



**HAL**  
open science

# Prévalence, identification et caractérisation des bactéries du genre *Mycoplasma* détectées dans les affections respiratoires équines

Matthieu Martineau

## ► To cite this version:

Matthieu Martineau. Prévalence, identification et caractérisation des bactéries du genre *Mycoplasma* détectées dans les affections respiratoires équines. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMC432 . tel-04483951

**HAL Id: tel-04483951**

**<https://theses.hal.science/tel-04483951v1>**

Submitted on 29 Feb 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Préparée au sein de l'**Université de Caen Normandie**

**Prévalence, identification et caractérisation des bactéries du genre *Mycoplasma* détectées dans les affections respiratoires équine**

Présentée et soutenue par  
**MATTHIEU MARTINEAU**

**Thèse à caractère confidentiel soutenue le 13/12/2023**  
devant le jury composé de :

M. CHRISTIAN DUCROT	Directeur de recherche - Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement	Rapporteur du jury
MME CORINNE MAROIS-CREHAN	Chargé de recherche HDR - ANSES	Rapporteur du jury
M. JEAN-PHILIPPE AMAT	Chargé de recherche - ANSES	Membre du jury
MME VALERIE PICANDET	Docteur - Centre Hospitalier vétérinaire Equin	Membre du jury
M. OLIVIER JOIN-LAMBERT	Professeur des universités PraticienHosp - Université de Caen Normandie	Président du jury
MME ALBERTINE LEON SECK	Chercheur HDR - Université de Caen Normandie	Directeur de thèse
MME FLORENCE TARDY	Chargé de recherche HDR - ANSES	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par **ALBERTINE LEON SECK** (DYNAMIQUE MICROBIENNE ASSOCIEE AUX INFECTIONS URINAIRES ET RESPIRATOIRES) et **FLORENCE TARDY** (ANSES)



## AVANT-PROPOS

---

L'histoire du cheval est étroitement liée à celle de l'Homme. Le cheval a d'abord été une proie puis, après sa domestication, utilisé comme une aide au déplacement et au transport des charges lourdes, permettant ainsi d'augmenter le rendement agricole jusqu'au début de l'ère industrielle. Le cheval a également été utilisé dans les armées, pour un déplacement rapide des troupes et un support physique de taille lors des combats. Aujourd'hui, l'utilisation militaire des chevaux a été abandonnée par la plupart des États, à l'exception des parades et des manifestations. La consommation de viande de cheval demeure appréciée à l'échelle mondiale, notamment en Chine, au Kazakhstan et au Japon, où il arrive qu'elle soit dégustée crue sous forme de sashimi. En France, depuis 1980, cette consommation décroît et le cheval est à présent utilisé majoritairement pour le loisir et la compétition. L'équitation est d'ailleurs très populaire en France avec 670 000 cavaliers licenciés en 2021, classant ainsi cette discipline comme le 3<sup>e</sup> sport national [Drapeau, 2022].

En Normandie, l'élevage de chevaux, a une véritable renommée internationale, notamment par la génération et la formation de champions évoluant dans les trois disciplines : le Trot, le Galop et le Sport. L'Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE) estime en 2022 un effectif de 147 000 équidés sur le territoire normand répartis dans 3 513 élevages (données du site <https://statscartes.ifce.fr/>, consulté le 30/10/23). Cette filière est un véritable enjeu économique régional avec 18 000 emplois et 1,3 milliard d'euros de recettes en 2019, soit 14 % du chiffre d'affaires normand [Fustec *et al.*, 2020]. L'engouement régional pour l'élevage équin a permis de développer au fur et à mesure des années un écosystème propice au développement des compétences en matière de recherche équine dont l'excellence est aujourd'hui reconnue à l'échelle internationale. Celle-ci s'inscrit également dans le projet d'établissement de l'Université de Caen Normandie ainsi que dans les stratégies de spécialisation et les schémas directeurs de la Région Normandie et des départements Normands. Ces éléments ont permis la reconnaissance du Pôle Hippolia comme unique pôle de compétitivité de la filière équine en France, la création du groupement d'intérêt scientifique (GIS) dédié au cheval (GIS Centaure) et la constitution d'un syndicat mixte Normandie Equine Vallée (NEV) dont l'objectif est de développer les infrastructures dédiées à la recherche équine en région. Dans cet environnement, le groupement d'intérêt public (GIP) LABÉO réalise depuis 1995 des travaux de recherche, développement et innovation (RDI) au service de la filière équine, avec la compréhension des affections respiratoires comme thématique phare de recherche. En effet, ces affections constituent la seconde cause de contre-performance chez le cheval athlète, provoquant des pertes économiques importantes pour la filière [Wilsher *et al.*, 2006].



Les bactéries du genre *Mycoplasma*, pourtant retrouvées de manière non négligeable dans les prélèvements respiratoires équins analysés à LABÉO, sont peu décrites dans la littérature et leur implication clinique n'est pas connue. De ce constat est né le projet MYCOPAB, objet de ce manuscrit.

