

IDENTIFICATION DE MYCOPLASMES DANS DES LOTS DE POULES PONDEUSES ATTEINTS PAR LE SYNDROME DES ŒUFS A EXTREMITÉ DE VERRE.

**M. Cisneros-Tamayo^{1,3,4}, I. Kempf^{1,3}, M. Cineux^{1,3}, R. Busson^{1,3}, C de Boissésou^{2,3},
P. Lucas^{2,3}, M.-H. Baÿon-Auboyer⁵, A.V. Gautier-Bouchardon^{1,3}.**

¹ Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité MBA, Ploufragan, France.

² Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité GVB, Ploufragan, France.

³ Université Bretagne Loire, Rennes, France.

⁴ Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Quito, Ecuador. ⁵ Laboce, Ploufragan, France.

anne.bouchardon@anses.fr

RÉSUMÉ

Mycoplasma synoviae (MS) est l'agent responsable du syndrome des œufs à extrémité de verre (EAA, Eggshell Apex Abnormality), caractérisé par une altération de l'apex et une augmentation du nombre d'œufs déclassés, et exacerbée par l'association de MS et du virus de la bronchite infectieuse. Une étude de terrain a été réalisée entre 2015 et 2017 dans des élevages de poules pondeuses atteints par le syndrome, localisés dans différentes régions françaises, avec des poules élevées en cages aménagées (CA) ou systèmes alternatifs (ALT) afin (i) de déterminer le pourcentage d'échantillons positifs vis-à-vis de MS en fonction du type de prélèvements et du type d'élevage et (ii) isoler des souches récentes de MS d'élevages atteints du syndrome. Au total, 1136 échantillons ont été prélevés dans 28 lots atteints par le syndrome. Des cultures ont été réalisées dans du milieu FM4 liquide puis sur gélose FM4 pour cloner des colonies. Les échantillons, cultures et clones ont été analysés avec une PCR spécifique de MS. Des analyses de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et du séquençage de nouvelle génération (NGS) ont été effectués sur des clones négatifs en PCR. MS a été détecté dans 25/28 lots dans les deux systèmes de production, avec une détection significativement plus élevée dans les écouvillonnages trachéaux que dans les écouvillonnages cloacaux, les albumens et les jaunes d'œuf. L'isolement de MS a été rendu difficile par la présence d'un autre mycoplasme à croissance plus rapide *in vitro*. L'utilisation du MALDI-TOF et du NGS a permis l'identification de *Mycoplasma pullorum*, détecté dans 14/25 lots atteints par le syndrome. *M. pullorum* a été isolé à partir de prélèvements trachéaux, cloacaux et d'œufs dans différents systèmes de production. Ces résultats ont confirmé la présence du syndrome EAA en France. Des études devront être menées pour étudier le rôle possible de *M. pullorum* dans l'expression des symptômes de l'EAA.

ABSTRACT

Identification of avian mycoplasmas in samples from layer-hen flocks with eggshell apex abnormality (EAA) syndrome in France.

The eggshell apex abnormality (EAA) syndrome is characterized by an altered shell surface, increased translucency, shell thinning, and cracks and breaks in the eggshell apex. *Mycoplasma synoviae* (MS) is the agent responsible for the EAA syndrome, which is exacerbated by the association of MS and infectious bronchitis virus. A field study was conducted between 2015 and 2017 in different regions of France in egg-layer farms with clinical signs of EAA in order to (i) determine the percentage of MS-positive samples based on the type of samples and production systems (furnished cages or alternative systems) and (ii) isolate recent MS strains from farms with the syndrome. In total, 1136 samples were collected from 28 EAA-positive flocks. Cultures were carried out in liquid FM4 medium then on FM4 agar to clone colonies. Samples, broth cultures and clones were analyzed with a MS-specific PCR. MALDI-TOF mass spectrometry and new generation sequencing (NGS) were performed on PCR-negative clones. MS was detected in 25/28 farms, from both production systems. Detection of MS was significantly higher in tracheal swabs than in cloacal, albumen and egg yolk swabs. Isolation of MS was made difficult due to the presence of another *Mycoplasma* species growing faster *in vitro*. The use of MALDI-TOF and NGS enabled identification of *Mycoplasma pullorum*, which was detected in 14/25 EAA-positive flocks. *M. pullorum* was isolated from tracheal, cloacal and egg swabs in different production systems. These results confirmed the presence of the EEA syndrome in France. Studies will need to be conducted to investigate the potential role of *M. pullorum* in the expression of EAA clinical signs.

