

Transmission expérimentale de la péripneumonie contagieuse bovine par contact chez des zébus : étude des aspects cliniques et pathologiques de la maladie

M. Niang¹ M. Diallo¹ O. Cissé¹ M. Koné¹
M. Doucouré¹ D. LeGrand² V. Balcer³ L. Dedieu³

Mots-clés

Bovin – Péripneumonie contagieuse bovine – *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony – Infection expérimentale – Examen clinique – Immunodiagnostic – Nécropsie – Mali.

Résumé

Une reproduction expérimentale de péripneumonie contagieuse bovine (Ppcb) a été effectuée par mise en contact étroit de quatorze zébus sains avec 12 bovins N'Dama naturellement infectés, issus d'un foyer actif de Ppcb. Les zébus sains ont été obtenus de différents troupeaux indemnes de Ppcb et non vaccinés contre la maladie depuis plusieurs années. Quatre zébus témoins, n'ayant jamais été en contact avec l'agent pathogène *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony (*MmmSC*), ont été isolés. L'expérimentation a duré 12 mois pendant lesquels tous les animaux ont été suivis cliniquement et prélevés à intervalles réguliers pour les analyses sérologiques et bactériologiques. Une analyse *post mortem* a été réalisée sur tous les animaux afin de détecter des lésions caractéristiques de la Ppcb et de prélever des échantillons pour l'isolement de *MmmSC*. L'ensemble des résultats a montré l'efficacité de transmission de la Ppcb par contact. Les animaux ont été classés en trois groupes en fonction de l'intensité des signes cliniques et *post mortem*, et des résultats de laboratoire : forme aiguë avec deux morts (5/13), forme subaiguë à chronique (6/13) et forme résistante (2/13). Les animaux ayant cliniquement manifesté la maladie ont présenté des lésions nécropsiques variées (hépatisation, séquestres, liquide pleural, adhérence pulmonaire, cicatrices fibreuses, etc.) ainsi qu'une séroconversion. *MmmSC* a pu être isolé des poumons hépatisés et du contenu des séquestres. En revanche, deux animaux, classés résistants, n'ont jamais présenté de signes clinique ni sérologique. Les animaux témoins sont demeurés cliniquement sains durant toute la période d'expérimentation ; à l'autopsie aucune lésion caractéristique de la Ppcb n'a été notée et les analyses de laboratoire sont restées négatives. La présente étude confirme les observations antérieures selon lesquelles la Ppcb peut être transmise avec succès aux bovins par contact. Ces résultats permettent de définir les bases expérimentales pour de futures études telles que la caractérisation des réponses immunes et pathologiques des bovins aux différentes phases et formes de la maladie.

■ INTRODUCTION

La péripneumonie contagieuse bovine (Ppcb) est une maladie respiratoire qui constitue une menace sérieuse pour l'élevage bovin non seulement en Afrique mais aussi en Asie et en Europe du Sud (1, 10, 14, 17). La Ppcb figure sur la liste A des maladies de l'OIE en raison de sa gravité particulière et de son pouvoir de diffusion transfrontalière (6, 12, 17). Elle est causée par *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony (*MmmSC*), premier mycoplasme isolé en 1898 (16) et qui appartient au groupe « mycoides » (3).

1. Laboratoire central vétérinaire, km 8, route de Koulikoro, BP 2295, Bamako, Mali
Tél.: +223 224 33 44 ; fax : +223 224 98 09
E-mail : mamadouniang@hotmail.com

2. Ecole nationale vétérinaire de Lyon, BP 83, Marcy-L'étoile, 69280, France

3. Cirad-emvt, TA30/G, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

La Ppcb a été éradiquée de la plupart des pays développés à travers une police sanitaire rigoureuse de restriction du mouvement du bétail, d'abattage et de compensation consécutive. Malheureusement, pour des raisons socioculturelles et économiques, de telles mesures sont difficiles à appliquer dans la plupart des pays africains. En conséquence, la seule approche réaliste de contrôle de la Ppcb dans le tiers-monde, y compris les pays africains, est la vaccination massive et répétée (20, 21).

Cependant, les vaccins contre la Ppcb actuellement utilisés en Afrique, basés sur la souche T1 atténuée, présentent une efficacité modérée. En effet, l'immunité induite est de courte durée, nécessitant une revaccination annuelle coûteuse, et ne protège pas l'ensemble des animaux d'un troupeau (20, 21, 22). Le développement d'un vaccin plus efficace pour le contrôle de la maladie en Afrique est donc un réel besoin. Dans ce but, un projet international de recherche, coordonné par le Cirad, est en cours dans le cadre du 5^e programme de recherche de la Commission européenne. Pour atteindre cet objectif, certains prérequis sont à satisfaire, comme la caractérisation des réponses immunes impliquées dans la protection des animaux ainsi que l'identification des composants de l'agent pathogène induisant ces réponses.

Cependant, cet objectif est rendu difficile par l'absence de modèle d'animaux de laboratoire puisqu'en effet la Ppcb est une pathologie spécifique des bovins. Des expériences ont été réalisées chez la souris dans le passé (19). Cependant, l'absence de réactions inflammatoires, caractéristiques de la Ppcb, montre que ce modèle ne peut être adapté à cette pathologie. La validité d'une étude pathologique ou immunologique implique donc l'utilisation de l'hôte naturel et la reproduction de la maladie dans les conditions naturelles avec ses différentes formes cliniques. Une étude dynamique de la Ppcb requiert donc la mise en place d'expériences d'infection naturelle de bovins par l'agent pathogène *MmmSC*. Celles-ci peuvent être obtenues par mise en contact de bovins non infectés avec des animaux infectés issus de foyers de terrain, simulant ainsi au maximum les conditions de l'infection de terrain. Cependant, peu de cas de transmission expérimentale de Ppcb par la méthode de contact avec des animaux naturellement infectés ont été décrits (8, 13).