Le projet MYCOPAB a été réalisé sous la direction et en associant les expertises respectives des Docteurs Léon et Tardy en microbiologie du cheval et des mycoplasmes, au sein de deux unités mixtes de recherche (UMR) :

- l'UMR 1311 DYNAMICURE (Dynamique microbienne associée aux infections urinaires et respiratoires) labélisée par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), de l'Université Caen-Rouen Normandie, à laquelle est associée depuis 2020, l'unité Prévention et Stratégies Thérapeutiques (Axe Santé Équine/Pôle RDI) de LABÉO dirigée par le Dr Léon.
- l'UMR Mycoplasmoses animales, Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), laboratoire de Lyon, VetAgro Sup, que le Dr Tardy a (co)dirigé de juin 2012 à mai 2023.

Ce projet a été réalisé en grande majorité sur le campus international dédié à la recherche en santé équine (NEV, site de Saint-Contest) et financé par l'IFCE, le Fonds Éperon et le GIS Centaure. Ce projet a également été labélisé par le Pôle Hippolia.



## REMERCIEMENTS

---

Ces années de thèse ont été l'occasion de rencontrer de nombreuses personnes qui m'ont accompagné, aidé et soutenu durant ces trois années. Toutes ces personnes m'ont permis d'évoluer et d'apprendre les multiples facettes de cette fascinante aventure qu'est la recherche scientifique.

Je voudrais, tout d'abord, remercier le Professeur Jean-Christophe PLANTIER, directeur de l'UMR Inserm 1311 DYNAMICURE de m'avoir permis de faire ma thèse dans son unité de recherche. Également, un grand merci au Dr. Guillaume FORTIER, Directeur Général de LABÉO et au Dr. Pierre-Hugues PITEL, coordinateur de l'axe santé équine, de m'avoir permis de faire cette thèse au sein de LABÉO, sur la plateforme Normandie Equine Vallée.

Je tiens, ensuite, à remercier les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail. Merci aux Dr. Corinne MAROIS-CREHAN et Dr. Christian DUCROS d'avoir bien voulu être mes rapporteurs. J'ai une grande reconnaissance également pour les Docteurs Valérie PICANDET, Jean-Philippe AMAT et Olivier JOIN-LAMBERT qui ont accepté de juger mon travail lors de ma soutenance.

Je remercie également l'IFCE, le Fonds Éperon et le GIS Centaure, qui ont financé le projet MYCOPAB et sans qui ce dernier n'aurait pas pu voir le jour.

Je remercie tout particulièrement mes directrices de thèse, Albertine LÉON-SECK et Florence TARDY pour m'avoir encadré de mains de maîtres et soutenu durant ces trois années. Merci d'avoir permis la construction de ce trio, qui sera je l'espère, amené à se reformer pour de nouveaux projets. Albertine, merci pour ton tempérament et tes motivations qui ont permis et permettront de faire de grandes choses. Florence, merci pour ta présence, même si elle fut majoritairement à travers un écran, tes conseils et ta justesse m'ont beaucoup appris.

Merci aux membres de mon comité de suivi individuel, Thomas KNIGGE, Laurence MALANDRIN, Jean-François BRUGÈRE et Pierre LEDORMAND. Leur soutien et leurs conseils durant nos échanges ont été d'une aide précieuse.

Pour leur accueil et leur gentillesse lors de ma venue, je remercie l'équipe de l'UMR Mycoplasmoses animales. Un petit mot particulier à Maryne qui a suivi tout le début de cette thèse et avec qui nous avons eu de grandes discussions sur ce fameux score clinique.

Je remercie les vétérinaires, Sophie PRADIER et Élodie LALLEMAND pour avoir accepté de venir faire les prélèvements à la jumenterie du Pin malgré la distance et le rendement demandé. En compagnie de Laurie BRIOT et Nicolas GENDRON que je remercie également, ces trois jours de travail intensifs se sont déroulés dans une bonne humeur constante.

A toutes les personnes de NEV avec qui j'ai pu discuter, rire et partager de bons moments, vous avez rendu cette thèse plus agréable en particulier durant nos pauses déj'. Merci à Marie-Pierre, Christine, Erika, Margot, Agathe, Gabrielle, Stéphane, Lorane et Kevin.

Merci aux membres du RESPE pour avoir répondu à mes questions, parfois impromptues, et surtout à Coralie pour sa disponibilité en cas de problèmes statistiques.

Un grand merci aux membres de l'unité PST. Sophie, cela aura été un véritable plaisir de travailler à tes côtés. Merci pour tes conseils, ta joie de vivre et ton tempérament qui m'ont grandement aidé et je te souhaite à nouveau le meilleur dans **ton** sud. Éléna (a.k.a. Impératrice Kokabi), merci pour ton support dans toutes les expériences et activités liées à MYCOPAB auxquelles tu as participé, ta volonté et tes encouragements. Anis (l'arbre), merci tout d'abord pour ton aide lors des rentrées de données et aussi pour nos discussions, parfois professionnelles. Clément (PPDM), le petit (trop grand) frère de thèse, merci pour ta sympathie, ta bonne humeur à toute épreuve, surtout pour ta bienveillance et la générosité qui te caractérise.

