- La contamination des souches à tester peut affecter la fiabilité du test (**Manuel terrestre de l'OIE, 2008**). Or, les moyens de transport des souches pourraient contribuer à la contamination des cultures.
- Les conditions de conservations doivent être appliquées rigoureusement car la viabilité de MS est affectée par la température ambiante (**Pourbakhsh et al., 2010**). Nous avons transporté nos souches justement à température ambiante faute de neige carbonique.
- La présence de certains inhibiteurs entraînant des résultats faussement négatifs (**Kahya et al., 2010**).

6. Comparaison entre les résultats des trois méthodes de diagnostic

Nous avons essayé de comparer les résultats de sensibilité des méthodes de diagnostic utilisées lors de cette étude (PCR et culture par rapport à l'ARL).

Pour MG, le taux de sensibilité de la culture et de la PCR par rapport à la sérologie (100%, 45.45% respectivement) sont en accord avec ceux d'**Aimeur et al. (2010)** qui avancent un taux de 20% pour la culture et 40% pour la PCR. Cette différence dans les taux de culture peut être expliquée par le fait que nous avons utilisé des souches de MG isolées et identifiées au préalable pour le test de PCR tandis qu'**Aimeur et al.** ont isolés les mycoplasmes à partir d'échantillons de trachée.

Tayfun *et al.* (2003) rapportent un taux de sensibilité de PCR similaire à notre résultat avec 64.2% tandis que **Moscoso *et al.* (2004)** avancent le même taux de sensibilité du test de culture par rapport à la sérologie et qui est de 100%.

Pour MS, la sensibilité de la culture par rapport à la sérologie était également de 100% ce qui semble très élevé par rapport aux résultats d'**Aimeur *et al.* (2010)**.

Conclusion

D'après nos résultats, il ressort que le taux d'infection dans la wilaya de Batna est très important en comparaison dans d'autres pays comme le Niger, le Bangladesh, la Tunisie etc.

Cette forte incidence pourrait s'expliquer par le déficit dans les conditions d'élevage (opérations de désinfection, vide sanitaire, mesures d'isolement et de protection de l'élevage, d'hygiène générale et de bonne conduite d'élevage, l'excès d'ammoniac) mais aussi l'absence de vaccination (**Rosengarten *et al.*, 2000**) et de contrôles sérologiques (ARL) et bactériologiques (culture ou PCR) lors de la mise en place des troupeaux puis de façon régulière afin de s'assurer de l'absence de contamination (**Woese *et al.*, 1980**).

CONCLUSION GENERALE

Cette étude réalisée au niveau des élevages de 13 communes de la wilaya de Batna est un bon départ pour entreprendre d'autres travaux sur les mycoplasmoses aviaires afin de lever le voile sur cette affection chronique qui touche tous les différents secteurs de production avicole induisant des pertes économiques considérables.

Les objectifs que nous nous sommes tracés démontrent la grande dissémination de la mycoplasmosose aussi bien dans les élevages de poulet de chair que chez les poules pondeuses.

- Le dépistage sérologique par agglutination rapide sur lame a révélé un taux d'infection par *Mycoplasma gallisepticum* et *Mycoplasma synoviae* de 66.33% et 69.90% pour MG et MS respectivement témoignant de la forte dissémination de ces agents pathogènes dans la wilaya de Batna.

- L'infection à *Mycoplasma gallisepticum* prédomine dans les élevages avec un taux d'isolement de 23.8%. Pour *Mycoplasma synoviae*, ce taux s'est révélé moins intense avec 8.17%.

- Les poulets de chair étaient plus infectés par *Mycoplasma synoviae* avec 28 souches plutôt que les poules pondeuses avec 18 souches.

- Les résultats d'isolement des mycoplasmes à partir de différents organes (aussi bien pour MG que pour MS) appuient les résultats d'autres chercheurs quant à la fréquence d'isolement de ces germes au niveau des sacs aériens suivis de la trachée et les poumons.

- Les résultats de la PCR donnent un taux de positivité de 50% pour les souches de MG et de 0% pour les souches de MS en raison de leur contamination durant le transport.

A la lumière de ces résultats nous pouvons dégager certaines recommandations que nous pensons judicieuses afin de minimiser les dégâts économiques occasionnés par ces infections à caractère chroniques qui passent presque toujours inaperçues ou confondues avec d'autres pathologies respiratoires :

- Initier des programmes de vaccination contre *Mycoplasma gallisepticum* et *Mycoplasma synoviae* chez les reproducteurs ponte et chair pour éviter la transmission verticale de l'infection.
- Contrôler MG et MS, au niveau des frontières lors de l'introduction des poussins reproducteurs par des techniques plus sophistiquées que l'ARL à cause des réactions faussement positives qui pourraient être induites par les anticorps maternels.
- Instaurer des normes de biosécurité au niveau des fermes avicoles pour minimiser la propagation de ces infections.
- Respecter les règles de l'antibiothérapie pour ne pas aggraver la multi résistance des souches autochtones.
- Lutter, au niveau des couvoirs, contre l'implantation des souches pathogènes dans les œufs embryonnés.

REFERENCES BIBIOPHAPIQUES

1- Abdelatif, M.M.M. (1999).

Mycoplasma strains present in Baladi hatcheries in Dakhlia Governorate. Thesis for the degree of PhD in Bacteriology, Immunology and Mycology Dept. Cairo University. pp 97.

2- Abdul-Rahman, S., Al-Ankari, A., Bradbury, J.M. (1996).

Mycoplasma iowae: A review. Avian Pathology. Vol. 25, p 205-229.

3- Adler, H.E., McMartin, D.A., Ortmyer, H. (1962).

The effect of infectious bronchitis virus on chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases, Vol. 6, No. 3, p 267-274.

4- Adler, H.E. (1954).

A rapid slide agglutination test for the diagnosis of chronic respiratory disease in the field and in laboratory infected chickens and turkeys. A preliminary report: In Proceedings 91st Annual Meeting, AVMA, 346-349.

5- Adler, H.E., DaMassa, A. J., and Field, S.W. (1974).

Factors Influencing Growth of *Mycoplasma synoviae*. Avian Diseases. Vol. 18, N° 4, p 568-577.

6- Agabou, A. (2006).

Détermination du microbisme en élevage avicole. Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister en médecine vétérinaire. Université Mentouri de Constantine. 301 pages

7- Aimeur, R., Bouaziz, O., Kabouia, R., Bererhi, H. (2010).

Prévalence de *Mycoplasma gallisepticum* et de *Mycoplasma synoviae* dans les élevages avicoles de l'Est Algérien. Rev. Med. Vet. Vol. 16, N°3, p 141-145.

8- Ajufo, J.C., Whithear, K.G. (1980).

The surface layer of *Mycoplasma synoviae* as demonstrated by the negative staining technique. Res Vet Sci. Vol. 29, N°2, p268-270.

9- Aldridge, K.E. (1975).

Growth and Cytopathology of *Mycoplasma synoviae* in Chicken Embryo Cell Cultures. Infection and Immunity, Vol. 12, N°1, p 198-204.

10- Alkhalaf, A.N., Harbi, M.K.B., Alshamary, H., Hashad, M. (2009).

Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* from native, Ross and Lohmann chickens in Hail region of Saudi Arabia. Veterinary Medical Journal Giza. Vol. 57, N° 1, p 67-75.

11- Alloui, N., Kolbuszewski, T., Rokicki, E., Alloui, O. (1997).

Health state and productivity of broiler chicken depending on the temperature and altitude in Algeria. 9th International Congress in Animal Hygiene. Vol.1, p 291-294. ISAH'97, 17 - 21 August, Helsinki, Finland.

12- Alloui, N., Ayachi, A., Alloui Lombarkia, O., Zeghina, D. (2003).

Evaluation de l'effet du statut hygiénique des poulaillers sur les performances zootechniques. Cinquièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 26 et 27 mars.

13- Alloui, N., Kolbuszewski, T., Rokicki, E., Nouicer, F. (2004).

Fungal pollution in poultry houses environment of Batna region. International Congress ISAH, Animal production in Europe. St. Malo, Vol. 1, p 293.

14- Aluotto, B.B., Wittier, R.G., Williams, C.O., and Faber, J.E. (1970).

Standardized bacteriologic techniques for the characterization of Mycoplasma species. Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 20, p 35-58.

15- Amin, M.M., Jordan, F.T.W. (1978).

A comparative study of some cultural methods in the isolation of avian Mycoplasma from field material. Avian Pathology. Vol. 7, N° 4, p 455 - 470.

16- Anderson, D. P., Wolfe, R.R., Chermis, F.L., and Roper, W.E. (1968).