Dans le cadre de ce projet Inco dédié au développement d'un vaccin amélioré contre la Ppcb, le Laboratoire central vétérinaire (LCV) de Bamako, Mali, a été responsable de la réalisation d'une transmission expérimentale de la Ppcb par contact chez des zébus. Cet article présente les résultats cliniques, nécropsiques et microbiologiques de cette expérimentation.

■ MATERIEL ET METHODES

Les animaux d'expérimentation

Dix-huit zébus cliniquement sains, âgés de 3 à 6 ans, ont été obtenus à partir de plusieurs troupeaux du plateau Dogon de Bandiagara, Mali, zone relativement indemne de Ppcb, et convoyés dans les étables du LCV, Bamako. Les documents et données des services locaux de la santé animale (5) ainsi que les informations recueillies auprès des éleveurs sur place prouvent que les animaux de ces troupeaux n'avaient jamais été exposés à la Ppcb ni vaccinés contre la maladie durant les dix dernières années. Les animaux sélectionnés ne présentaient aucun anticorps contre *MmmSC* [tests d'agglutination rapide sur lame, réaction de fixation du complément (RFC) et test c-Elisa (*competitive enzyme-linked immunosorbent assay*)] (4). Ils étaient également indemnes de brucellose (test d'agglutination) et de tuberculose (test d'intradermoréaction). Ces animaux ont été placés en quarantaine, dès leur arrivée, pendant une durée de deux mois durant laquelle deux prélèvements de sang

ont été effectués pour confirmer leur statut sérologique. Les animaux ont également été traités contre diverses parasitoses et vaccinés contre la pasteurellose et le charbon symptomatique. Quatorze de ces animaux ont été placés dans le groupe « contact » et ont été bagués avec les dénominations C1 à C14. Les quatre autres animaux, constituant le groupe « témoin », ont été gardés séparément et dénommés T1 à T4.

Les animaux infectés par *MmmSC* et présentant des signes typiques de Ppcb ont été acquis dans le village de Diago N'Dagado, Kati, lors d'un foyer actif. La confirmation d'un foyer de Ppcb a été faite sur la base de l'observation des signes cliniques et *post mortem* (figure 1) et des analyses bactériologiques (isolement de *MmmSC* à partir du liquide pleural et des prélèvements de ganglions et de poumons). Douze bovins de race N'Dama ont été transportés dans les étables du LCV ; ils ont formé le groupe « infecté » et ont été bagués de I1 à I12. Toutes les dispositions légales pour le transport de ces animaux furent prises à cet effet. La RFC réalisée sur ces animaux s'est révélée fortement positive pour une grande majorité d'entre eux.



Figure 1 : lésions pulmonaires observées chez un animal du groupe « infecté », issu du foyer Diago N'Dagado-Kati. L'hépatisation du poumon gauche avec dépôt de fibrine à la surface est notable.

Protocole expérimental

Dès leur arrivée, les animaux « infectés » ont été placés en contact permanent et étroit avec les animaux sains « contact », dans une étable isolée et sécurisée, pour une transmission naturelle de l'infection. Les animaux avaient accès à la cour de l'étable dans la journée avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. La nuit, ils étaient enfermés dans un box (largeur : 8 m ; longueur : 10 m ; hauteur : 4,30 m) présentant une fenêtre grillagée (1,9 m x 2,30 m) au nord, et deux portes métalliques et grillagées (2 m x 2,38 m) au sud et à l'est permettant l'aération, destiné à favoriser le contact étroit entre

les animaux. Les animaux témoins se trouvaient dans une étable isolée et sécurisée avec également un accès libre à la nourriture et à l'eau. Tous les animaux étaient nourris avec de la paille, du son de riz, du tourteau de coton, de la mélasse et des blocs salés avec une complémentation vitaminée enrichie d'acides aminés ainsi qu'avec de l'herbe fraîche lorsque celle-ci était disponible.

Examens cliniques et post mortem

Un examen clinique quotidien de tous les animaux a été pratiqué (toux, jetage, abattement, difficultés respiratoires, anorexie et amaigrissement ont été particulièrement observés). Les mesures de température rectale et de fréquence respiratoire ont été enregistrées deux fois par semaine pendant toute la période d'expérimentation. Les animaux présentant des signes suraigus de la maladie ont été abattus.

Une autopsie complète a été pratiquée sur tous les animaux abattus durant l'expérimentation ou sacrifiés en fin d'expérimentation. Les poumons et les ganglions ont été attentivement examinés pour la recherche de lésions macroscopiques de Ppcb et les résultats enregistrés en détail. En outre, d'autres organes tels que le cœur, les reins et le tube digestif ont également été examinés en détail.

Système de notation des animaux

Dans le but de classer cliniquement les animaux, une notation basée sur la sévérité des signes cliniques (pyrexie, polypnée, toux, abattement) et la mortalité a été adoptée (tableau I) ; les animaux ont été notés et classés en se référant à l'état clinique des animaux témoins comme suit : pour la forme aiguë de 6 à 10 points, pour la forme subaiguë à chronique de 2 à 5 et pour la forme résistante de 0 à 1.

Collecte des échantillons

Deux types de prélèvements ont été effectués sur tous les animaux avec un intervalle de 1 à 2 semaines, à compter de la 7^e semaine avant la mise en contact jusqu'à 52 semaines postcontact (pc). Il s'agissait, d'une part, de lavages bronchoalvéolaires (LBA) et, d'autre part, de sang comme source de sérum.