Je remercie également les stagiaires qui se sont succédés dans l'unité et le bureau. Vincent et Chloé, merci pour votre contribution au projet MYCOPAB. Prescillia, Jacky, Eliott et Marion, je pense que nous n'oublierons pas nos discussions et la température (glacial) de ce bureau.

A l'ancienne génération de thésardes, toutes devenues docteures aujourd'hui. Aurélie, merci pour ta justesse et ta rigueur qui force le respect. A ma grande sœur de thèse, princesse Marine, un grand merci pour ton style, ta classe (tout en finesse), ton rayonnement et tes conseils avisés, allant de l'étude génomique aux choix des cadeaux à offrir. Dr. Carnet, nos discussions scientifiques (parfois) ont toujours permis d'apprendre beaucoup sur la thèse et le reste, merci pour votre optimisme.

Aux autres membres de la Dream Team 2.0, Manon et Camille, merci pour cette entraide perpétuelle dont vous avez fait preuve. Manon, merci pour tes explications spatiales, toujours intéressantes. Camille, merci pour ton soutien depuis la licence de bio et durant cette thèse.

Docteur CONTENTIN, merci pour ton réalisme, qui même s'il faisait parfois peur, était toujours fondé. Même si tu es docteur et que tu sais tout, ta curiosité sans fin me manquera.

J'ai bien évidemment une pensée pour mes parents qui ont toujours cru en moi depuis le jour où j'ai ouvert les yeux à leurs côtés. Merci à vous, qui, même si vous n'avez pas toujours compris ce que je faisais (peut-être est-ce plus clair maintenant ?), étiez toujours prêts à m'encourager et à me proposer de venir chez vous pour le repas ou pour discuter. Je m'excuse pour ces invitations que j'ai dû décliné par manque de temps, mais que nous rattraperons.

Un grand merci à Émilie, celle qui me soutient chaque seconde de son existence depuis plusieurs années maintenant. Ta force et ton énergie (même si tu préfères dormir) sont inscrites dans chacune des choses qui ont été produites durant ces années de thèse. Je ne trouverais pas les mots pour te remercier comme tu le mérites donc je conclurai en disant que je t'aime.

## TABLE DES MATIERES

---

Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	10
Liste des abréviations.....	11
INTRODUCTION.....	17
1. Affections respiratoires du cheval.....	17
1.1. Inflammations respiratoires équines.....	19
1.2. Infections respiratoires équines.....	20
1.2.1. Infections virales.....	20
a) Grippe équine.....	20
b) Infection à Herpèsvirus.....	21
c) Infection à Rhinovirus.....	21
d) Artérite virale équine.....	22
e) Infection à Adénovirus 1.....	22
1.2.2. Infections bactériennes.....	22
a) La gourme.....	23
b) La rhodococcose.....	23
c) La pneumonie bactérienne.....	23
1.2.3. Infections fongiques.....	25
1.3. Approches diagnostiques.....	27
1.3.1. Les prélèvements.....	27
1.3.2. Analyses de laboratoire.....	30
a) Analyses sanguines.....	30
b) Cytologie.....	31
c) Culture.....	31
d) Biologie moléculaire.....	32

2.	Bactéries du genre <i>Mycoplasma</i> .....	33
2.1.	Taxonomie et phylogénie .....	33
2.2.	Caractéristiques phénotypiques.....	41
2.2.1.	Absence de paroi et taille cellulaire réduite.....	41
2.2.2.	Morphologie des colonies sur milieu gélosé .....	43
2.2.3.	Capacité métabolique réduite .....	43
2.3.	Caractéristiques génomiques.....	45
2.3.1.	Taille et GC %.....	45
2.3.2.	Éléments génétiques mobiles.....	47
a)	Plasmide .....	47
b)	Éléments intégratifs et conjugatifs des mycoplasmes .....	47
c)	Séquences d'insertion et transposon.....	49
d)	Phages .....	51
2.4.	Importance médicale.....	53
2.4.1.	Implications dans les infections respiratoires .....	55
a)	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> .....	55
b)	<i>M. bovis</i> .....	56
c)	<i>M. hyopneumoniae</i> .....	57
d)	<i>M. pneumoniae</i> .....	57
2.4.2.	Diagnostic .....	58
a)	Sérologie .....	58
b)	Culture .....	59
c)	Biologie moléculaire .....	60
d)	Méthodes alternatives .....	61
2.4.3.	Antibiorésistance.....	63
3.	Bactéries du genre <i>Mycoplasma</i> chez le cheval.....	67
3.1.	Espèces non spécifiques du cheval.....	69
3.1.1.	<i>M. pulmonis</i> .....	70