Influence of dust and ammonia on the development of air sac lesions in turkeys. Am. J. Vet. Res. Vol. 29, p 1049–1058.

17- Ansari, A.A., Taylor, R.F., Chang, T.S. (1983).

Application of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibody to *Mycoplasma gallisepticum* infections in poultry. Avian dis. Vol. 27, p 21-35.

18- Arbelot, B., Dayon, J.F., Mamis, D., Gueye, J.C., Tall, F., Samb, H. (1997).

Enquête sur la prevalence sérologique des principales pathologies aviaires au Senegal: mycoplasmoses, pullorose, typhose, maladie de Newcastle, maladie de Gumboro et bronchite infectieuse. Rev.Elev. Med.Vet. Pays.Trop. Vol. 50, N°3, p 197-203.

19- Barber, T. L. and J, Fabricant, J. (1971).

A Suggested Reclassification of Avian Mycoplasma serotypes. Avian Diseases. Vol. 15, N° 1, p 125-138.

20- Barua S. R., Prodhan A. M., Islam S and Chowdhury S. (2006).

Study On *Mycoplasma Gallisepticum* In Chickens In Selected Areas Of Bangladesh. Bangl. J. Vet. Med. Vol. 4, N°2, p 141–142.

21- Baruta D.A., Ardoino S.M., Marengo M.L. (2001).

A survey in infections caused by *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* in broiler chickens slaughtered in General Pico using the Slide Quick Agglutination technique. Ciencia Vet, Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam.

22 - Baseman, J.B., Tully, J.G.(1997).

Mycoplasmas; sophisticated, Reemerging, and burdened by their Notoriety. Emerging infectious diseases, Vol. 3, N° 1, p 21-32.

23- Bébéar, C. and Bouanchaud, D.H. (1997).

A review of the in-vitro activity of quinupristin/dalfopristin against intracellular pathogens and mycoplasmas. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 39, Suppl. A, p 59–62.

24- Bébéar, C. (2002).

Mycoplasmes et chlamydiae. Edition scientifique et médicale Elsevier Masson SAS.145 pages

25- Behbahen, G.G.N., Asasi, K., Afsharifar, A.R., Pourbakhch, S.A. (2005).

Isolation and detection of *Mycoplasma gallisepticum* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Iranian Journal Of Veterinary Research, University of Shiraz. Vol. 6, N° 2, p 35-41.

26- Ben abdelmoumen, B. (1996).

Caractérisation antigénique et moléculaire des mycoplasmes aviaires. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor en Microbiologie et Immunologie. Université de Montréal. pp 199.

27- Ben Abdelmoumen, B., Roy, R.S. (1995).

Antigenic relatedness between seven avian mycoplasma species as revealed by western blot analysis. Avian Dis. Vol. 39, p 250-262.

28- Ben Abdelmoumen.B, Roy, R. S., Brousseau, R. (1999).

Cloning of *Mycoplasma synoviae* genes encoding specific antigens and their use as species-specific DNA probes. J Vet Diagn Invest. Vol. 11, p 162–169.

29- Ben Abdelmoumen Mardassi, B., Ben Mohamed, R., Gueriri, L., Boughattas, S.,

Mlik, B. (2005).

Duplex PCR to differentiate between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 43, N° 2, p 948–958.

30- Bencina, D., Bradbury., J. M., Stipkovits, L., Varga, Z. , Razpet, A., Bidovec, A., Dovc, P. (2006).

Isolation of *Mycoplasma capricolum*-like strains from chickens. *Veterinary Microbiology*. Vol. 112, p 23–31.

31- Bencina, D., Mrzel, I., Tadina, T. and Dorrer, D. (1987).

Mycoplasma species in chicken flocks with different management systems. *Avian Pathology*. Vol. 16, p 599-608.

32- Bencina, D., Tadina, T., Dorrer, D. (1988).

Natural infection of ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma* egg transmission. *Avian Pathology*. Vol. 17, p 441-449.

33- Bencina, D. and Bradbury, J.M. (1992).

Combination of Immunofluorescence and Immunoperoxidase Techniques for Serotyping Mixtures of *Mycoplasma* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 30, N° 2, p 407-410.

34- Bigland, C.H. and Benson, M.L. (1968).

Mycoplasma meleagridis ("N" strain mycoplasma--PPLO): relationship of air sac lesions and isolations in day old turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Can. Vet. J.* Vol. 9, N° 6, p 138–141.

35- Blanchard A., Montagnier, L. (1994).

AIDS-associated mycoplasmas. Annu Rev Microbiol. Vol. 48, p 687-712.

36- Boguslavsky, S., Menaker, D., Lysnyansky, I., Liu, T., Levisohn, S., Rosengarten, R., Garcia, M., Yogev, D. (2000).

Molecular Characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* pvpA Gene Which Encodes a Putative Variable Cytadhesin Protein. *Infection and Immunity.* Vol. 68, N° 7, p 3956–3964.

37-Bouchardon, G. A., Reinhardt, A.K., Kobisch, M., Kempf, I. (2002).

In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Microbiology.* Vol. 88, p 47–58.

38-Bouchardon, A.V. G. et Kempf, I. (2008).

Mycoplasmoses aviaires. *Bull. Acad. Vét.* Tome 161 - N°2, p 185-190. France.

39-Boussetta M., Chaouachi N., Mlik B. (1997).

Etude sérologique et bactériologique des mycoplasmoses aviaires dans la région du Cap Bon en Tunisie. *Rev.Elèv.Med.Vet.. Pays Trop.* Vol. 50, N°2, p 93-96.

40- Boyle, J.S., Good, R.T., Morrow, C.J. (1995).

Detection of the Turkey Pathogens *Mycoplasma meleagridis* and *M. iowae* by Amplification of Genes Coding for rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 33, N° 5, p 1335–1338.

41- Bradbury, J.M. (1977).

Rapid Biochemical Tests for Characterization of the Mycoplasmatales. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 5, N° 5, p 531-534.

42- Bradbury, J.M. (1998).

Recovery of Mycoplasmas from Birds. *Mycoplasma protocols*. In *Methods in Molecular Biology*. Vol.104. Roger J. Miles, Robin Nicholas. Humana Press publishers. pp 318.

43- Bradbury, J.M., McCarthy, J.D. (1990).

Microimmunofluorescence for the serological diagnosis of avian mycoplasma infections. *Avian Pathology*. Vol. 19, p 213-222.

44- Bradbury, J.M., Abdul-Wahab, O.M.S., Yavari, C.A., Dupiellet, J.P., Bove, J.M. (1993).

Mycoplasma imitans sp. nov. is related to *Mycoplasma gallisepticum* and found in birds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Vol. 43, p 721-728.

45- Brecht, W., Feldner, J., Kahane, I. (1981).

Adherence of mycoplasmas to cells and inert surfaces: phenomena, experimental models and possible mechanisms. *Isr. J. Med. Sci.* Vol. 17, N°7, p 586-588.

46- Brown, M.B., Stoll, M.L., Scasserra, A.E., and Butcher, G.D. (1991).

Detection of Antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in Egg Yolk versus Serum Samples. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 29, N° 12, p 2901-2903.

47- Brown, D.R., Whitcomb, R.F. and Bradbury, J.M. (2007).

Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* Vol. 57, p 2703–2719.

48- Buim M.R., Mettifogo M., Timenetsky J., Kleven S. and Ferreira A.J.P. (2009).

Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesq. Vet. Bras,* Vol. 29, N°7, p 552-556.

49- Burnham, M.R., Branton, S.L., Peebles, E.D., Lott, B.D., and Gerard, P.D. (2002).

Effects of F-strain *Mycoplasma gallisepticum* Inoculation at Twelve Weeks of Age on Performance and Egg Characteristics of Commercial Egg-Laying Hens. *Poultry Science.*

Vol. 81, p 1478–1485.

50- Beard, C. W. and Anderson, D.P. (1967).

Aerosol Studies with Avian Mycoplasma. I. Survival in the Air. Avian Diseases. Vol. 11,
N° 1, p 54-59.

51- Carli, T.K. and Eyigor, A. (2003).

Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Chicken
Trachea. Avian Diseases. Vol. 47, N° 3, p 712-717.

51- Chandiramani, N.K., Van Roekeld, H. and Olesiuk, O.M. (1966).

Viability studies with *Mycoplasma gallisepticum* under different environmental conditions. Poultry
Science. Vol. 45, p 1029-1044.

52- Christensen, N.H., Yavari, C.A., McBain, A.J., Bradbury, J. (1994).

Investigation into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and
Mycoplasma iowae on materials found in the poultry house environment. Avian Pathology, Vol. 23,
p 127-143.