INTRODUCTION

Mycoplasma synoviae (MS) provoque des infections subcliniques des voies respiratoires supérieures (entraînant des diminutions des performances zootechniques dans les troupeaux) et des synovites infectieuses (arthrites, boiteries) chez la poule et la dinde (Fergusson-Noel et Noormohammadi, 2013). *M. synoviae* est également l'agent responsable du syndrome des œufs à extrémité de verre (EAA, Eggshell Apex Abnormality), qui entraîne une altération de l'apex (cône supérieur de l'œuf) caractérisée par une surface de coquille altérée (aspect plus rugueux), un amincissement de la coquille, une translucidité accrue (détectable de manière macroscopique, en particulier lors du mirage des œufs) et l'apparition de fissures et de cassures (Gautier-Bouchardon, 2012) (Figure 1). Les lésions de la coquille de l'œuf sont limitées à une région d'environ 2 cm de diamètre autour de l'apex. Cette altération de l'œuf, très caractéristique, est exacerbée par l'association de *M. synoviae* et du virus de la bronchite infectieuse (Feberwee *et al.*, 2009). Ces lésions sont à l'origine d'une augmentation du nombre d'œufs déclassés (cassés, souillés). Le taux de dé classement peut atteindre 25-30% dans certains élevages (Feberwee *et al.*, 2009 ; Gautier-Bouchardon, 2012). Le syndrome est observé de façon plus fréquente dans les élevages multi-âges que dans les élevages en bande unique (risque de contamination plus élevé des nouvelles bandes de poules). Des traitements antibiotiques (oxytétracycline ou tylosine) permettent de réduire momentanément les conséquences du syndrome (diminution significative du nombre d'œufs déclassés, augmentation de la résistance des coquilles), mais une rechute est généralement observée une dizaine de jours après l'arrêt des traitements (Feberwee *et al.*, 2009 ; Catania *et al.*, 2010). Certains lots de poules pondeuses sont réformés plusieurs semaines avant l'âge moyen de réforme (70 semaines) car ils ne sont plus viables économiquement (trop d'œufs déclassés, traitements antibiotiques inefficaces) et/ou parce que les œufs issus de ces élevages ne sont plus acceptés par les centres de conditionnement (temps accrus de nettoyage des installations, œufs souillés) (Feberwee *et al.*, 2009 ; Catania *et al.*, 2010 ; Gautier-Bouchardon *et al.*, 2012).

Le diagnostic du syndrome EAA repose initialement sur l'observation d'œufs d'aspect caractéristique de l'EAA au sein de l'élevage.

Le syndrome a été décrit dans plusieurs pays et a été identifié en France en 2009 (Feberwee et Landman, 2008 ; Gautier-Bouchardon *et al.*, 2010). Peu de données sont disponibles sur la prévalence de ce syndrome et sur le type d'élevages touchés.

Les objectifs de cette étude étaient (i) d'identifier *M. synoviae*, agent étiologique du syndrome EAA, dans différents types d'échantillons (pour déterminer

le pourcentage de prélèvements positifs en fonction du type d'échantillon), provenant de lots de poules pondeuses atteints par le syndrome EAA dans différentes régions françaises et au sein de différents systèmes de production et (ii) d'isoler des souches de *M. synoviae* d'élevages atteints du syndrome pour des études ultérieures (notamment une comparaison des génomes de souches isolées de différents types d'infections MS).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Récolte d'échantillons dans des élevages de poules pondeuses atteints par le syndrome EAA

Une étude de terrain a été réalisée entre 2015 et 2017 dans des élevages de poules pondeuses produisant des œufs à extrémité de verre. Ces élevages étaient localisés dans différentes régions françaises, avec des poules élevées en cages aménagées (CA) ou systèmes alternatifs (ALT).

Les prélèvements ont été réalisés par des vétérinaires lors de visites dans 28 élevages atteints par le syndrome, sur des poules pondeuses âgées de 22 à 68 semaines. Les poules ont été échantillonnées au hasard dans chaque élevage. Dans la majorité des cas, des écouvillonnages trachéaux et cloacaux ont été prélevés sur les mêmes poules, et des œufs ont parfois également été envoyés (essentiellement des œufs présentant des anomalies de l'apex). Au total, 1136 échantillons (544 écouvillonnages trachéaux et 371 écouvillonnages cloacaux, 111 albumens et 110 jaunes d'œuf) ont été reçus et traités au laboratoire.