3.1.2. <i>M. felis</i> .....	70
3.2.    Espèces inféodées au cheval .....	72
3.2.1. <i>M. fastidiosum</i> .....	72
3.2.2. <i>M. equirhinis</i> .....	72
CHAPITRE 1 : Détection du genre <i>Mycoplasma</i> chez des chevaux atteints de troubles respiratoires .	76
Publication.....	79
CHAPITRE 2 : Étude épidémiologique et caractérisation du pouvoir pathogène de <i>M. equirhinis</i> dans les affections respiratoires équinés .....	94
Publication.....	97
CHAPITRE 3 : Principales caractéristiques génomiques de l'espèce <i>Mycoplasma equirhinis</i> .....	108
Publication.....	111
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	144
CONCLUSIONS .....	156
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	158
VALORISATIONS.....	182
1.    Publications scientifiques internationales.....	182
2.    Communications orales .....	182
2.1.    Congrès internationaux .....	182
2.2.    Congrès nationaux.....	183
3.    Posters.....	184
4.    Vulgarisation scientifique .....	186
5.    Enseignements et encadrements.....	186
6.    Formations .....	187

## LISTE DES FIGURES

---

▶ <b>FIGURE 1</b> : SCHEMA DU SYSTEME RESPIRATOIRE DU CHEVAL. ....	16
▶ <b>FIGURE 2</b> : ARBRE DE DECISION ILLUSTRANT LES FACTEURS INFLUENÇANT LA METHODE D'ECHANTILLONNAGE POUR LE TRACTUS RESPIRATOIRE INFERIEUR. ....	26
▶ <b>FIGURE 3</b> : PRATIQUE D'UN LAVAGE TRACHEAL PAR VOIE TRANSTRACHEALE (A) ET ENDOSCOPIQUE (B). ....	28
▶ <b>FIGURE 4</b> : ARBRE PHYLOGENETIQUE DE CERTAINES ESPECES DE LA CLASSE DES MOLLICUTES. ....	36
▶ <b>FIGURE 5</b> : PROPOSITION DE TAXONOMIE ISSUE DES ANALYSES PHYLOGENETIQUES DE GUPTA ET COLLABORATEURS. ....	38
▶ <b>FIGURE 6</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MEMBRANES ET PAROIS CHEZ LES BACTERIES GRAM POSITIVE, NEGATIVE ET MYCOPLASMA SPP. ....	40
▶ <b>FIGURE 7</b> : COMPARAISON DE LA TAILLE CELLULAIRE DE DIFFERENTS MICRO-ORGANISMES ET DE CELLULES EUCARYOTES. ....	40
▶ <b>FIGURE 8</b> : PHOTOGRAPHIES DE COLONIES DE MYCOPLASMA SPP. OBSERVEES SUR MILIEU GELOSE. ....	42
▶ <b>FIGURE 9</b> : PHOTOGRAPHIE DE L'ASPECT "FILM AND SPOTS" OBSERVE SUR UNE GELOSE APRES CULTURE D'UNE SOUCHE DE M. EQUIRHINIS. ....	42
▶ <b>FIGURE 10</b> : PHYLOGENIE DE 191 ESPECES DU VIVANT ENTIEREMENT SEQUENCES. ....	44
▶ <b>FIGURE 11</b> : PROPOSITION DU MODELE DE TRANSFERT DES MICES CHEZ M. AGALACTIAE. ....	46
▶ <b>FIGURE 12</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEUX PRINCIPAUX TYPES (A ET B) DE PROPHAGE RETROUVES CHEZ LES BACTERIES DU GENRE MYCOPLASMA. ....	50
▶ <b>FIGURE 13</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES VOIES DE VIRULENCE DE M. MYCOIDES SUBSP. MYCOIDES. ....	54
▶ <b>FIGURE 14</b> : ILLUSTRATION DE LA TECHNIQUE D'ESTIMATION DE LA SENSIBILITE DE SOUCHES DE M. EQUIRHINIS PAR DILUTION EN MILIEU GELOSE. ....	64