Tableau I

Echelle de notation des animaux

Signes cliniques	Score
Pyrexie	
< 39 °C	0
39–39,5 °C	1
> 39,5 °C	2
Léthargie (abattement)	
Absente	0
Modérée	1
Sévère	2
Fréquence de toux	
Absente	0
Modérée	1
Elevée	2
Fréquence respiratoire	
< 34	0
34–40	1
> 40	2
Mort des suites de la maladie	2

La récolte des LBA a été pratiquée selon la méthode décrite par Giraud et coll. (7). Les animaux ont été immobilisés sans sédation en station debout dans un box de contention, la tête en légère extension vers le haut. Une sonde naso-œsophagienne en PVC de 11 mm de diamètre lubrifiée a été introduite dans le méat inférieur des narines et poussée doucement jusqu'au contact avec une bronche. Un réflexe de toux a signalé l'entrée de la sonde dans la bronche. Une solution stérile de Hanks à 1 p. 100 du mélange antibiotique-antimycosique (10 000 UI de pénicilline, 10 mg de streptomycine, 25 µg d'amphotéricine B et 20 ml d'eau distillée) a été préparée. De cette solution, 200 ml ont été alors introduits dans les poumons de l'animal à l'aide de seringues stériles de 60 cc, puis rapidement aspirés dans une autre seringue stérile. La récolte a été de 20-30 ml en moyenne.

Des échantillons de tissus pulmonaires, de liquide pleural, de séquestres pulmonaires et de ganglions lymphatiques ont été prélevés. Les échantillons collectés ont été placés immédiatement dans la glace, puis transportés au laboratoire. Le sang, après coagulation à température ambiante, a été centrifugé pour permettre la récolte du sérum, aliquoté et conservé à -20 °C, jusqu'à l'analyse sérologique. Les échantillons de LBA ont été immédiatement traités pour l'isolement et l'identification de *MmmSC*. De même, les échantillons de tissus pulmonaires, de liquide pleural, de séquestres pulmonaires et de ganglions ont été ensemencés immédiatement après prélèvement.

Analyses de laboratoire

Pour l'isolement de *MmmSC*, dix dilutions en série de chaque échantillon ont été faites dans le milieu de Gourel et le bouillon de cœur-cerveille (*brain heart infusion* : BHI). La confirmation de *MmmSC* a été effectuée par le test d'immunofluorescence après deux passages sur milieu solide (17). Pour confirmation ultérieure, les isolats ont été envoyés au Cirad-emvt, Montpellier, France (laboratoire mondial de référence FAO pour la Ppcb et centre de référence OIE pour la Ppcb).

L'analyse sérologique spécifique de *MmmSC* a été effectuée par la RFC et le c-Elisa suivant les protocoles livrés avec les coffrets (respectivement Cirad-emvt et Institut Pourquier, Montpellier). La RFC a été réalisée en dilutions successives à partir de 1:4 sur les échantillons de sérums décomplémentés par la chaleur (56 °C pendant 30 min). Le c-Elisa a été réalisé en dilution unique de 1:10 sur les échantillons de sérums.

■ RESULTATS

L'infection expérimentale a débuté le 8 septembre 2001. Deux semaines après, un animal contact (C10) est mort de troubles digestifs. A l'autopsie, aucune lésion caractéristique de la Ppcb n'a été observée et les analyses de laboratoire ont été négatives. Ainsi, les résultats du présent article ont concerné les données relatives aux 13 animaux contacts restants, aux 4 animaux témoins et aux 12 animaux infectés dont 10 ont été abattus en cours d'expérimentation.

Données cliniques

Animaux témoins

Tous les animaux témoins sont restés cliniquement sains pendant la durée entière de l'expérimentation.

Animaux contacts

Les premiers signes cliniques évidents de la maladie ont été observés chez C4 (51 jours pc) et se sont poursuivis chronologiquement

chez C9 (56 jours pc), C13 (62 jours pc), C11 (66 jours pc), C8 (67 jours pc), C12 (69 jours pc), C14 (95 jours pc), C3 (104 jours pc), C5 (144 jours pc), C7 (160 jours) et C6 (197 jours). Selon la sévérité des signes cliniques, les animaux ont été classés dans trois groupes (tableaux II et III) :

– forme aiguë, cinq animaux dont deux morts (5/13, soit 38,46 p. 100), C3, C8, C9, C12 et C14 ;

– forme subaiguë à chronique, six animaux (6/13, soit 30,76 p. 100), C4, C5, C6, C7, C11 et C13 ;

– forme résistante, deux animaux (2/13, soit 15,38 p. 100), C1 et C2.

Dans la forme aiguë, les animaux affectés ont toussé fréquemment ; cependant, la toux humide typique de la Ppcb n'a pas été un trait marqué. Les animaux ont été très déprimés et ont montré des signes de respiration abdominale, prostration avec légère extension du cou, anorexie, larmolement et amaigrissement rapide. Quoique le jetage ait été fréquent et abondant, le mucus n'a pas été purulent. Le plus souvent, une salive limpide coulait de la bouche, mais

Tableau II

Classification clinique des animaux des groupes « contact » et « témoin » sur la base de l'échelle de notation des signes cliniques

N° animal	Pyrexie	Fréquence respiratoire	Toux	Léthargie	Mort des suites de la maladie	Score total	Classification
T1	0	0	0	0	0	0	Témoin
T2	0	0	0	0	0	0	Témoin
T3	0	0	0	0	0	0	Témoin
T4	0	0	0	0	0	0	Témoin
C1	1	0	0	0	0	1	Résistante
C2	0	0	0	0	0	0	Résistante
C3	2	2	2	2	0	8	Aiguë
C4	1	1	1	1	0	4	Subaiguë à chronique
C5	2	0	1	1	0	4	Subaiguë à chronique
C6	1	0	1	1	0	3	Subaiguë à chronique
C7	1	1	1	1	0	4	Subaiguë à chronique
C8	2	1	2	2	0	7	Aiguë
C9	2	2	2	2	0	8	Aiguë
C11	1	0	2	1	0	4	Subaiguë à chronique
C12	2	1	1	2	2	8	Aiguë
C13	1	0	1	1	0	3	Subaiguë à chronique
C14	2	1	1	2	2	8	Aiguë

Tableau III

Récapitulatif des signes cliniques, des lésions autopsiques et de l'isolement de *MmmSC* chez les animaux du groupe « contact »