1.2. Traitement des prélèvements au laboratoire

Les écouvillonnages trachéaux et cloacaux ainsi que des écouvillons trempés dans les jeunes d'œufs ou les albumens ont été placés dans 2 mL d'eau peptonée tamponnée et vortexés. Ces différentes suspensions initiales ont ensuite été utilisées pour effectuer en parallèle des mises en culture et des tests PCR spécifiques de *M. synoviae*.

Quatre dilutions de raison 10 ont été réalisées en milieu de culture liquide FM4 (Frey *et al.*, 1968) supplémenté avec des antibiotiques, pour limiter la croissance de contaminants. Ces dilutions ont été incubées à 37 ± 2 °C pendant au maximum 30 jours. La croissance des mycoplasmes en milieu de culture liquide a été détectée par virage du milieu (dû à leur activité métabolique). Des cultures sur milieu FM4 gélosé ont été effectuées à partir de ces cultures virées, et incubées à 37 ± 2 °C avec 5% de CO₂ pendant 5 à 10 jours. Les colonies de mycoplasmes ont été clonées et cultivées dans du milieu FM4 liquide comme décrit ci-dessus.

La présence de *M. synoviae* dans les cultures virées et les clones a été confirmée ou infirmée par des tests PCR spécifiques de *M. synoviae* (PCR-MS, Lauerma *et al.*, 1993) après une étape de lyse (Kellog et Kwok, 1990).

M. synoviae étant naturellement résistant à l'érythromycine (Aarestrup et Kempf, 2006), des cultures ont également été réalisées dans du milieu FM4 additionné de différentes concentrations d'érythromycine allant de 4 à 10 µg/mL lorsque la présence d'autres espèces de mycoplasmes rendait l'isolement de *M. synoviae* difficile.

Des analyses complémentaires ont été effectuées sur les clones négatifs en PCR-MS afin d'identifier l'espèce mycoplasmatique :

- des analyses de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF après une étape d'extraction de protéines (Pereyre *et al.*, 2013) à partir de 3 mL de culture ;
- du séquençage de nouvelle génération (NGS) en utilisant la technologie Illumina Mi-Seq.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

M. synoviae a été détecté par PCR-MS dans 25/28 lots (89 %) de poules pondeuses atteints par le syndrome dans différents systèmes de production (5/5 ALT et 20/23 CA), avec une détection significativement plus élevée dans les écouvillonnages trachéaux (59 %) que dans les écouvillonnages cloacaux (10,2 %), les albumens (3,6 %) et les jaunes d'œuf (0,9 %) (Tableau 1). *M. synoviae* a été détecté dans des prélèvements trachéaux de 95,8 % des lots atteints par l'EAA et a été détecté dans des prélèvements cloacaux de 71,4 % des lots atteints par le syndrome. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les différents systèmes de production (même pourcentage d'échantillons positifs pour les élevages ALT et CA).

Ce niveau plus élevé de détection de *M. synoviae* dans les écouvillons trachéaux est en accord avec d'autres études (Dufour-Gesbert *et al.*, 2006; Feberwee *et al.*, 2005; Catania *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2015). La différence entre les écouvillonnages trachéaux et cloacaux peut s'expliquer par le fait que *M. synoviae* a un tropisme plus élevé pour les tissus des voies respiratoires (Stipkovits & Kempf, 1996) et que son excrétion cloacale peut être plus faible (sous le seuil de détection), intermittent ou plus irrégulier, comme déjà suggéré par Marois *et al.* (2000). L'isolement ou la détection de *M. synoviae* aurait pu être améliorée en prélevant des échantillons directement à partir de l'appareil reproducteur des poules pondeuses et non du cloaque, mais cette étude reposait sur la collecte d'échantillons à partir d'animaux vivants, conformément aux pratiques vétérinaires sur le terrain pour le diagnostic des mycoplasmoses, sans devoir abattre et autopsier des animaux.

Les résultats de cette étude ont également montré que *M. synoviae* pouvait être détecté dans la plupart des exploitations présentant des signes cliniques d'EAA (25/28 lots échantillonnés, 89,3%). Pour deux des trois élevages où *M. synoviae* n'a pas été détecté, les œufs étaient les seuls échantillons envoyés pour des analyses de laboratoire. La détection et l'isolement de *M. synoviae* significativement plus faibles à partir d'échantillons d'œufs comparés aux écouvillonnages

cloacaux ou trachéaux pourrait ainsi expliquer la non-détection de *M. synoviae* dans ces lots.