## LISTE DES TABLEAUX

---

▶ <b>TABLEAU 1</b> : DESCRIPTION DE L'ASTHME CHEZ LE CHEVAL.....	18
▶ <b>TABLEAU 2</b> : AGENTS BACTERIENS LIES A DES PNEUMONIES CHEZ LE CHEVAL.....	24
▶ <b>TABLEAU 3</b> : AGENTS FONGIQUES LIES A DES INFECTIONS RESPIRATOIRES CHEZ LE CHEVAL.....	24
▶ <b>TABLEAU 4</b> : ORDRES, FAMILLES ET GENRES APPARTENANT A LA CLASSE DES MOLLICUTES.....	34
▶ <b>TABLEAU 5</b> : PRINCIPALES ESPECES PATHOGENES OU OPPORTUNISTES DU GENRE MYCOPLASMA IDENTIFIEES CHEZ L'HOMME ET LES ANIMAUX D'ELEVAGE.....	52
▶ <b>TABLEAU 6</b> : PRINCIPALES ETUDES DE PREVALENCE DE BACTERIES DU GENRE MYCOPLASMA PAR CULTURE A PARTIR D'ECOUVILLONS DES VOIES RESPIRATOIRES SUPERIEURES.....	66
▶ <b>TABLEAU 7</b> : SYNTHESE DES PREVALENCES DES BACTERIES DU GENRE MYCOPLASMA DECRITES DANS LES VOIES RESPIRATOIRES EQUINES A PARTIR DE LAVAGES TRACHEAUX.....	68

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

- AAEP** : American Association of Equine Practitioners ou Association américaine des praticiens équins
- AAVLD** : American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians ou Association américaine des diagnosticiens de laboratoire vétérinaire
- ADN (DNA)** : Acide DésoxyriboNucléique (DeoxyriboNucleic Acid)
- ADNr 16S** : Acide DésoxyriboNucléique ribosomique 16S
- AFNOR** : Association Française de NORmalisation
- Anses** : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- ARN (RNA)** : Acide RiboNucléique (RiboNucleic Acid)
- ARNm** : Acide RiboNucléique messagers
- ARNr 16S** : Acide RiboNucléique ribosomique 16S
- A(T)T** : Aspiration (Trans-)Trachéale
- BPIV-3** : Bovine Parainfluenza Virus type-3
- BVDV** : Bovine Viral Diarrhea Virus
- BRDC** : Bovine Respiratory Disease Complex ou Complexe de la maladie respiratoire bovine
- CASFM** : Comité de l'Antibiogramme de la SFM
- CARDS** : Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome ou Syndrome de détresse respiratoire acquis dans la communauté
- CDC** : Centers for Disease Control and prevention ou Centres de contrôle et de prévention des maladies
- CDS** : Coding DNA Sequence ou Séquence d'ADN codante
- CISP** : Comité International de Systématique des Procaryotes
- CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute ou Institut des normes cliniques et de laboratoire
- cm** : centimètre
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- CRE** : Complexe Respiratoire Équin
- CSI** : Conserved Signature Indels
- CSP** : Conserved Signature Proteins
- Cyt** : Cytoplasme
- DIVA** : Differentiation of Infected from Vaccinated Animals ou Différenciation des animaux infectés de ceux qui sont vaccinés
- DYNAMICURE** : Dynamique Microbienne associée aux infections Urinaires et Respiratoires

**E.** : *Escherichia*

**e.g.** : exempli gratia ou par exemple

**EAdV-1** : Equine AdenoVirus type 1

**EC** : Enzyme Commission number

**EHV** : Equine Herpes Viruses

**EIV** : Equine Influenza Virus

**ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou Technique d'immunoabsorption par enzyme lié

**ERV** : Equine RhinoVirus

**EUCAST** : European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing ou Comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens

**EVA** : Equine Viral Arteritis

**Ext** : Extérieur

**GC%** : Guanine/Cytosine %

**GIS** : Groupement d'Intérêt Scientifique

**GIP** : Groupement d'Intérêt Public

**h** : heure

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**H7N7** : Hémagglutinine 7 Neuramidase 7

**HGT** : Horizontal Gene Transfert ou Transfert de Gène Horizontal

**HPIE** : Hémorragie Pulmonaire Induite par l'Exercice

**IAD** : Inflammatory Airways Disease ou Maladie inflammatoire des voies respiratoires

**ICE** : Integrative conjugative element ou Element conjugué intégratif

**ICEA** : Integrative conjugative element of *M. agalactiae* ou Element conjugué intégratif de *M. agalactiae*

**IFCE** : Institut Français du Cheval et de l'Équitation

**INSERM** : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

**IS** : Insertion Sequence ou séquence d'insertion

**Kb** : Kilobase

**Kg** : Kilogramme

**LAMP-PCR** : Loop-Mediated Isothermal Amplification-PCR ou Amplification isotherme médiée par boucle

**LBA** : Lavage Bronchoalvéolaire

**LC** : Large Colonies

**LPSN** : List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature ou Liste des noms procaryotes classés dans la nomenclature