N° animal	Maladie clinique			Lésions autopsiques		Isolement de <i>MmmSC</i>
	Début de la maladie	Durée	Forme clinique	Stade	Dimensions approximatives (cm)	
C1	–	–	–	–	–	Négatif
C2	–	–	–	–	–	Négatif
C3	21/12/01	268	Aiguë	Séquestres	5 x 10	Positif
C4	29/10/01	320	Subaiguë à chronique	Cicatrice fibreuse	–	Négatif
C5	30/01/02	227	Subaiguë à chronique	Séquestres	0,5 x 1	Négatif
C6	07/03/01	190	Subaiguë à chronique	Séquestres	3 x 5	Positif
C7	15/02/02	211	Subaiguë à chronique	Séquestres	1 x 2	Négatif
C8	14/11/01	22	Aiguë	Cicatrice fibreuse	–	Négatif
C9	03/11/01	314	Aiguë	Séquestres	3 x 10	Négatif
C11	13/11/01	305	Subaiguë à chronique	Séquestres	2 x 2	Positif
C12	16/11/01	110	Aiguë	Hépatisation	Majeure partie du poumon	Positif
C13	09/11/01	310	Subaiguë à chronique	Cicatrice fibreuse	–	Négatif
C14	04/01/02	10	Aiguë	Hépatisation	Majeure partie du poumon	Positif

elle n'était pas mousseuse. A l'auscultation, la fréquence respiratoire a été accélérée (34-44/min). De plus, il a été observé chez certains animaux un œdème sous-cutané diffus le long du fanon et de la trachée, qui s'étendait vers les côtes. Un autre trait marqué des signes cliniques observés durant l'expérimentation a été le ballonnement. Les températures rectales enregistrées ont varié autour de 40 °C avec une tendance à l'augmentation avant la mort, survenant peu après l'expression des signes cliniques. Le début de la maladie a été brusque et le rétablissement, avec récurrence occasionnelle des symptômes, a été observé chez la majorité des animaux (trois sur cinq) approximativement après une à deux semaines d'épisodes cliniques.

Les signes cliniques de la forme subaiguë à chronique ont été similaires à ceux décrits précédemment mais de manifestation plus modérée. Il n'a pas été enregistré de mortalité, et la fièvre, lorsque présente, a été intermittente. Le début de la maladie a été lent et les signes se sont maintenus jusqu'à deux mois et plus. La dyspnée n'a pas toujours été évidente. Dans les cas chroniques, les animaux ont présenté une hyperthermie subfébrile allant de 39 à 39,5 °C. Les autres signes de la maladie tels que la toux et le jetage n'ont pas été certains, tandis que l'émaciation a été visible parfois.

Dans le groupe de la forme résistante, les animaux résistant donc à l'infection n'ont présenté aucun signe clinique durant toute la période expérimentale et ont gagné d'ailleurs du poids avec le temps. Leur état a été comparable à celui des témoins.

Animaux infectés

Aucun classement de ces animaux n'a été effectué à cause de l'absence de données sur l'historique de l'infection dans ce groupe. Cependant, la plupart des animaux ont présenté les mêmes signes cliniques que les contacts classés dans la forme aiguë. Durant les cent premiers jours de l'expérimentation, huit de ces animaux ont nécessité un abattage.

Réponses sérologiques

Durant toute la période expérimentale, aucun des animaux témoins n'a développé de titres d'anticorps contre la Ppcb, ni en c-Elisa ni en RFC. Il en a été de même pour les deux animaux classés résistants (C1 et C2) parmi les 13 animaux contacts. Les onze animaux restants, ayant eu des signes cliniques et *post mortem* évidents, ont tous présenté une séroconversion observée aussi bien en RFC qu'en c-Elisa, à différentes périodes de l'expérimentation. En effet, selon les animaux, la séroconversion a été observée avant ou après l'apparition des signes cliniques évidents de Ppcb. Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie entre les titres d'anticorps et la sévérité des signes cliniques ou les types de lésions nécropsiques observées.

Dans le cas des animaux infectés, les tests sérologiques étaient déjà positifs au moment de leur acquisition pour la majorité d'entre eux. Même si la plupart d'entre eux ont du être abattus rapidement pendant la période expérimentale, les titres d'anticorps sont restés significatifs chez ces animaux.

Données autopsiques

L'analyse *post mortem* a été effectuée sur chaque animal abattu durant l'expérimentation avec un examen immédiat des lésions après éviscération. Il en a été de même lorsque tous les animaux survivants, 11 contacts, deux infectés, ainsi que les témoins, ont été abattus 367 jours après la mise en contact. Les données de l'autopsie ont été soigneusement notées en détail et sont présentées dans le tableau III.

Animaux témoins

Aucune lésion caractéristique de Ppcb n'a été observée à l'autopsie chez ces animaux.

Animaux contacts

Les lésions autopsiques ont été classées en trois groupes : aigu, chronique et négatif. Des lésions aiguës ont été observées chez les deux animaux (C12, C14) morts pendant l'expérimentation avec des signes évidents de la maladie. Ces lésions ont consisté en une quantité abondante de liquide pleural dans la cavité thoracique (figure 2). De même, les poumons affectés ont été en état de consolidation rouge (figure 3) avec adhésions. Les lésions ont été unilatérales dans leur distribution. Des dépôts de fibrine ont été présents à la surface des poumons. A la section, les poumons ont dégagé une quantité importante de liquide séreux avec un épaississement interlobulaire prononcé et un aspect marbré. De plus, les ganglions pulmonaires ont été en général hypertrophiés et congestionnés.

Des lésions chroniques ont été observées chez neuf animaux (C3 à C9, C11 et C13), dont six avec des séquestres pulmonaires visibles (C3, C5, C6, C7, C9 et C11) et trois avec des cicatrices fibreuses, témoins de lésions pulmonaires résorbées. Les dimensions des séquestres ont varié de 1 à 10 cm en diamètre (figure 4).