53- Clyde, W.A., Chanock, R.M., Tully, J.G. (1980).

mycoplasmas. In Davis.B.D., Dubecco.R., Eisen.H.N., Ginsberg.H.S.: Microbiology, 4th ed.,
J.B.Lippincott, Philadelphia, p 707-716.

54- Clyde, W.A.Jr. (1983).

Growth inhibition tests, in: Razin, S. and Tully, J.G. eds Methods in Mycoplasmaology, pp 405-410 (New York, Academic Press).

55- Colleie, F (1996).

Contribution à l'étude de l'antigénicité et de l'immunogénicité des mycoplasmes. Application à la vaccination. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 96 : 3-25.

56- Cullen, G. A., Anderton, M.F. (1974).

Comparative efficiency of some rapid agglutination antigens for *Mycoplasma gallisepticum* infection. Avian Pathology. Vol. 3, N° 2, p 89-103.

57- Daubin, V., Gouy, M., Perrière, G. (2001).

Bacterial molecular phylogeny using super tree approach. Genome informatics. Vol. 12, p 155-164.

58- Davies, R. H. et Breslin, M. (2003).

Persistence of *Salmonella Enteritidis* phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. Environmental microbiology. Vol. 5, N°2, p 79 – 84.

59- Ehtisham-ul-Haque, S., Rahman, S. U., Siddique, M. and Qureshi, A. S. (2011).

Involvement of *Mycoplasma Synoviae* in Respiratory Distress Cases of Broilers. Pak Vet J. Vol. 31(x): xxx.

60- El Groud R. (2009).

Contaminations du poulet de chair par les salmonelles non typhiques en élevages et abattoirs de la wilaya de Constantine : Caractérisations phénotypiques et génotypiques par ERIC-PCR, IS-PCR et PFGE. These En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Vétérinaires. 157 pages. Université de Constantine.

61- Ellison, J.S., Olson, L.D., and Barile, M.F. (1992).

Immunity and vaccine development. In *Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis*, J. Maniloff, R.N. McElhaney, L.R. Finch, and J.B. Baseman, Eds., Washington, DC: American Society for Microbiology, p 491–504.

62- Erno, H. and Stipkovits, L.(1973).

Bovine mycoplasmas. Cultural and biochemical studies. Acta Vet.Scand. Vol. 14, p 450-463.

63- Evans, J. D., Leigh, S. A., Branton, S. L., Collier, S. D., Pharr, G. T., and Bearson, S. M. D. (2005).

Mycoplasma gallisepticum: Current and Developing Means to Control the Avian Pathogen. J. Appl. Poult. Res. Vol.14, p 757–763.

64- Fabricant, J., and Freundt, E. A. (1967).

Importance of extension and standardization of laboratory tests for the identification and classification of mycoplasma. Am. N.Y. Acad. Sci. Vol. 143, p 50-58.

65- Frey, J. (2002).

Mycoplasmas of animals. Molecular bacteriology and pathogenicity of mycoplasmas. Kluwer Academic Publishers. 589 pages.

66- Frey, M.L., Hanson, R.P. , Anderson, D.P. (1968).

A medium for the isolation of avian mycoplasmas. Am. J. Vet. Res. Vol. 29, p 2063–2171.

67- Friend, M et Franson J. C. (1999).

Avian cholera, Tuberculosis, Salmonellosis, Chlamydiosis, Mycoplasmosis, Candidiasis, Avian pox, Newcastle disease, Avian influenza. Field Manual of Wildlife Diseases. General Field Procedures and Diseases of Birds. Edition : USGS. p 75 – 184.

68- Fritz, B.A., Thomas, C.B., Van Ess, P. and Yuill, T.M. (1991).

Comparison of a modified Edward-type medium and a modified SP4-type medium for primary isolation of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) from chickens vaccinated with the F. strain of MG. Avian Dis. vol.35, p 591-59.

69- Gaillard-Perrin, G. (1984).

Les infections mycoplasmiques aviaires. Rec.Med.Vét. Vol. 160, N°11, p 969-982.

70- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. (2004).

Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York Berlin Heidelberg. Second edition. 401 pages.

71- Gharaibh, S., Al Roussan, D. (2008).

The use of molecular techniques in isolation and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* from commercial chickens in Jordan. International Journal of Poultry Science. Vol. 7, N°1, p 28-35.

72- Goll, F. (1994).

Identification of Mycoplasmas isolated from domestic animals. In Whitford H.W., Rosenbusch R.F. Lauerman L.H: Mycoplasmosis in animals: laboratory Diagnosis, 5th ed., Iowa States University Press, Ames, p 15-27.

73- Gordon, R.F (1979).

Pathologies des volailles. Maloine S. A. Editeur. France. pp 260

74- Green, F and Hanson, R.P. (1973).

Ultrastructure and Capsule of *Mycoplasma Meleagridis*. Journal of Bacteriology. Vol. 116, N° 2, p 1011-1018.

75- Grumbles, L.C., Phillips, E., Boney, W.W., and Delaplane, J.P (1953).

Cultural and biochemical characteristics of the agent causing infectious sinusitis of turkeys and chronic respiratory disease of chickens. South Western Vet. Vol. 6, p 166-168.

76-Guard-Bouldin, J., Gast, R. K., Humphrey, T. J., HENZLER, D. J., Morales, C. et Coles, K.(2004).

Subpopulation Characteristics of Egg-Contaminating *Salmonella enterica serovar Enteritidis* as Defined by the Lipopolysaccharide O Chain. Applied And Environmental Microbiology. Vol. 70, p 2756 – 2763.

77- Gundersen, D.E., Lee, I.M., Rehner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1994).

Phylogeny of Mycoplasma-like Organisms (Phytoplasmas): a basis for their classification. Journal of Bacteriology. Vol. 176, N° 17, p 5244-5254.

78- Hannan, P.C.T., Windsor, J.D., De Jong, A., Schmeer, N., Stegemann, M. (1997).

Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic Mycoplasmas to Fluoroquinolones. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. Vol. 41, N° 9, p 2037–2040.

79- Helail, S. S .S. (1998).

Evaluation of Mycoplasma antigens used for the detection of Mycoplasma infection in chicken. Thesis presented for master degree, Cairo Univ. Egypt, pp 145.

80-Hossain K. M. M., Ali M. Y. and Haque M. I. (2007).

Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chicken in the greater rajshahi district of bangladesh. Bangl. J. Vet. Med. Vol. 5, N°1 & 2, p 09–14.

81- Hossain K. M. M., Hossain Md. T., Yamato I. (2010).

Seroprevalence of *Salmonella* and *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens in Rajshahi and Surrounding Districts of Bangladesh. Int. J.Biol. Vol. 2, N° 2, p 74-80.

82- Hudson, P, Gorton, T.S., Papazisi, L., Cecchini, K., Frasca, S., Geary, S.J. (2006).

Identification of a virulenc-associated determinant, dihydrolipoamide dehydrogenase (lpd), in *Mycoplasma gallisepticum* through in vivo screening of transposon mutants. Infection and Immunity. Vol. 74, N°2, p 931-939.

83- International Committee on Systematic Bacteriology. (1972).

Roposd for minimal standards for descriptions of new species of the order mycoplasmatales. ht. J.Systematic Bacteriol.Vol.22, p 184-188.

84- Jaffe, D., Stange-Thomann, N., Smith, C., Delcaprio, D., Fisher, S., Butler, J., Calvo, S., Elkins, T., Fitzgerald, M.G., Hafez, N., Kodira, C.D., Major, J., Wag, S., Wilkinson, J., Nicol, R., Nusbaum, C., Birren, B., Berg, H.C., and Church, G.M. (2004).

The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. Genome Res. Vol. 14, p 1447-1461.

85- Jan, G., Le Hénaff, M., Fontenelle, C., Wróblewski, H. (2001).

Biochemical and antigenic characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins P52 and P67 (pMGA). Arch Microbiol . Vol. 177, p 81–90.

86- Javed, M.A. Frasca, S.Jr., Rood.D., Cecchini, K., Gladd, M., Geary, S.J., Silbart, L.K. (2005).

Correlates of Immune Protection in Chickens Vaccinated with *Mycoplasma gallisepticum* Strain GT5 following Challenge with Pathogenic *M. gallisepticum* Strain Rlow. Infection and Immunity. Vol. 73, N° 9, p 5410–5419.

87- Jordan, F. T. W., Erno, H., Cottew, G. S., HINZ, K. H., and Stipkovits, L. (1982).