Au cours de cette étude de terrain de 30 mois, des clonages ont été effectués à partir de différentes cultures positives détectées par PCR-MS. Cependant, l'isolement de clones MS a été rendu difficile par la présence de contaminations bactériennes, mais aussi principalement par la présence d'une autre espèce de mycoplasme dans de nombreux échantillons, qui se multipliait plus vite que *M. synoviae in vitro*. La présence d'érythromycine dans le milieu de culture n'a pas empêché la croissance de cette autre espèce et n'a pas permis un meilleur isolement des souches de *M. synoviae*.

Les analyses effectuées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF sur 14 clones ont identifié cette espèce comme étant *M. pullorum*. Ces résultats ont été confirmés par NGS : l'alignement du gène de l'ARNr 16S de ces 14 clones avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank a montré des similarités de séquence de 98,2 % à 99,4 % avec le gène de l'ARNr 16S de *M. pullorum* (U58504.1). De même, l'alignement d'un sous-ensemble de fragments de séquences (autres que l'ARNr 16S) de ces 14 clones sur la base de données nucléotidique a montré un pourcentage élevé de similitude avec la séquence complète publiée de *M. pullorum* (CP017813.1).

L'absence d'inhibition de *M. pullorum* lors des cultures *in vitro* avec l'érythromycine sont en accord avec les résultats de Whithear *et al.* (1983) montrant que des souches de *M. pullorum* étaient résistantes à l'érythromycine, mais sensibles à la tylosine, suggérant une résistance naturelle aux macrolides possédant un cycle de 14 carbones, comme *M. synoviae* (Aarestrup et Kempf, 2006).

Des analyses ultérieures effectuées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF sur des cultures ont montré que *M. pullorum* était présent dans au moins 14 des 25 (56 %) lots atteints par le syndrome EAA échantillonnés au cours de cette étude.

Au total, 38/71 clones ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *M. pullorum* par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : quatre clones isolés d'écouvillonnages cloacaux et 24 clones isolés d'écouvillonnages trachéaux provenant de lots de poules pondeuses élevées en cages aménagées ; un clone isolé d'un jaune d'œuf et neuf clones isolés de trachées provenant de lots élevés en systèmes alternatifs. De plus, 33/71 clones ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *M. synoviae* par PCR-MS : trois clones isolés d'écouvillonnages cloacaux et 30 clones isolés d'écouvillonnages trachéaux provenant de lots de poules pondeuses élevées en cages aménagées.

Très peu d'études ont été publiées sur *M. pullorum*. Cette espèce a été isolée de faisans et de perdrix présentant des signes d'infection des voies respiratoires supérieures, mais a été considéré comme une espèce de mycoplasme saprophyte à croissance rapide empêchant l'isolement d'un autre mycoplasme

pathogène (Bradbury *et al.*, 2001). Cependant, *M. pullorum* a été isolé, seul ou avec d'autres espèces de mycoplasmes, à partir de lésions au niveau de la trachée ou des sacs aériens de poulets présentant des problèmes respiratoires (Benčina *et al.*, 1987; Lobo *et al.*, 2004) et d'embryons de poulets morts (Benčina *et al.*, 1987). *M. pullorum* a également été identifié dans des embryons de dinde morts (Moalic *et al.*, 1997). L'isolement de clones dans des écouvillons d'œuf et de cloaque dans notre étude, et dans des embryons de dindon et de poulet dans de précédentes études suggère fortement la possibilité d'un tropisme génital et donc d'une transmission verticale de *M. pullorum*. Le rôle joué par *M. pullorum* dans le développement de l'EAA mérite des études plus approfondies. Il sera important notamment de rechercher dans des élevages de poules pondeuses s'il existe des cas d'EAA sans isolement de *M. synoviae* et avec isolement de *M. pullorum* (aucun cas de ce type n'a été détecté dans la présente étude), d'évaluer et de comparer la sévérité des signes cliniques dans les élevages infectés par *M. synoviae* et/ou *M. pullorum*, qui de *M. synoviae* et *M. pullorum* infectent les poules en premier. Des infections expérimentales pourraient également permettre de déterminer si, comme le virus de la bronchite infectieuse, une association *M. synoviae* / *M. pullorum* pourrait exacerber les

signes cliniques (augmentation du nombre d'œufs déclassés).

Cette étude a permis d'isoler des souches récentes de *M. synoviae* dans des élevages atteints par le syndrome des œufs à extrémité de verre. Des études d'épidémiologie moléculaire pourront être menées en comparant ces souches avec des souches isolées d'autres infections dues à *M. synoviae* (infections subcliniques des voies respiratoires, synovites infectieuses) afin de déterminer si les souches responsables du développement du syndrome sont différentes des souches "classiques".