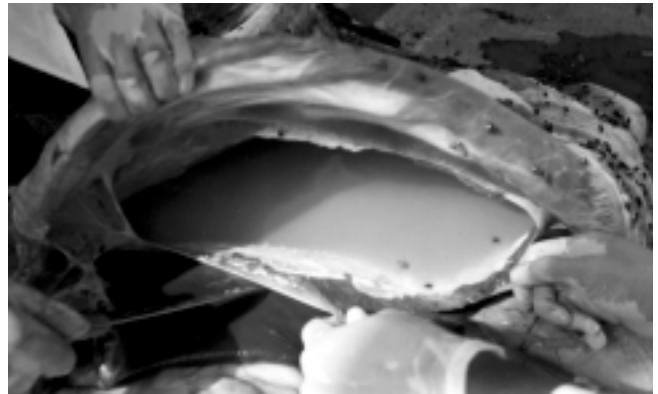


Figure 2 : forme aiguë de péripneumonie contagieuse bovine observée chez l'animal C14 du groupe « contact ». L'accumulation d'une quantité abondante de liquide pleural dans la cavité thoracique est notoire.

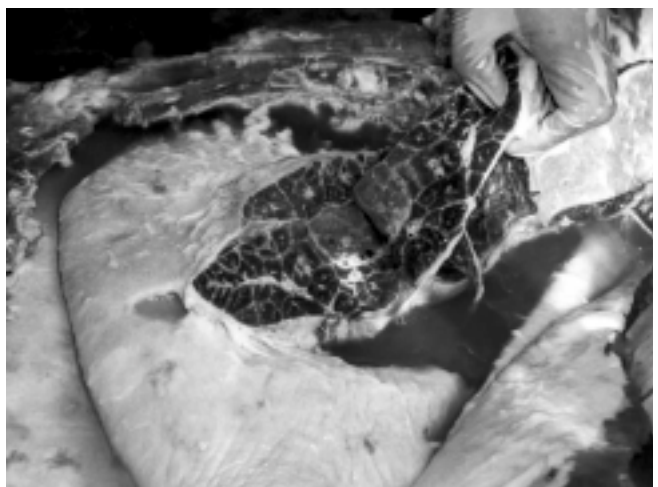


Figure 3 : section d'un poumon effectuée chez l'animal C14 du groupe « contact » atteint de péripneumonie contagieuse bovine dans sa forme aiguë. L'aspect marbré du poumon est remarquable.

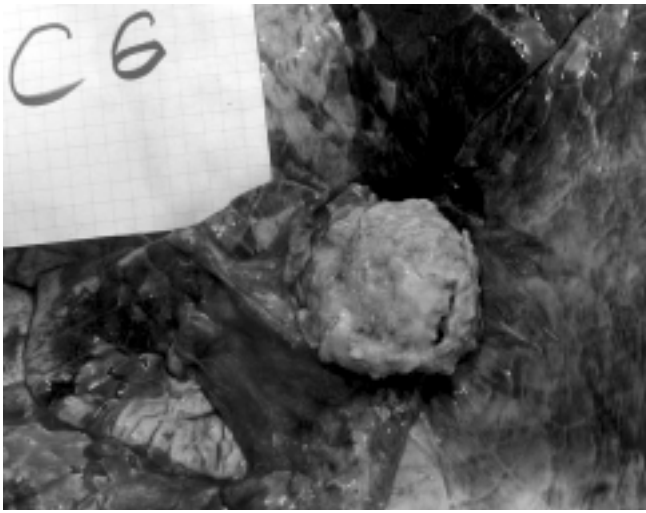


Figure 4 : lésions chroniques avec séquestre observées chez l'animal C6 du groupe « contact ».

La présence de séquestre multiple n'a été observée chez aucun animal. Dans la plupart des cas, la présence de séquestres s'est accompagnée d'adhésions pleurales. A l'incision des séquestres, le contenu nécrotique s'est déversé aisément en laissant une paroi dure. Dans certains cas, les ganglions lymphatiques ont été impliqués et ont montré des foyers nécrotiques à l'incision.

D'autres lésions accessoires notées dans les poumons ont été principalement relatives aux corps étrangers (paille) dans les bronches chez deux animaux contacts (C3, C7). Dans ces cas, la congestion était la lésion essentielle. A la section, les lobules ont présenté des hémorragies avec présence de caillots sanguins dans les vaisseaux.

Aucune lésion nécropsique n'a été détectée chez les deux animaux C1 et C2 qui sont restés cliniquement sains durant toute l'expérimentation et dont les poumons avaient le même aspect que les témoins.

Animaux infectés

Parmi ces animaux, deux ont présenté des lésions aiguës (I1, I2) et les dix autres des lésions chroniques (I3 à I12). Parmi ces derniers, six ont eu des séquestres visibles (I4, I5, I6, I8, I10, I11) dont certains étaient liquéfiés. La taille moyenne des séquestres a été d'environ 15 x 20 cm, avec des cas où plus de la moitié du poumon atteint était concernée. La présence de séquestre multiple visible a été observée chez un animal seulement (I6). Quatre des animaux infectés ont présenté des lésions résorbées sous forme de cicatrices fibreuses (I3, I7, I9, I12). Parmi ces derniers, I9 et I12 ont survécu jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Isolement de MmmSC

Comme indiqué dans le tableau III, MmmSC a été isolé des échantillons prélevés *post mortem* sur les deux animaux du groupe contact, morts en cours d'expérimentation (C12 et C14) ainsi qu'à partir des séquestres issus des poumons de trois autres animaux contacts (C3, C6, C11) et de quatre infectés (I1, I2, I6, I11 ; résultats non présentés). En revanche, les tentatives d'isolement de MmmSC à partir des LBA sont restées vaines.