Characterization and Taxonomic Description of Five *Mycoplasma* Serovars (Serotypes) of Avian Origin and Their Elevation to Species Rank and Further Evaluation of the

Taxonomic Status of *Mycoplasma synoviae*. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 32, N° 1, p 108-115.

88- Kahya, S., Temelli, S., Eyigor, A., Carli, K.T. (2010).

Real-time PCR culture and serology for the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken breeder flocks. Vet.Microbiol. Vol. 144, N° 3-4, p 319-324.

89- Kapetanov, M., Orlić, D., Potkonjak, D., Velhner, M., Stojanov, I., Milanov, D., Stojanovic, D. (2010).

Mycoplasma in poultry flocks in the year 2009 compared to the year 2000 and significance of the control measures. Lucrări Stiințifice Medicină Veterinară. Vol. xliii (1), Timisoara, p 249-253.

90- Kelton, W. H. (1972).

Enhanced Growth of *Mycoplasma gallisepticum*, Strain 801. Avian Diseases. Vol. 16, N° 3, p 633-638.

91- Kempf, I, Cacou, P.M., Guittet, M., Ollivier, C., Morin, M., , L'hospitalier, R. et Bennejean, G. (1988).

Mycoplasmoses à *Mycoplasma gallisepticum*: réalisation d'un modèle expérimental rôle de l'ammoniac comme facteur d'exacerbation. Avian Pathology. Vol.17, p 601-616.

92- Kempf, I. (1992).

Les mycoplasmoses aviaires. Manuel des pathologies aviaires. Edition Maison Alfort. pp 381.

93- Kempf, I., Blanchard, B., Gesbert, F., Guittet, M., Bennejean, G. (1993).

The polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* detection. Avian Pathology. Vol. 22, p 739-750.

94- kempf, I. (1996)

Les mycoplasmoses aviaires. Le point vétérinaire. Vol.28, n°182, p 41-48.

95- Kempf, I., Gesbert, F., and Guittet, M. (1997).

Experimental infection of chickens with atypical *Mycoplasma gallisepticum* strain: comparison of diagnostic methods. Vet. Sci. Vol. 63, p 211–213.

96- Kempf, I. (1998).

DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. Avian Pathology. Vol. 27, p 7-14.

97- Kempf, I., Gesberta, F., Guitteta, M., Bennejeana, G., Stipkovits, L. (1994).

Evaluation of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies. Avian Pathology. Vol. 23, p 329-338.

98- Kempf, I, Cacou, P.M., Guittet, M., Ollivier, C., Morin, M., L'hospitalier, R., Bennejean, G. (1998).

Mycoplasmoses à *Mycoplasma gallisepticum*: réalisation d'un modèle expérimental rôle de l'ammoniac comme facteur d'exacerbation. Avian Pathology. Vol. 17, p 601-616.

99- Kheyar, A., Reddy, S. K., Silim, A. (1995).

The 64 kDa lipoprotein of *Mycoplasma gallisepticum* has two distinct epitopes responsible for haemagglutination and growth inhibition Avian Pathology. Vol. 24, p 55-68.

100- Kleckner, A.L. (1960).

Serotypes of avian pleuro-pneumonia-like organisms. Am. J.Vet. Res. Vol. 21, p 274-280.

101- Kleven, S.H., and Anderson, D.P. (1971).

In vitro activity of various antibiotics against *Mycoplasma synoviae*. Avian diseases. Vol. 15, N°3, p 551-557.

102- Kleven, S. H. (1975).

Antibody response to avian mycoplasmas. American Journal of Veterinary Research. Vol. 36, p 563-565.

103- Kleven, S. (1989).

Summary of discussions of avian mycoplasma team international research program on comparative mycoplasmaology babolna, Hungary October 16-20. Avian Pathology. Vol. 19, N° 4, p 795 — 800.

104- Kleven, S.H. (1994).

Avian mycoplasmoses in Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis. Blackwell Publishing. pp 173.

105- Kleven, S.H. (1998).

Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. Poultry Science. Vol. 77, p 1146–1149.

106- Kleven, S. H. (2008).

Control of Avian Mycoplasma Infections in Commercial Poultry. Avian Diseases. Vol. 52, p 367–374.

107- Kokotovic, B., Friis, N.F., Jensen, J.S., Ahrens, P. (1999).

Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of Mycoplasma species. Journal of Clinical Microbiol. Vol. 37, N° 10, p 3300–3307.

108- Lam, K.M. (2005).

Chemotaxis in *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases. Vol. 49, p 152–154.

109- Larpent, J.P., Larpent-Gourgaud, M. (1990).

Mémento technique de microbiologie. Lavoisier Tec Doc, 2^{ème} édition, pp 432.

110- Lauerman, L. H., Chilina, A. R., Closser, J. A., and Johansen, D. (1995).

Avian Mycoplasma Identification Using Polymerase Chain Reaction Amplicon and restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Avian Diseases. Vol. 39, p 804-811.

111- Lemcke, R.M. (1964).

The serological differentiation of Mycoplasma strains (pleuro-pneumonia-like organisms) from various sources. J.Hyg. Camb. Vol. 62, p 199-219.

113- Le Menec M. (1980).

Les besoins de climatisation des bâtiments avicoles. L'aviculteur, 404: 55-60.

114- Levisohn, S., Kleven, S.H. (2000).

Mycoplasmosse aviaire (*Mycoplasma gallisepticum*). Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. Vol. 19, N° 2, p 425-442.

115 – Lierz, M., Jansen, A., and Hafez, H.M. (2008).

Avian *Mycoplasma lipofaciens* Transmission to Veterinarian. Emerging Infectious Diseases. Vol. 14, N° 7, p 1161-1163.

116- Liu, T., M, Garcia, S, Levisohn, D, Yogev and S, Kleven. (2001).

Molecular variability of the adhesion-encoding Gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. J. Clin.Microbiol.Vol.39, p 1882-1888.

117- Lo, S.S, Wang, R.Y., Hayes, M.M.(1996).

Adherent and invasive Mycoplasma. United States Patent. Patent number. Vol. 5, p 534, 413.

118- Lockaby, S.B., Hoerr, E., Lauerman, L.H., and.Kleven, S.H. (1998).

Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in Broiler Chickens. Vet. Pathol. Vol. 35, p 178-190.

Luttrell, M. P., Kleven, S.H., and Davidson, W.R. (1991).

An investigation of the persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in an eastern population of wild turkeys. Journal of Wildlife Diseases. Vol. 27, N°1, p. 74-80.

MacOwan, K.J., Randall, C.J., Helen, Jones, G.R. and Brand, T.F. (1982).

Association of *Mycoplasma synoviae* with respiratory disease of broilers. Avian Pathology. Vol. 11, p 235-244.

119- Macpherson, I. (1966).

Mycoplasmas in tissue culture. J. Cell Sci. Vol. I, p 145-168.

120- Maniloff, J. (2002).

Phylogeny and evolution. In Molecular bacteriology and pathogenicity of mycoplasmas. Kluwer Academic Publishers, New York. pp 589 pages.

121- Maniloff, J., Morowitz.J. (1972).

Cell biology of the mycoplasmas. Bacteriological Reviews. Vol. 36, N°3, p 263-290.

122- Manuel terrestre de LOIE. (2008).

Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*). Chapter 2.3.5. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. p 525-541

123- Markham, F.S. and Wong, S.C. (1952).

Pleuropneumonia like organisms in the etiology of turkey sinusitis and chronic respiratory disease of chickens. Poult. Sci. Vol. 31, p 902-904.

124- Marois, C., Picault, J.P., Kempf, I. (2001).

Etude expérimentale de la transmission indirecte des mycoplasmoses aviaires. *Epidemiol. et Santé Anim.* Vol. 40, p 57-62.

125- Marois, C., Savoye, C., Kobisch, M., Kempf, I. (2002).

A reverse transcription-PCR assay to detect viable *Mycoplasma synoviae* in poultry environmental samples. *Vet.Microbiol.* Vol. 89, p 17–28.

126- Marois, C., Picault, J.P., Kobisch, M., Kempf, I. (2005).

Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. *Vet. Res.* Vol. 36, p 759–769.

127- Masover, G.K., Mischak, R.P., Hayflick, L. (1975).

Some effects of growth medium composition on the antigenicity of a T-strain *Mycoplasma*. *Infection and Immunity.* Vol. 11, N°3, p 530-539.

128- Mathengtheng, L. (2007).

Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* strains from South African poultry. Thesis for the obtention of Magister Scientiae degree In the Faculty of Natural and Agricultural Sciences. Department of Microbial, Biochemical and Food Biotechnology. University of the Free State. South Africa. pp 100.