CONCLUSION

Ces résultats ont confirmé la présence du syndrome EAA dû à *M. synoviae* en France et dans différents systèmes de production d'œufs de consommation (cages aménagées ou systèmes alternatifs).

Des études complémentaires (infections expérimentales et/ou enquêtes sur le terrain, développement d'une PCR spécifique pour détecter cette espèce dans des échantillons sans étape de culture) devront être menées pour étudier le rôle possible de *M. pullorum* dans l'expression des signes cliniques de l'EAA en co-infection avec *M. synoviae*, l'agent initiateur du syndrome.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarestrup F.M., Kempf I., 2006. In Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin (Aarestrup F.M., Ed), ASM Press, Washington DC, USA. p 239-248.
- Benčina D., Mrzel I., Tadina T., Dorrer D., 1987. Mycoplasma species in chicken flocks with different management systems. Avian Pathol., 16, 599-608.
- Bradbury J.M., Yavari C.A., Dare C.M., 2001. Mycoplasmas and respiratory disease in pheasants and partridges. Avian Pathol., 30, 391-396.
- Catania S., Bilato D., Gobbo F., Granato A., Terregino C., Iob L., Nicholas R.A., 2010. Avian Dis., 54, 961-964.
- Dufour-Gesbert F., Dheilly A., Marois C., Kempf I., 2006. Vet. Microbiol., 114, 148-154.
- Feberwee A., Landman, 2008. World Poultry, 24, 22-23.
- Feberwee A., Mekkes D.R., de Wit J.J., Hartman E.G., Pijpers, A., 2005. Avian Dis., 49, 260-268.
- Feberwee A., de Wit J.J., Landman W.J., 2009. Avian Pathol., 38 (1), 77-85.
- Fergusson-Noel N., Noormohammadi A., 2013. In Diseases of poultry (Swayne D.E. *et al.*, Eds.), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. p. 877-893.
- Frey M.L., Hanson R.P., Anderson D.P., 1968. Am. J. Vet. Res., 29, 2163-2171.
- Gautier-Bouchardon A.V., 2012. Le Nouveau Praticien Vétérinaire, 5 (20), 40-43.
- Gautier-Bouchardon, A.V., Ferré, S., Kempf, I., 2010. 19^{ème} Congrès de l'International Organisation of Mycoplasma (IOM), Toulouse, France, p. 161.
- Kellog, D.E., Kwok, S., 1990. In PCR Protocols (Innis M.A. *et al.*, Eds.). Academic Press, San Diego, USA, p. 337-347.
- Lauerman L.H., Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shah S.M., Van Santen V.L., 1993. Avian Dis., 37, 829-834.
- Lobo E., García M.C., Moscoso H., Martínez S., Kleven S.H., 2004. Strain heterogeneity in *Mycoplasma pullorum* isolates identified by random amplified polymorphic DNA techniques. Spanish J. of Agricultural Res., 2, 4.
- Marois C., Dufour-Gesbert F., Kempf I., 2000. Vet. Microbiol., 73, 311-318.
- Moalic P., Kempf I., Gesbert F., Laigret F., 1997. Identification of two pathogenic avian Mycoplasmas as strains of *Mycoplasma pullorum*. Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiol., 47, 171-174.
- Moreira F.A., Cardoso L., Coelho A.C., 2015. Vet. Italian J., 51, 93-98.
- Pereyre S., Tardy F., Renaudin H., Cauvin E., Del Pra Netto Machado L., Tricot A., Benoit F., Treilles M., Bébéar C., 2013. J. Clin. Microbiol., 51, 3314-3323.
- Whithear K.G., Bowtell D.D., Ghiocas E., Hughes K.L., 1983. Avian Dis., 27, 937-949.

Tableau 1. Détection de *M. synoviae* par PCR-MS dans différents types de prélèvements

Echantillons	Cages aménagées (CA)	Systèmes alternatifs (ALT)	Total	Pourcentage d'échantillons MS+
Trachée	289/490	32/54	321/544 ^a	59,0 %
Cloaque	39/371	NE	39/371 ^b	10,2 %
Albumen	1/95	3/16	4/111 ^c	3,6 %
Jaune d'œuf	1/95	0/15	1/110 ^c	0,9 %
TOTAL	330/1051	35/85	365/1136	32,1 %

^{a, b, c} : les résultats avec des lettres différentes sont statistiquement significativement différents ($p < 0,05$).

NE : non échantillonné

Figure 1. Augmentation de la translucidité (A) et altération de la surface de l'apex des œufs (B) dans des lots de poules pondeuses atteints du syndrome EAA (photos : J.-C. Donval, 2017)