**L(T)T** : Lavage (Trans-)Trachéal

**M.** : *Mycoplasma*

**MALDI-TOF** : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight

**METs** : Macrophage Extracellular Traps ou Pièges extracellulaires des macrophages

**Mb** : Mégabase

**MCT** : Mycoplasma Chromosomal Transfer

**MF-DOT** : Dot immunobinding on Membrane Filtration

**MICEs** : *Mycoplasma* Integrative Conjugative Elements ou Éléments conjugatifs intégratifs de *Mycoplasma*

**min** : minute

**mL** : milliLitre

**Mmm** : *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*

**NCBI** : National Center for Biotechnology Information

**NETs** : Neutrophil Extracellular Traps ou Pièges extracellulaires des neutrophiles

**NEV** : Normandie Equine Vallée

**NF** : Norme Française

**nm** : nanomètre

**OMSA (WOAH)** : Organisation Mondiale de la Santé Animale (World Organisation for Animal Health)

**OR** : Odds-ratio ou rapport de chance

**ORF** : Open Reading Frame

**pb** : paire de bases

**PCR** : Polymerase Chain Reaction ou Réaction en chaîne par polymérase

**PPCB** : Péripleurmonie Contagieuse Bovine

**PPCC** : Pleuropneumonie Contagieuse Caprine

**PPLO** : Pleuropneumonialike Organism

**PRDC** : Porcine Respiratory Disease Complex ou Complexe des maladies respiratoires porcines

**qPCR** : quantitative PCR

**R.** : *Rhodococcus*

**RAO** : Recurrent Airways Obstruction ou Obstruction récurrente des voies respiratoires

**RDI** : Recherche, Développement et Innovation

**rt-PCR** : real time PCR ou PCR en temps réel

***S. equi*** : *S. equi* subsp. *equi*

***S. zooepidemicus*** : *S. equi* subsp. *zooepidemicus*

***S.*** : *Streptococcus*

**SAA** : Serum Amyloid A

**SC** : Small Colonies

**SFM** : Société Française de Microbiologie

**SIV** : Swine Influenza Viruses

**sp.** : species singular

**spp.** : species pluralis

**ST** : Sequence type

**subsp** : subspecies

**UFC** : Unité formant Colonies

**UMR** : Unité Mixte de Recherche

**VO<sub>2</sub> max** : Volume maximum d'Oxygène pouvant être consommé par un individu lors d'un exercice

**Vsp** : Variable surface protein ou Protéine de surface variable

**%** : Pour cent

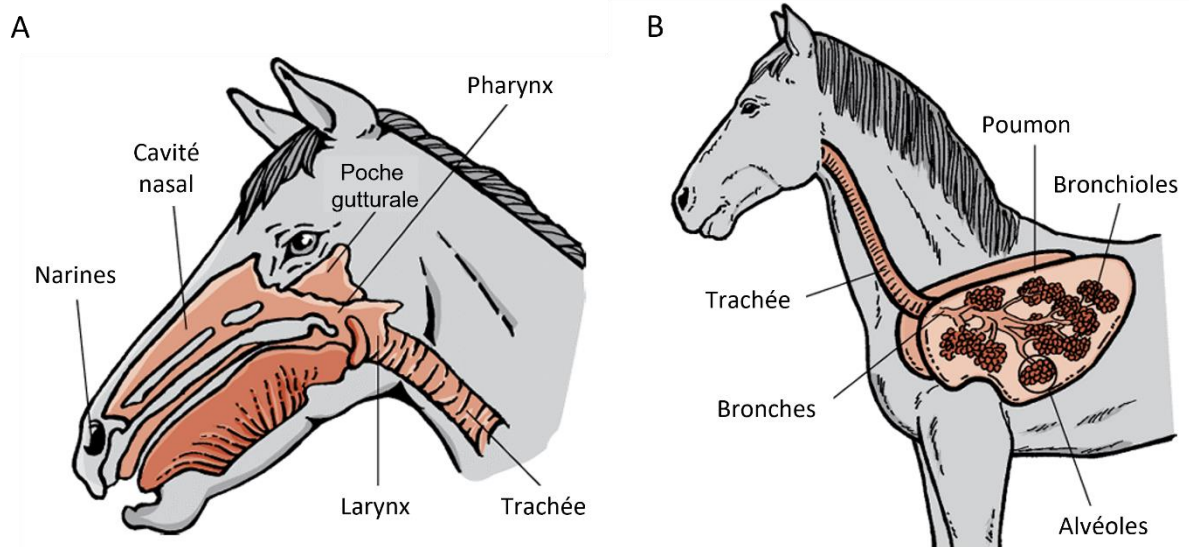
**°C** : Degré Celsius

**µg** : microgramme

**µM** : micromètre

# INTRODUCTION

---



► **Figure 1** : Schéma du système respiratoire du cheval. (A) Voies respiratoires supérieures et (B) voies respiratoires inférieures. Figure adaptée du site [msdvetmanual.com](http://msdvetmanual.com).