129- May, M., Whitcomb, R.F., and Brown, D.R. (2009).

Mycoplasma and Related Organisms. In practical handbook of microbiology, Emanuel Goldman
Lorrence H. Green, Eds, Boca Raton. pp 853.

130- Meerburg, B.G. and Kiljstra, A. (2007).

Role of rodents in transmission of salmonella and campylobacter. Journal of the Science of Food
and Agriculture. Vol. 87, issue15, p 2774-2781.

131- Minion, F.C., Jarvill-taylor, K .J, Billings, L.E., and Tigges, E. (1993).

Membrane-Associated Nuclease Activities in Mycoplasmas. J.Bacteriol. Vol. 175, N° 24, p 7842-
7847.

132- Morton, H.E. and Lecce, J.G. (1953).

Selective action of thallium acetate and crystal violet for pleuropneumonialike organisms of human
origin. J Bacteriol. Vol. 66, N°6, p 646-649.

133- Moscoso, H., Thayer, S.G., Hofacre, C.L. and Kleven, S.H. (2004).

Inactivation, Storage, and PCR Detection of Mycoplasma on FTA® Filter Paper. Avian Diseases.
Vol. 48, N° 4, p 841-850.

134- Motulsky, H. (1999).

Analyzing Data with GraphPad Prism. A companion to GraphPad Prism version 3. GraphPad
Software, Inc. 42 pages.

135- Moulder, R.W., French, F.E., and Chang, C.J. (2002).

Simplified media for Spiroplasmas associated with tabanid flies. Can. J. Microbiol. Vol. 48,
p 1–6.

136- Mrázek, J. (2006)

Analysis of Distribution Indicates Diverse Functions of Simple Sequence Repeats in Mycoplasma Genomes. Mol. Biol. Evol. Vol. 23, N°7, p 1370–1385.

137- Nascimento, E.R., Pereira, V.L.A., Nascimento, M.G.F., Barreto, M.L. (2005).

Avian mycoplasmoses update. Brazilian Journal of Poultry Science. Vol. 7, N°1, p 1-9.

138- Nascimento, E.R.D., Nascimento, M.D.G.F.D., Santos, M.W.D., Dias, P.G.D.O., Resende, O.D.A., Silva, R.D.C.F. (2005).

Eradication of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* from a chicken flock by antimicrobial injections in eggs and chicks. Acta Scientiae Veterinariae. Vol. 33, N°2,
p119-124.

139- Nhu., V.T., Phan, T. P., Le Thi, T. (2003).

Investigation of Avian Mycoplasma Infection in Vietnam by Molecular Tools. Deutscher Tropentag, Göttingen. Technological and Institutional Innovations for Sustainable Rural Development.

Nougayrede, P., Toquin, D., Andral, B. & Guittet, M. (1984).

Dépistage sérologique des mycoplasmoses aviaires: agglutination rapide sur lame, inhibition de l'hémagglutination, inhibition métabolique, techniques appliquées au sérodiagnostic des infections à *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Pathology, 13, 753-768.

140- Olanrewaju, H.A., Purswell, J.L., Collier, S.D., Branton, S.L(2009).

Effects of broiler rearing environment of F-strain *Mycoplasma gallisepticum* from commercial layer hens to broiler chickens: role of acid-base balance.

Internat. J. of Poult.Sci. Vol. 8 N°2, p 145-150.

141- O'Leary, W.M.(1989).

Practical Handbook of Microbiology. CRC Press, Boca Raton. pp 853.

142- Olivier, M. (2001).

La microflore vaginale de la chienne ; synthèse bibliographique et étude spéciale de l'infection à *Mycoplasma canis*. Thèse de docteur vétérinaire, Université Claude Bernard Lyon I (Médecine-Pharmacie), pp 142.

143- Olson, N.O., Shelton, D.C., Bletner, j.k., Munro, D.A., Anderson, G.C. (1956).

Studies of infectious synovitis in chickens. Am.J.Vet. Res. Vol. 17, p 747-754.

144- Ongor, H., Kalin, R., Karahan, M., Cetinkaya, B., McAuliffe, L., and Nicholas, R.A.J. (2008).

Isolation of *Mycoplasma bovis* from broiler chickens in Turkey. Avian Pathology. Vol. 37, N° 6, p 587-588.

145- Orenstein, S.M., Levisohn, S., Geary, S.J., Yogev, D. (2003).

Cytadherence-Deficient Mutants of *Mycoplasma gallisepticum* Generated by Transposon Mutagenesis. Infection and Immunity. Vol. 71, N° 7, p 3812–3820.

146- Osman K.M., Aly M.M., Amin Z.M.S. and Hasan B.S. (2009).

Mycoplasma gallisepticum: an emerging challenge to the poultry industry in Egypt. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. Vol. 28, N°3, p 1015-1024.

147- Papanikolaou J.N. (2002).

Epidemiological investigation of Mycoplasmas, *M. gallisepticum*, *M. synoviae* and *M. meleagridis* in poultry flocks in Greece. J.Hell.Vet.Med.Soc. Vol.53, N° 4, p 297-303.

148- Pakpinyo, S., and Sasipreeyajan, J. (2007).

Molecular characterization and determination of antimicrobial resistance of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from chickens. Veterinary Microbiol. Vol. 125, Issue 1-2, p 59-65.

149- Papazisi, L., Gorton, T.S., Kutish, G., Markham, P.F., Browning, G.F., Nguyen, D.K., Swartzell, S., Madan, A., Mahairas, G. and Geary, S.J. (2003).

The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R10W. Microbiology Vol. 149, p 2307-2316.

150- Pedersen, K., Dietz, H. H., Gensen, J. C. J. R., Christensen, T. K., Bregnballe, T. et Andersen, T. H. (2003).

Pasteurella multocida from outbreaks of avian Cholera in wild and captive birds in Denmark. Journal of Wildlife Diseases. Vol. 39, N° 4, p 808–816.

151- Pilet, C., Bourdon, J.L., Oma, B., Marchal, N., Balbastre, C., Person, J.M. (1987).

Bactériologie médicale et vétérinaire, Systématique bactérienne, 2^e éd., Doin, Paris, p 353-359.

152- Polak-Vogelzang, A.A. (1977).

Survival of *Mycoplasma gallisepticum* in mains water. Avian Pathology, Vol. 6, p 93-95.

153- Poumarat, F. Perrin, B., Longcambon, D. (1991).

Identification of ruminant Mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). Vet.Microbiol. Vol. 29 (3-4), 329-338.

154- Poumarat, F., Le Grand, D., Bergonier, D. (1996).

Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique. Le point vétérinaire, Vol.28, N°180, p 13-20.

155- Pourbakhsh, S.A., Shokri, G.R., Banan, M., Elhamnia, F., Ashtari, A. (2010).

Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. Archives of Razi Institute. Vol. 65, N° 2, p 75-81.

156- Poveda. J.B. (1998).

Biochemical Characteristics in Mycoplasma Identification. In mycoplasma protocols ; Methods in Molecular Biology Volume N° 104 by Roger Miles¹, Robin Nicholas. Springer editions, London. pp318.

157- Poveda, J. B., and Robin , N. (1998).

Serological Identification of Mycoplasmas by Growth and Metabolic Inhibition Tests. In mycoplasma protocols ; Methods in Molecular Biology Volume No.: 104 by Roger Miles¹, Robin Nicholas. Springer editions, London. pp 318.

158- Poveda, J.B., Carranza, J., Miranda, A., Garrido, A., Hermoso, M., Fernandez, A. and Domenech, J. (1990).

An epizootiological study of avian mycoplasmas in southern Spain. Avian Pathology. Vol. 19, p 627-633.

159- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., and Leonard, F.C. (2002).

Veterinary microbiology and microbial disease. 2^{ème} edition. Blackwell Science, London,
pp 536.

160- Raccach, M., Rottem, S., And Razin, S. (1975).

Survival of Frozen Mycoplasmas. Applied Microbiology, Vol. 30, N° 2, p 167-171.

161- Raviv, Z. and Kleven, S.H. (2009).

The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. Avian diseases. Vol.53, N°1, p 103-107.

160- Razin, S. (1975).

Cholesterol Incorporation into Bacterial Membranes. Journal of Bacteriology. Vol. 124, N° 1, p
570-572.

162- Razin, S (1978).

Methods of mycoplasmaology. Vol I. Mycoplasma characterization. Academic press.N.Y

163- Razin, S. (1978).

The mycoplasmas. Microbiological Reviews. Vol. 42, p 414-470.

164- Razin, S. (1983).

Identification of mycoplasma colonies. In: Methods in mycoplasmaology, Academic Press of New-York. Vol. 1, p 83-88.