■ DISCUSSION

La présente expérimentation a eu pour but la transmission expérimentale de la Ppcb chez les zébus par contact avec des animaux naturellement infectés. L'objectif a été d'offrir une base expérimentale pour une étude dynamique de la Ppcb transmise par voie

respiratoire naturelle à son hôte spécifique, le bovin. La mise au point de cette expérimentation va ouvrir la voie à de nombreuses études de la maladie en fonction des différentes formes cliniques. En effet, elle va permettre la collecte de données cliniques, sérologiques et autopsiques, d'une part, ainsi que celle d'échantillons cellulaires pour la caractérisation des réponses immunitaires en vue du développement de nouveaux vaccins. Jusqu'à présent, les rares expériences réussies de transmission expérimentale de Ppcb par contact reposaient sur l'utilisation d'animaux infectés, non pas naturellement, mais par intubation avec des souches virulentes (9, 17, 21). L'originalité de la présente étude tient au fait que les animaux « transmetteurs » de l'infection étaient des animaux naturellement infectés issus de foyers actifs de Ppcb. Cette technique, beaucoup plus proche de l'infection naturelle est, d'après les auteurs, mieux adaptée à l'étude de cette pathologie et des réponses immunitaires induites par l'agent pathogène.

Cet article a présenté les résultats cliniques, autopsiques et microbiologiques de l'expérimentation. Les résultats de l'analyse des réponses immunitaires feront l'objet d'une communication ultérieure.

Un bilan global de cette transmission expérimentale de Ppcb atteste de l'efficacité du présent protocole. En effet, 84,6 p. 100 (11/13) des animaux du groupe contact, soumis à cette pression d'infection, ont effectivement contracté la Ppcb et développé différentes formes cliniques. Le statut des deux animaux restants (C1 et C2) a été difficile à déterminer puisque aucun paramètre n'a permis d'affirmer l'infection. Cependant, la résistance à cette maladie a déjà été décrite et évaluée, au sein d'un troupeau, à 20–25 p. 100 des cas (11, 17). Il ne peut donc être exclu que ces deux animaux aient été totalement résistants à la maladie.

Selon les données disponibles dans la littérature, la période d'incubation dans l'infection naturelle, bien que mal définie, varie de 29 à 58 jours (2) et de 20 à 113 jours dans l'infection expérimentale chez les bovins sains mis en contact avec des animaux infectés par intubation (17). En fait, cette information est très difficile à déterminer puisqu'elle suppose de connaître la date exacte à laquelle les animaux ont été infectés, c'est-à-dire en contact avec MmmSC ; or cette donnée était inconnue dans la présente expérimentation. La seule observation analysable était donc le délai entre la mise en contact des animaux et l'apparition des premiers signes cliniques. Dans cette expérience, ce délai s'est étendu de 51 à 197 jours. Ce long délai pouvait s'expliquer par le fait que pendant les cent premiers jours de l'expérimentation les deux tiers des animaux du groupe infecté étaient déjà morts, ce qui a certainement conduit à une réduction considérable de la pression d'infection. Une autre possibilité pouvait être une plus faible pathogénicité de la souche de MmmSC.

L'analyse des données *post mortem* a montré une bonne corrélation avec les signes cliniques observés et donc avec la classification des animaux. En effet, tous les animaux ayant présenté des signes cliniques de Ppcb ont eu également en parallèle des signes *post mortem* caractéristiques de cette maladie. De plus, les lésions de type hépatisation n'ont été observées que chez les animaux avec la forme aiguë ayant entraîné la mort. En revanche, tous les autres animaux ayant guéri de l'infection étaient caractérisés par la présence de séquestres ou de simples cicatrices. Cependant, certains symptômes classiques tels que la toux humide, la décharge nasale mucopurulente, l'extension prononcée du cou et la salive mousseuse aux commissures de la bouche ont été absents, même chez les animaux morts de la maladie et chez lesquels les lésions aiguës typiques ont été observées à l'autopsie. L'explication pourrait être aussi la diminution rapide du nombre d'animaux du groupe infecté ou la virulence de la souche. Ces observations étaient prévisibles

dans la mesure où il est communément reconnu que la transmission de la Ppcb par contact est difficile à accomplir et que les difficultés dans la reproduction expérimentale du tableau clinique complet de l'infection naturelle sont également bien connues (15).

L'expression des formes cliniques de la maladie notées dans cette expérience s'accorde avec les observations faites par d'autres auteurs lors d'études sur la maladie naturelle (15, 17, 18). En effet, au sein des 13 animaux du groupe contact, 38,46 p. 100 ont développé la forme aiguë de la maladie, 46,15 p. 100 la forme subaiguë à chronique et 15,38 p. 100 la forme résistante. Ces pourcentages sont très proches de ceux décrits par Provost et coll. (17). Le modèle de classification proposé par Hudson et Turner (9) reste sans doute la référence classique pour ce type d'expérimentation animale. Cependant, il n'a pas été applicable à la présente étude. En effet, l'objectif final de cette étude a été la récolte d'échantillons pour une caractérisation des réponses immunitaires induites par *MmmSC*. Dans ce but les animaux expérimentaux ont été maintenus le plus longtemps possible. L'abattage des animaux n'a été prévu que dans les cas extrêmes, c'est-à-dire lorsque le malade déclarait des signes d'agonie. L'échelle de notation décrite dans la présente étude peut donc être considérée comme une méthode fiable en vue de déterminer les différentes formes cliniques de la maladie. Cette classification sera très utile pour les études ultérieures, telles que celle prévue sur l'analyse immunitaire des réponses induites chez les zébus lors de l'infection par *MmmSC*. En effet, elle permettra d'établir une corrélation claire entre forme clinique de la Ppcb et type de réponse immunitaire. Cela conduira ainsi à une caractérisation des paramètres immunitaires liés soit à la protection (guérison de l'animal) soit à la pathologie (mort de l'animal).

Il est à noter qu'aucune différence significative dans les signes cliniques de la maladie n'a été constatée entre les animaux des groupes contact et infecté. En revanche, l'analyse *post mortem* a révélé une nette différence entre ces deux groupes d'animaux. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les deux groupes étaient d'espèces différentes, bovins N'dama (groupe infecté) et zébus Peuhls (groupe contact). Si une réceptivité égale est décrite théoriquement pour ces deux espèces, de fortes différences de sensibilité caractérisent les diverses races (17).