## INTRODUCTION

---

### 1. Affections respiratoires du cheval

La particularité du système respiratoire du cheval réside dans son organisation anatomique, ainsi que dans ses capacités pulmonaires caractéristiques. Il se divise généralement en deux parties : les voies respiratoires supérieures et inférieures (**Figure 1**). Étant donné que le cheval ne peut pas respirer par la bouche, la cavité buccale n'est pas comprise dans le tractus respiratoire. Lors de l'inspiration par les narines, l'air pénètre dans les poumons du cheval en passant par la trachée, les bronches, puis les bronchioles, pour finalement atteindre les alvéoles, où l'échange d'air avec le sang se fait à travers la membrane alvéolo-capillaire. La trachée se situe à l'interstice entre les voies supérieures et inférieures (**Figure 1**) et sa zone donnant accès aux bronches est appelée la carène trachéale. Le cheval est pourvu de poches gutturales (**Figure 1A**) qui sont des diverticules présents au niveau du pharynx et dont la fonction est encore incertaine [Richard, 2015].

Le volume maximum d'oxygène pouvant être consommé par un individu lors d'un exercice ( $VO_2 \text{ max}$ ) se mesure en millilitre par minute ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) [Dlugosz *et al.*, 2013]. Afin de comparer des individus, cette valeur est souvent pondérée à la masse corporelle (en kilogramme) pour obtenir une  $VO_2 \text{ max}$  en  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$  [Seeherman *et al.*, 1981]. Les meilleurs athlètes humains n'excèdent pas une  $VO_2 \text{ max}$  de  $90 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , représentant 26 fois la consommation d'un individu au repos [Leal-Martín *et al.*, 2022]. La  $VO_2 \text{ max}$  d'un pur-sang en course peut atteindre  $160 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , soit 40 fois sa consommation au repos [Rush and Mair, 2006 ; Oke, 2010]. Cette capacité à multiplier l'apport en oxygène à l'organisme est en partie la raison de la vitesse et des qualités de course du cheval athlète. Lors de cet effort, le cheval va donc inspirer et expirer de grandes quantités d'air extérieur et mettre son système respiratoire à rude épreuve [Mazan, 2022]. Le moindre dysfonctionnement peut alors avoir une grave incidence sur les échanges gazeux et provoquer une baisse des performances [Rush and Mair, 2006].

C'est pourquoi, les affections du tractus respiratoire équin sont la deuxième cause de contre-performance chez le cheval athlète, derrière les maladies de l'appareil musculosquelettique [Ainsworth and Hackett, 2004]. Les pathologies touchant les voies respiratoires sont donc une raison importante de perte économique pour la filière équine [Wilsher *et al.*, 2006].



► **Tableau 1** : Description de l'asthme chez le cheval.

CARACTÉRISTIQUES	ASTHME MODÉRÉ (IAD)	ASTHME SÉVÈRE (RAO)
<b>Âge d'apparition des signes cliniques</b>	Généralement chez les jeunes chevaux, mais des signes cliniques peuvent être observés à tout âge	Généralement après 7 ans
<b>Signes cliniques</b>	Toux occasionnelle Contre-performance  Les signes sont chroniques (durée d'au moins 4 semaines)	Toux fréquente Intolérance à l'exercice Dyspnée  Les signes et leur gravité peuvent varier dans le temps, limitant souvent l'activité
<b>Environnement</b>	Vivant dans un lieu confiné (écuries, box)	Exposition à la poussière ou aux allergènes dans l'écurie ou au pâturage

IAD : Inflammatory airways disease ; RAO : Recurrent Airways Obstruction. *Tableau adapté de Couetil et al., 2016.*

Les affections respiratoires regroupent tous les troubles respiratoires qui peuvent atteindre un individu, qu'elles soient d'origine génétique, environnementale ou infectieuse.

De multiples affections respiratoires, des voies supérieures ou inférieures, peuvent toucher le cheval et en particulier l'athlète [Richard, 2015]. Par exemple, l'hémorragie pulmonaire induite par l'exercice (HPIE) touche la quasi-totalité des chevaux de course pendant leur carrière [Fano, 2021]. L'HPIE est induite par un effort intense et les signes cliniques associés sont l'épistaxis (saignement de nez), la contre-performance et parfois la toux à l'effort [Birks *et al.*, 2003]. La sensibilité accrue à l'HPIE ne semble pas associée à la présence d'agents microbiens, mais pourrait être liée au capital génétique du cheval [Boudreaux *et al.*, 2015 ; Hinchcliff *et al.*, 2015 ; Blott *et al.*, 2019].

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous concentrerons sur les affections respiratoires inflammatoires et infectieuses chez le cheval.

### 1.1. Inflammations respiratoires équines

Les deux syndromes principaux liés à l'inflammation des voies respiratoires équines sont l'asthme modéré et sévère, anciennement nommés respectivement maladie inflammatoire des voies respiratoires (« Inflammatory airways disease », IAD) et obstruction récurrente des voies respiratoires (« Recurrent Airways Obstruction », RAO) [Couetil and Thompson, 2020]. La prévalence décrite est variable selon les populations étudiées, mais l'asthme équin toucherait 80 à 90 % des chevaux de course au cours de leur vie [Couetil *et al.*, 2021]. Les caractéristiques principales de ces deux affections sont données dans le **Tableau 1**. Un cheval ayant de l'asthme modéré peut basculer vers de l'asthme sévère en cas de maintien d'une situation ou d'un environnement problématique pour le système respiratoire. Néanmoins, la majorité des chevaux développant de l'asthme modéré semble récupérer leurs fonctions respiratoires sans aggravation [Couetil *et al.*, 2016].