165- Razin, S. (1985).

Molecular Biology and Genetics of Mycoplasmas (Mollicutes). Microbiological Reviews. Vol. 49, N° 4, p 419-455.

166- Razin, S. (1992).

Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. FEMS Microbiol Lett. Vol. 79, N°1-3, p 423-31.

167- Razin, S. (1999).

Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. Biosci Rep. Vol. 19(5), p 367-72.

168- Razin, S., Herrmann, R.(2002).

Molecular bacteriology and pathogenicity of mycoplasmas. Kluwer Academic Publishers. pp589.

169- Razin, S., Oliver, O. (1961).

Morphogenesis of mycoplasma and bacterial L-form colonies. J. Gen. Microbiol. Vol. 24,

p 225-237.

170- Razin, S., Rottem, S. (1967).

Identification of Mycoplasma and Other Microorganisms by Polyacrylamide-Gel

Electrophoresis of Cell Proteins. Journal of Bacteriology. Vol. 94, N° 6, p 1807-1810.

171- Razin, S., Tully, J.G. (1970).

Cholesterol requirement of mycoplasmas. Journal of Bacteriology. Vol. 102, N° 2, p 306-310.

172- Razin, S., Yogev, D., And Naot, Y. (1998).

Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 62, No. 4, p 1094–1156.

173- Rawadi,G., and Dussurget, O. (1995).

Advances in PCR based Detection of Mycoplasmas Contaminating Cell Cultures. PCR Methods Appl. Vol. 4, p 199-208.

174- Reed, K. D., Meece, J. K., Henkel, J. S. et Shukla, S. K. (2003).

Birds, Migration and Emerging Zoonoses : West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. Clinical Medicine and Research. Vol. 1, N° 1, p 5 – 12.

175- Reinhardt, A. K., Bouchardon, G. A. V., Bruneau, M. G., Kobisch, M., Kempf, I. (2005).

Persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens after treatment with enrofloxacin without development of resistance. *Veterinary Microbiology*. Vol. 106, p 129–137.

176- Roberts, D. H., and Olesiuk, O. M. (1966).

Serological studies with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, Vol. 11, No. 1, p 104-119.

177- Roberts, D. H., Olesiuk, O. M., and Van Roekel, H. (1967).

Immunologic response of fowl to *M. gallisepticum* and its relationship to latent infection. *Am. J. V.Res.* Vol. 28, p 1135—1152.

178- Robinson, D.T., Bébéar, C. (1997).

Antibiotic susceptibilities of Mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 40, p 622-630.

179- Rochas, E.P.C., Blanchard, A. (2002).

Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of *Mycoplasma* evolution. *Nucleic Acid Research*. Vol. 30, N°9, p 2031-2042.

180- Rodríguez, G., Suzuki, K., Petruccelli, M., Trenchi, G., Giossa, G., and Trenchi, H. (2010).

Differences of seropositivity against selected infectious agents in relation to farm management characteristics to broiler production in Uruguay. *Int. J.Poult.Sci.* Vol. 9, N°3, p 221-224.

181- Rogers, M. J., Simmons, J., Walker, R. T., Weisburg, W. G., Woese, C. R., Tanner, R. S., Robinso, N. I. M., Stah, I. D.A, Olsen, G., Leach, R. H., and Maniloff, J. (1985).

Construction of the Mycoplasma evolutionary tree from 5S r RNA sequence data. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* Vol. 82, p 1160-1164.

182- Rosenbasch, R.F. (1994).

Biology and taxonomy of the mycoplasmas in Mycoplasmoses in animals: laboratory diagnosis. Blackwell Publishing, London, pp 173.

183- Rosengarten, R., Citti, C., Glew, M., Lischewski, A., Droesse, M., Much, P., Winner, F., Brank, M., Spergser, J.(2000)

Host-pathogen interactions in Mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. *Int. J. Med. Microbiol.* Vol. 290, N°1, p 15-25.

184- Ross, R.F., and Young, T. F. (1993).

The nature and detection of mycoplasmal Immunogens. *Veterinary Microbiology.* Vol. 37,

p 369-380.

185- Rottem, S., Razin, S. (1967).

Electrophoretic patterns of membrane proteins of Mycoplasma. Journal of Bacteriology, Vol. 94, N° 2, p 359-364.

186- Rottem, S. (2003)

Interaction of mycoplasmas with host cells. Physiol.Rev. Vol. 83, N°2, p 417-32.

187- Rozina, A. (2000).

Studies on the development of a vaccine using indigenous strains of *Mycoplasma gallisepticum*. Ph.D Thesis. University of Karashi, Pakistan. pp 240.

188- Sabry, M.Z. (1968).

A characterization and classification of avian Mycoplasma. Ph.D Thesis Cornell University.USA. Diss.Abst. 29 (46) : 1920B.

189- Salisch, H., Ryll, M., Hinz, K.H., and Neumann, U. (1999).

Experiences with multispecies polymerase chain reaction and specific oligonucleotide probes for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Pathology. Vol. 28, p 337- 344.

190- Santha, M., Burg, K., Rasko, I., and Stipkovits, L. (1987).

A Species-Specific DNA Probe for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum*. Infection and Immunity. Vol. 55, N°11, p 2857-2859.

191- Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., oshino, C., Horino, A., Shiba, T., Sasaki, T., and Hattori, M. (2002).

The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. Nucleic Acids Res. Vol. 30, p 5293-5300.

192- Shahd-Majid, M. (1988).

Survival and isolation of avian mycoplasmas from drinking water of infected chickens. Avian Pathology, Vol. 11, N°3, p 483-485.

193- Sharaf, E.M.F.A.A. (2004).

Bacteriological and serological studies on avian mycoplasmas in Menofia governorate (Ph.D.Thesis). Cairo University, Egypt, pp 200.

194- Sarkar S.K, Rahman M.B., Rahman M., Amin K.M.R., Khan M.F.R and Rahman M.M. (2005).

Sero-Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* Infection of Chickens in Model Breeder Poultry Farms of Bangladesh. Int. J. Poult.Sci. Vol. 4, N°1, p 32-35.

195- Senti'es-Cue', G., Shivaprasad, H. L., and Chin, R. P. (2005).

Systemic *Mycoplasma synoviae* infection in broiler chickens. Avian Pathology. Vol. 34, N°2, p 137-142.

196- Shimizu,T., Erno, H., and Nagatomo, H. (1978).

Isolation and Characterization of *Mycoplasma columbinum* and *Mycoplasma columborale*, Two New Species from Pigeons. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 28, N°4, p 538-546.

197- Sikder A.J., Islam M.A., Rahman M.M., and Rahman M.B. (2005).

Seroprevalence of *Salmonella* and *Mycoplasma gallisepticum* Infection in the Six Model Breeder Poultry Farms at Patuakhali District in Bangladesh. Int. J. Poult.Sci. Vol.4, N°11, p 905-910.

198- Stakenborg, T. (2005).

Identification of Mollicutes and characterisation of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. Dissertation for the degree of Doctor of Veterinary Science (Ph.D) at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent. Belgium. pp 200.

199- Stanbridje, E.(1971).

Mycoplasmas and cell cultures. Bacteriological Reviews, Vol. 35, N°2, p 206-227.

200- Stanley, W.A., Hofacre, C.H., Speksnjder, G., Kleven, S.H., and Agrey, S.E. (2001).

Monitoring *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in breeder chickens after treatment with enrofloxacin. Avian Dis. Vol. 145, p 534-539.

201- Stipkovits, L, EL-Ebeedy, A.A, Kisary, J and Varga, L. (1975).

Mycoplasma infection of geese I. Incidence of Mycoplasmas and Acholeplasmas in geese. Avian pathology. Vol. 4, p 35-43.

202- Stipkovits, L., Burch, D.G.S.(1997).

Evaluation of efficacy of Tiamulin in the prevention of a model Infection with *Mycoplasma gallisepticum* in chickens.proceedings of the XIth World Veterinary Poultry Association Congress, Budapest, Hungary, p 81.

203- Takase, K., Murakawa, Y., Ariyoshi, R., Eriguchi, S., Sugimura, T., Fujikawa, H. (2000).

Serological monitoring on layer farms with specific pathogen free chickens.J.Vet.Med.Sci. Vol. 62, N°12, p 1327-1329.

204- Talha AFSM (2003).

Investigation on the prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* in village chickens and possibility of establishing *Mycoplasma gallisepticum* free flocks and significance of *Mycoplasma gallisepticum* of different production parameters in layer chickens in Bangladesh. M.Sc. Thesis, the Royal

Veterinary and Agricultural University, Denmark and Bangladesh Agricultural University, Mymensing, Bangladesh.