Les analyses microbiologiques ont montré la présence de *MmmSC* dans quelques échantillons tissulaires récoltés *post mortem* à partir d'animaux ayant développé une forme aiguë mais également à partir d'animaux ayant présenté une forme subaiguë (tableau III). En revanche, aucun isolement par culture n'a pu être effectué à partir des LBA, que ce fût chez les animaux du groupe contact ou infecté. Cet échec d'isolement pourrait être expliqué par la présence d'antibiotiques dans la solution de Hanks servant à réaliser les LBA qui auraient pu réduire le titre de mycoplasmes avant la culture.

L'analyse sérologique, réalisée par la RFC et la technique c-Elisa, a mis en évidence une séroconversion spécifique de *MmmSC* chez tous les animaux du groupe contact ayant présenté des indicateurs évidents de la maladie. Cependant, les titres en anticorps anti-*MmmSC* n'ont présenté aucune corrélation avec la sévérité clinique de la maladie ou les lésions nécropsiques observées. Ces observations sont conformes à celles faites par d'autres chercheurs (2). En revanche, aucune réponse sérologique n'a été observée chez les animaux C1 et C2 durant tout le processus d'expérimentation. Ce résultat corrèle avec le statut clinique et *post mortem* de ces animaux, classés comme résistant à l'infection par *MmmSC*. Toutefois, il ne permet pas d'affirmer que ces animaux ont bien été infectés. Cependant, compte tenu de l'efficacité de transmission de l'infection par *MmmSC* observée dans la présente expérience, il semble probable que ces deux animaux aient bien été également soumis à la pression d'infection et aient donc eu effectivement un

contact avec *MmmSC*. Il ne peut donc être exclu que ces animaux puissent être réellement résistants à la maladie.

■ CONCLUSION

La présente étude a montré la faisabilité d'une transmission expérimentale de la Ppcb par contact étroit entre animaux sains et animaux naturellement infectés. Une bonne reproduction des différentes formes cliniques de la maladie a bien été obtenue. Le système de notation clinique élaboré s'est montré efficace dans la classification des animaux malades. Cette expérience réussie pourra donc servir de base expérimentale pour les études futures et notamment pour l'analyse des paramètres immunologiques et pathologiques caractérisant les différentes phases et formes de la Ppcb.

Remerciements

Les auteurs remercient les Drs F. Thiaucourt et R. S. Windsor pour avoir accepté de réviser le manuscrit. Ce travail a été financé par le projet Inco ICA4-CT-2000-30015 (Development of an improved vaccine against contagious bovine pleuropneumonia) du 5^e Programme-cadre 1998-2002 de la Commission européenne.

BIBLIOGRAPHIE

1. BELLI P., POUMARAT F., PERRIN M., LONGCHAMBON D., MARTEL J.L., 1989. Reproduction expérimentale et évolution de la péripneumonie contagieuse bovine dans un groupe de bovins et de caprins: aspects anatomocliniques. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **42** : 349-356.
2. BYGRAVE A.C., MOULTON J.E., SHIFRINE M., 1968. Clinical, serological and pathological findings in an outbreak of contagious bovine pleuropneumonia. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **16**: 21-46.
3. COTTEW G.S., BREARD A., DAMASSA A.J., ERNO H., LEACH R.H., LEFEVRE P.C., RODWELL A.W., SMITH G.R., 1987. Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Isr. J. med. Sci.*, **23**: 632-635.
4. DEDIEU L., BREARD A., LE GOFF C., LEFEVRE P.C., 1996. Diagnostic de la péripneumonie contagieuse bovine : problèmes et nouveaux développements. *Revue sci. tech. Off. int. Epizoot.*, **15** : 1331-1353.
5. DRAMR, 1993-2000. Rapports annuels. Mopti, Mali, Direction régionale de l'appui au monde rural.
6. EGWU G.O., NICHOLAS R.A.J., AMEH J.A., BASHIRUDDIN J.B., 1996. Contagious bovine pleuropneumonia: an update. *Vet. Bull.*, **66**: 875-888.
7. GIRAUD N., ARCANGIOLI M.A., LE GRAND D., 2002. Le lavage broncho-alvéolaire par voie naso-trachéale chez les bovins. *Bull. GTV*, **13** : 83-85.
8. GOURLAY R.N., HOWARD C.J., 1983. Respiratory mycoplasmosis. *Adv. vet. Sci. comp. Med.*, **26**: 289-332.
9. HUDSON J.R., TURNER A.W., 1963. Contagious bovine pleuropneumonia: a comparison of the efficacy of two types of vaccine. *Aust. vet. J.*, **39**: 373-385.
10. IEMVT, 1985. Mycoplasmes et mycoplasmoses des petits ruminants. Documents techniques. Maisons-Alfort, France, Cirad-Iemvt, p. 82.
11. IEMVT, 1992. La péripneumonie contagieuse bovine. Fiches techniques d'élevage tropical. Maisons-Alfort, France, Cirad-Iemvt, Paris, France, ministère de la Coopération et du Développement. (Fiche n° 4)
12. LEFEVRE P.C., 2000. Contagious bovine pleuropneumonia. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris, France, OIE, p. 123-133.
13. LLYOD L.C., ETHERIDGE J.R., 1983. Contagious bovine pleuropneumonia produced by aerosol artificially generated from cultures of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Br. vet. J.*, **139**: 330-337.
14. LORENZON S., ARZUL I., PEYRAUD A., HENDRIKX P., THIAUCOURT F., 2003. Molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia by multilocus sequence analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* biotype SC strains. *Vet. Microbiol.*, **93**: 319-333.