205- Tan, C. G., Aini, I., Salim, N. B., Omar, A. R., Mutalib, A. R. (2005).

Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial and village chickens in Penang. DVM Dissertation. Universiti Putra Malaysia., pp 68.

206- Tanner, A. C., Avakian, A.P., Barnes, H. J., Ley, D. H., Migaki, T. T., Magonigle, R. A. (1993).

A Comparison of Danofloxacin and Tylosin in the Control of Induced *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Broiler Chicks. Avian Diseases. Vol. 37, N° 2, p 515-522.

207- Timms, L. M. et Cullen, G. A. (1972).

Comparative efficiency of four *M. gallisepticum* strains as antigens in detecting heterologous infection. Research in Veterinary Science. Vol. 13, p 523-528.

208- Thái T.H., Đức.N.N , Giáp N.V., Hương C.T.T. (2009).

Sero - Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chicken Ross 308 and Colour ISA Raised in Some Provinces in The North of Vietnam. Tạp chí Khoa học và Phát triển, Tập. Vol. 7, số 3, p 306 – 313.

209- Thornton, G. A. (1973).

Non-specific agglutination of *M. gallisepticum* by rheumatoid factor-like antiglobulin in chickens infected with *Streptococcus faecalis* or *Staphylococcus aureus*. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 83, p 41-47.

210- Truscott, R. B. ,and Ferguson, A. E. (1975).

Studies on the Control of *Mycoplasma gallisepticum* in hatching eggs. *Can J Comp Med*. Vol. 39, N°3, p 235–239.

211- Valks, M., Burch, D.G.S. (2002).

Comparative activity and resistance development of Tiamulin and other antimicrobials against avian *Mycoplasma*. Presentation at the World Veterinary Poultry Association, Cairo, Egypt, pp 200.

212- Villate, D. (2001).

Maladies des volailles. 2^{ème} édition, éditions France agricole, Paris 276-281.

Vlaovic, M. S. and Bigland, C. H. (1971).

The attempted immunization of turkey hens with viable *Mycoplasma meleagridis*. *Can J Comp Med* 35:338—341.

213- Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M., and Vater, J. (1997).

Antimycoplasma Properties and Application in Cell Culture of Surfactin, a Lipopeptide Antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63, N° 1, p 44–49.

214- Walker, R.L. (1999).

Mollicutes. In Hirsch D.C., Zee Y.C. : *Veterinary Microbiology*, Blackwell Science, London, pp 563.

215- Weinack, O.M., Snoeyenbos, G.H., Kleven, S.H. (1983).

Strain of *Mycoplasma synoviae* of low transmissibility. *Avian Dis*. Vol. 27, N°4, p 1151-1156.

216- Weisburg, W.G.W, Tully, J.G., Rose, D.L., petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Vanetten, J., Maniloff, J., and Woese, C.R. (1989).

A phylogenetic analysis of the mycoplasmas; Basis of their classification. *Journal of bacteriology*, P 6455-6467.

217- Winner, F., Rosengarten, R., and Citti, C. (2000).

In Vitro Cell Invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity*. Vol. 68, p 4238–4244.

218- Whitford, H.W., Rosenbusch, R.F., Lauerma, L.H. (1994).

Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis. Blackwell Publishing, London. Compilé par American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Mycoplasmosis Committee. pp 173.

219- Woese, C.R. (1987).

Bacterial evolution. Microbiological Reviews. Vol. 51, N° 2, p 221-271.

220- Woese, C. R., Maniloff, J., and Zablen, L. B. (1980).

Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 77, N° 1, p 494-498.

221- Woldehiwet, Z., Mamache, B., Rowan, T.G. (1990).

Effects of age, environmental temperature and relative humidity on the colonization of the nose and trachea of calves by Mycoplasma spp. Br Vet J. Vol. 146, N°5, p 419-424.

222- Wolf, M., Muller, T., Dandekar, T., and Pollack, J.D. (2004)

Phylogeny of Firmicutes with special reference to Mycoplasma (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 54, p 871–875.

223- Wunderwald C and Hoop R. K. (2002).

Serological monitoring of 40 Swiss fancy breed poultry flocks. Avian Pathol. Vol. 31, p 157–162.

224- Yagihashi, T., Nunoya, T., Tajima, D. (1988).

Pathogenicity or chickens of six strains of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from various birds. Avian Pathology. Vol. 17, p 725-729.

225- Yamamoto, R., Bigland, H. (1964).

Pathogenicity to Chicks of Mycoplasma Associated with Turkey Airsacculitis. Avian Diseases, Vol. 8, N° 4, p 523-531.

226- Yamamoto, R., Bigland, C.H., Ortmayer, H.B. (1965).

Characteristics of *Mycoplasma meleagridis* sp. n., isolated from turkeys. J. Bacteriol. Vol. 90, p 47-49.

227- Yoder, H. W., Drury, L. N., and Hopkins, S. R. (1977).

Influence of environment on air sacculitis: Effects of relative humidity and air temperature on broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and infectious bronchitis. Avian Dis. Vol. 21, p 195–208.

228- Yoder, H.W. (1984).

Avian mycoplasmosis. In: Barnes, H.J., B.W. Calnek, W.M.Reid, H.W. Yoder, jr. (eds). Diseases of poultry, 8th ed., Am. Assoc. Avian Pathologists, p 187-222.

229- Young, R.A., Bloom, B.R., Grosskinsky, C.M., Ivanyi, J., Thomas, D.,Davis, R.D.(1985).

Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 82, p 2583-2587.

230- Zanella, A., Martino, P.A., Pratilli, A., Stonfer, M. (1998).

Development of antibiotic resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro. Avian Pathology. Vol. 27, p 591-596.

231- Zhao, S., Yamamoto, R. (1990).

Mycoplasma iowae species-specific DNA probe. J.Vet. Diagn. Invest. Vol. 2, p 334-337.

232- Zhao, S., Yamamoto, R. (1993a).

Detection of *Mycoplasma meleagridis* by polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology. Vol. 36, p 91-97.

233- Zhao, S., Yamamoto, R. (1993b).

Amplification of *Mycoplasma iowae* using polymerase chain reaction. Avian Diseases. Vol. 37, p 212-217.

ANNEXES

Questionnaire pour l'enquête épidémiologique

Date :.....

Elevage enquêté

commune.....

- Description de l'élevage :

Type d'élevage : chair pondeuse

Mode d'élevage : cage sur sol

Taille de l'élevage :

Souche des oiseaux :

Origine des animaux :

Bande unique oui non

Nombre des bandes /an

Personne s'occupant de l'élevage ouvrier propriétaire

Personnel qualifié oui non

- Logement :

Type de litière paille copeaux
autre

Litière humide oui non

Propreté du sol bonne mauvaise

Surface /animal

Orientation des bâtiments dans le sens inverse des vents oui non

Respect de la température oui non

Respect de l'humidité oui non

- Alimentation :

Ration

Type d'alimentation industriel fabriqué à la ferme

Stockage correct de l'aliment oui non
Rations adaptées (démarrage, croissance, finition) oui non
Qualité de l'eau bonne mauvaise
Origine puits forage

• **Hygiène :**

Nettoyage oui non
Désinfection oui non
Durée du vide sanitaire respectée oui non
Lutte contre les rongeurs oui non
Devenir des cadavres enterrement incinération
décharge

• **Protection des élevages :**

Elevages de plusieurs espèces oui non
Présence de pédiluve oui non
Proximité des élevages oui non
Présence de volailles domestiques oui non
Isolement des malades oui non
Nombre des élevages dans un rayon de 2km oui non

• **Traitement médicaux et prophylaxie :**

Sous contrôle vétérinaire oui non
Protocole de vaccination oui non
Traitement des mycoplasmoses oui non

• **Description de la maladie :**

Prévalence importante faible
Période d'apparition de la maladie au cours de la production
Syndrome observé Respiratoire Articulaire Général
Mortalité importante faible

Les différents milieux utilisés pour l'isolement et l'identification

Bouillon PPLO (milieu de Frey)

Base pour pleuromoniae like organism (PPLO) sans cristal violet.....	21 gr
Acétate de thallium à 5%.....	10 ml
Sérum de cheval.....	150 ml
Extrait de levure à 25%.....	100ml
Solution de glucose à 10%.....	10 ml
Solution de pénicilline G disodique à 2.000.000 UI.....	5ml
Rouge de phénol à 0.1%.....	20ml
Nicotinamide adénine dinucleotide (NAD) à 0.2%.....	10 ml
Cystéine hydrochloride à 0.2 %.....	10 ml
Eau distillée.....	700 ml

Pour la gélose, ajouter 10grs de noble agar au milieu précédent et omettre le rouge de phénol.