15. MASIGA W.N., DOMENECH J., WINDSOR R.S., 1996. Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Revue sci. tech. Off. int. Epizoot.*, **15**: 1283-1308.
16. NOCARD E., ROUX E., 1898. Le microbe de la péripneumonie. *Ann. Inst. Pasteur*, **12** : 240-262.
17. PROVOST A., PERREAU P., BREARD A., LE GOFF C., MARTEL J.L., COTTEW G.S., 1987. Contagious bovine pleuropneumonia. *Revue sci. tech. Off. int. Epizoot.*, **6**: 625-679.
18. SCHNEIDER H.P., VAN DER LUGT J.J., HUBSCHLE O.J.B., 1994. Contagious bovine pleuropneumonia. In: Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustin R.C. Eds, Infectious diseases of livestock, Vol. 2. Oxford, UK, Oxford University Press.
19. SMITH G.R., 1968. Factor affecting bacteremia in mice inoculated with *Mycoplasma mycoides*. *J. comp. Pathol.*, **78**: 267.

20. SYLLA D., LITAMOI J., RWEYEMAMU M.M., 1995. Stratégies de vaccination contre la péripneumonie contagieuse bovine en Afrique. *Revue sci. tech. Off. int. Epizoot.*, **14**: 577-592.
21. TULASNE J.J., LITAMOI J.K., MOREIN B., DEDIEU L., PALYA V.J., YAMI M., 1996. Contagious bovine pleuropneumonia vaccines: the current situation and the need for improvement. *Revue sci. tech. Off. int. Epizoot.*, **15**: 1373-1396.
22. YAYA A., GOLSIA R., HAMADOU B., AMARO A., THIAUCOURT F., 1999. Essai comparatif d'efficacité des deux souches vaccinales T1/44 et T1sr contre la péripneumonie contagieuse bovine. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **52** : 171-179.

Reçu le 17.12.2003, accepté le 23.11.2004

Summary

Niang M., Diallo M., Cissé O., Koné M., Doucouré M., LeGrand D., Balcer V., Dedieu L. Contagious Bovine Pleuropneumonia Experimental Transmission in Zebu Cattle by Contact: Study of Clinical and Pathological Aspects of the Disease

The experimental transmission of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) was carried out by putting into close contact 14 naive zebu cattle with 12 naturally infected N'Dama cattle taken from a CBPP field outbreak. The healthy zebus originated from various CBPP-free herds and had not been vaccinated against CBPP in the past several years. Four control animals who had never been in contact with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony (*MmmSC*) were housed separately. The experiment lasted 12 months. All animals were monitored for clinical signs and regularly sampled for serological and bacteriological analyses. Postmortem analyses were performed on all animals to assess the presence of CBPP gross lesions and to take samples for *MmmSC* isolation. The results showed the efficacy of CBPP transmission by contact. Animals were assigned to three groups according to clinical, postmortem, and laboratory findings, as follows: acute form including two deaths (5/13), subacute to chronic form (6/13), and resistant form (2/13). Animals with obvious clinical signs of the disease showed various lung lesions at necropsy (hepatization, sequestra, pleural fluid, lung adhesions, fibrotic scars, etc.) as well as seroconversion. *MmmSC* was isolated from hepatized lungs and sequestral contents. In contrast, the two animals with a resistant form never presented any clinical nor any serological signs. The control animals remained clinically healthy throughout the experiment; at necropsy, no CBPP-characteristic lesion was noted and laboratory analyses remained negative. This study confirmed previous observations that showed that CBPP infection can be successfully transmitted to cattle by contact, and it could provide an experimental basis for future research such as the characterization of the host immune and pathological responses at various stages of the disease.

Key words: Cattle – Contagious bovine pleuropneumonia – *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony – Experimental infection – Clinical examination – Immunodiagnosis – Postmortem examination – Mali.

Resumen

Niang M., Diallo M., Cissé O., Koné M., Doucouré M., LeGrand D., Balcer V., Dedieu L. Transmisión experimental de la perineumonía contagiosa bovina mediante contacto en los cebúes: estudio de los aspectos clínicos y patológicos de la enfermedad

Se llevó a cabo una reproducción experimental de la perineumonía contagiosa bovina (Ppcb), mediante el contacto estrecho de catorce cebúes sanos con 12 bovinos N'Dama infectados de forma natural, provenientes de un foco activo de Ppcb. Los cebúes sanos provenían de diferentes hatos indemnes de Ppcb y no vacunados contra la enfermedad desde hace varios años. Se aislaron cuatro cebúes testigo, sin contacto previo con el agente patógeno *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony (*MmmSC*). El experimento duró 12 meses, durante los cuales todos los animales fueron seguidos clínicamente y muestras obtenidas a intervalos regulares para análisis serológicos y bacteriológicos. Un análisis *post mortem* se llevó a cabo en todos los animales con el fin de detectar las lesiones características de la Ppcb y de tomar muestras para el aislamiento de *MmmSC*. El conjunto de los resultados mostró la eficacia de la transmisión de la Ppcb por contacto. Los animales se clasificaron en tres grupos en función de la intensidad de los signos clínicos y *post mortem* y de los resultados de laboratorio: forma aguda con dos muertos (5/13), forma sub aguda a crónica (6/13) y forma resistente (2/13). Los animales que manifestaron la enfermedad clínicamente presentaron lesiones en necropsia variadas (hepatización, secuestros, líquido pleural, adherencias pulmonares, cicatrices fibrosas, etc.), así como una sero conversión. *MmmSC* se aisló de los pulmones hepatizados y del contenido de secuestros. Por otro lado, dos animales, clasificados como resistentes, no presentaron nunca ni signos clínicos ni serológicos. Los animales testigo se mantuvieron clínicamente sanos durante todo el periodo experimental. Durante la autopsia no se observó ninguna lesión característica de la Ppcb y los análisis de laboratorio se mantuvieron negativos. El presente estudio confirma las observaciones anteriores, según las cuales la Ppcb puede transmitirse exitosamente a los bovinos mediante el contacto. Estos resultados permiten la definición de las bases experimentales para estudios futuros, como la caracterización de respuestas inmunes y patológicas de los bovinos durante las diferentes fases y formas de la enfermedad.

Palabras clave: Ganado bovino – Pleuroneumonía contagiosa bovina – *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony – Infección experimental – Examen clínico – Inmuno-diagnóstico – Inspección postmortem – Malí.