Ajuster le pH du milieu à 7.8.

Milieu de glucose pour l'identification des différentes espèces de Mycoplasma (selon Erno and Stipkovits, 1973 in Hedra, 2005) modifié par Hayflich, 1965

Phénol red dextrose base à 10%.....	100 ml
Acétate de thallium à 10%.....	1 ml
Pénicilline G disodique	100,000UI
Sérum de cheval.....	10 ml

Le pH est ajusté à 7.8

Milieu d'arginine pour l'identification des différentes espèces de Mycoplasma (selon Erno and Stipkovits, 1973 in Hedia, 2005)

Phénol red dextrose base à 10%.....	100 ml
L-arginine à 10%.....	10 ml
Acétate de thallium à 10%.....	1 ml
Péni G disodique	100, 000 UI
Sérum de cheval.....	10 ml

Le pH est ajusté à 7.3

Phénol red dextrose base (selon Difco& BBL Manual, 2003): pour 1 litre

Pancreatic digest of casein.....	10grs
Sodium chloride.....	5grs
Rouge de phénol.....	18 mg
Dextrose.....	5grs

Dissoudre 20g de la poudre dans 1 L d'eau distillée. Ajouter les hydrates de Carbone (5-10 g), si désiré.
Autoclaver à 118°C pendant 15 minutes. Examiner le produit fini par des souches de contrôle

Colorant de Diènes pour identification (selon Larpent., 1990)

Bleu de méthylène.....	2.5 grs
Azur II.....	1.25 grs
Maltose.....	10 grs
Carbonate de sodium.....	0.25 grs

Eau distillée.....100ml

Filtrer.

Le rouge de phénol

0.1 de rouge de phénol (Merck) est broyé dans Na o 0.1 M (2.8 ml) puis le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. Le mélange est ensuite autoclavé à 115°C sous une pression d'une atmosphère pendant 30 mn puis conservé à 4°C.

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS

Publications et communication en relation avec la thèse

Publication internationale

HELEILI, N. MAMACHE, B. AND CHELIHI, A.

Incidence of Avian Mycoplasmosis in the region of Batna, Eastern Algeria. **Veterinary World**, 2011, Vol.4(3):101-105.

Communications

HELEILI.N., MAAMACHE.B.

Premières journées internationales de médecine vétérinaires sur les maladies émergentes et réémergentes. El Taref, 13-14 Décembre, 2009.

HELEILI.N., MAAMACHE.B.

Bacteriological study on avian mycoplasmosis by *Mycoplasma gallisepticum* in the area of Batna. Second International Conference on food safety, Hama, Syria. 19-21 april, 2010.

HELEILI.N., MAMACHE.B, AYACHI.A.

Dépistage sérologique de l'infection par *Mycoplasma gallisepticum* et *Mycoplasma synoviae* dans la région de Batna. 1^{er} symposium national des sciences avicoles. Batna, 9-11 Novembre, 2010.

الملخص العربي

تمثل الميكوبلازما مشكلة اقتصادية كبيرة في الطيور فهي تسبب التأخير في نسبة الفقس لصغار الدجاج والديك الرومي، تأخر في النمو، وزيادة كفاءة الأعلاف، ارتفاع معدل الوفيات و انخفاض في وضع البيض بنسبة 10 % في الدجاج البياض. من هنا كان لابد من ضرورة التشخيص السريع من أجل تحديد العلاج السريع.

ودفع عدم وجود بيانات على الميكوبلازما الطيور في الجزائر، وأهمية تربية الدواجن في منطقة باتنة (ولا سيما في عين توتة ومروانة) للقيام بهذه الدراسة لتحديد معدل الإصابة بعترات الميكوبلازما جاليسبتكم و الميكوبلازما سينوفي اللدان يمثلان أهم مسببات الأمراض في هذه المنطقة

لذلك فقد تضمنت النقاط الآتية:

✓ إجراء الفحوص المصلية على 548 طير لمحاولة تحديد الأجسام المضادة التلازمية فكانت 23.8% للميكوبلازما جاليسبتكم و 8.17% للميكوبلازما سينوفي.

✓ إجراء الفحوص البكتريولوجية على 563 طير من أعمار مختلفة و من 13 بلدية تنتمي إلى ولاية باتنة و ذلك لعزل عترات الميكوبلازما سينوفي و جاليسبتكم و تم فحص عينات الرئة، القصبة الهوائية، الأكياس الهوائية، و أعضاء أخرى. و قد تم تحديد نسبة العزل ب 23.8% لعترات الميكوبلازما جاليسبتكم و 8.17% للميكوبلازما سينوفي.

✓ وأظهرت العينات من مختلف الأعضاء أن الأكياس الهوائية تمثل الموقع الأمثل لعزل عترات الميكوبلازما سينوفي و جاليسبتكم

✓ لتحديد هوية 18 عترة الميكوبلازما سينوفي و 18 عترة جاليسبتكم بفحص PCR و الذي أظهر حساسية بنسبة 50 % و 0 % على التوالي.

الكلمات الدالة: ميكوبلازما جاليسبتكم، ميكوبلازما سينوفي، الدجاج اللحم، الدجاج البياض، الفحوص المصلية، إجراء الفحوص البكتريولوجية، فحص PCR

Summary

Mycoplasmosis are a major economic problem in birds. They cause delays in hatchability of chicks and poults, retarded growth, an increase of the index of consumption, mortality and declines in egg laying by 10% in laying hens. Thus, a rapid diagnosis should be made to identify patients and initiate treatment so quickly.

The absence of data on avian mycoplasmosis in Algeria and the importance of the poultry breeding in Batna encouraged us to undertake this study on the prevalence of the most pathogenic mycoplasmas in broiler and layer chickens in this area, mainly MG and MS.

For this purpose we used:

- The rapid slide agglutination test on 548 birds for the detection of the infection. The serological testing reveals a rate of infection of 83.10% with 28.3 % for MG and 8.07% for MS.*
- The bacteriological study of mycoplasmas from various samples sites; trachea, lungs, air sacs, Cloaca, choanal cleft and infra orbital sinus.*

The number of isolated Mycoplasma was 200 from 563 samples (35.52%). Mycoplasma gallisepticum was isolated in 23.8% cases. The rate of isolation for Mycoplasma synoviae, was lower with 8.17% cases.

- Samples from different organs showed that air sacs represent the best site for isolation of MG and MS.*
- Identification of 18 strains of MG and 18 strains of MS by the PCR technique showed a sensitivity of 50% for strains of MG and 0% for strains of MS.*

Key words : Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, Broiler chickens, Laying hens, Rapid Slide Agglutination test, Isolation, PCR.

Résumé

Les mycoplasmoses représentent un grand problème économique chez les oiseaux. Elles entraînent des retards d'éclosabilité des poussins et des dindonneaux, des retards de croissance, une augmentation de l'indice de consommation, des mortalités et des baisses de pontes d'œufs de 10% chez les poules pondeuses.

Pour cela, un diagnostic rapide devait être entrepris à fin d'identifier les sujets atteints et par conséquent instaurer un traitement rapide.

L'absence de données sur les mycoplasmoses aviaires en Algérie et l'importance de l'élevage avicole dans la région de Batna nous ont incités à entreprendre cette étude afin d'établir les taux d'infection par les deux mycoplasmes les plus pathogènes dans cette région à savoir MG et MS.

Pour cela, nous avons utilisé :

✓ L'agglutination rapide sur lame sur 548 oiseaux pour le dépistage de l'infection. Le dépistage sérologique a révélé un taux d'infection de 83.10% avec 28.3% pour MG et 8.07% pour MS.

✓ Une recherche bactériologique des mycoplasmes à partir de différents sites de prélèvements ; trachée, poumons, sacs aériens, cloaque, fente palatine et sinus infra orbitaire. Le nombre de mycoplasmes isolés était de 200 sur 563 prélèvements soit 35.52%. Mycoplasma gallisepticum était isolé dans 23.8% des prélèvements. Pour Mycoplasma synoviae, le taux d'isolement s'est révélé moins intense avec 8.17% cas d'isolement.

✓ Le prélèvement à partir de différents organes a montré que les sacs aériens représentent le site d'élection pour l'isolement de MG et de MS.

✓ Une identification de 18 souches de MG et 18 souches de MS par la technique de PCR qui a montré une sensibilité de 50% pour les souches de MG et 0% pour les souches de MS .

Mots clés : Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, poulet de chair, poules pondeuses, Agglutination Rapide sur Lame, isolement, PCR