L'asthme chez le cheval est une manifestation multifactorielle débutant par une inflammation des voies respiratoires inférieures. Cette inflammation se traduit par une augmentation de la proportion de cellules immunitaires, notamment des neutrophiles, dans les voies respiratoires inférieures [Couetil and Thompson, 2020]. Les poussières, et particulièrement des éléments allergènes constitutifs (e.g. endotoxines,  $\beta$ -glucan), sont très fréquemment impliquées dans l'asthme chez le cheval [Pirie, 2014]. Cependant, d'autres facteurs, tel qu'un stress pulmonaire récurrent ou des polluants atmosphériques comme l'ozone, sont associés à la survenue de l'asthme [Rush and Mair, 2006]. L'âge, l'héritage génétique et un environnement confiné tel que les écuries sont des éléments favorisant l'asthme chez le cheval [Couetil *et al.*, 2020]. Les chevaux souffrant d'asthme sévère présentent une aggravation de

leurs signes cliniques lorsqu'ils sont exposés à certains éléments, comme les moisissures, provenant du foin et de la litière [Pirie, 2014].

Actuellement, l'implication de certains micro-organismes n'est pas clairement définie dans l'apparition ou l'aggravation de l'asthme malgré la détection de certaines espèces chez des animaux symptomatiques. L'espèce *Streptococcus equi* subspecies (*subsp.*) *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) a été associée à la présence d'inflammation dans les voies respiratoires de chevaux à l'entraînement [Chapman *et al.*, 2000]. De plus, le risque d'avoir de l'asthme modéré a été corrélé à la charge de *S. zooepidemicus* détectée chez les chevaux porteurs [Wood *et al.*, 2005]. Également, les genres *Pasteurella* et *Actinobacillus* sont suspectés d'être liés à l'apparition d'inflammation et d'asthme chez le cheval [Wood *et al.*, 1993, 2005]. Les études les plus récentes tendent vers une étiologie multi-bactérienne [Bond *et al.*, 2017]. Par ailleurs, une étude portant sur 731 chevaux, en Belgique, a montré que les chevaux porteurs d'éléments fongiques au niveau de la sphère respiratoire étaient deux fois plus à risque de déclencher de l'asthme modéré [Dauvillier *et al.*, 2019].

## 1.2. Infections respiratoires équinnes

Parmi les affections respiratoires, les infections respiratoires se distinguent par le fait qu'elles sont causées par un ou plusieurs micro-organismes (virus, bactéries, *Fungi*) pathogènes.

### 1.2.1. Infections virales

#### a) Grippe équine

Le virus de la grippe équine (« Equine Influenza Virus », EIV) est un virus à ARN dont le génome est segmenté en huit éléments, ce qui lui confère un haut potentiel de recombinaison. Les signes cliniques de la grippe équine comprennent une hyperthermie, du jetage nasal séreux et de la toux. Les souches virales équinnes identifiées historiquement sont de deux types, les souches H7N7 et H3N8 (H pour hémagglutinine et N pour neuraminidase), avec une détection exclusive aujourd'hui du type H3N8 au niveau mondial [Gilkerson *et al.*, 2015 ; Oladunni *et al.*, 2021]. Ce virus est responsable de nombreuses épidémies à travers le monde à cause de sa capacité à se propager rapidement. En France, une épidémie de grippe équine a eu lieu en 2015 [Fougerolle *et al.*, 2017], malgré l'existence d'une obligation vaccinale pour les chevaux participant à des compétitions équestres depuis 2013 [Richard, 2015]. La dernière épidémie d'EIV, en Europe, a eu lieu de 2018 à 2019. Elle a touché de nombreuses structures au Royaume-Uni, en Irlande et en France, provoquant l'arrêt des compétitions pendant plusieurs semaines [Oladunni *et al.*, 2021]. Les chevaux symptomatiques étaient aussi bien des chevaux vaccinés que non-vaccinés. Néanmoins, la gravité des signes cliniques était moindre chez les chevaux

ayant eu un schéma vaccinal complet (trois injections en moins de six mois). En France, un rappel annuel ou semi-annuel est réalisé pour les chevaux participant à des compétitions [Carnet, 2023].

#### *b) Infection à Herpèsvirus*

Les herpèsvirus sont des virus à ADN double brin, enveloppés, capables d'infecter de nombreuses espèces animales. Au niveau du tractus respiratoire, quatre herpèsvirus équins (« Equine Herpes Viruses », EHV) sont régulièrement identifiés, EHV-1, 2, 4 et 5. Les alpha herpèsvirus, EHV-1 et EHV-4 ont été associés à des épizooties respiratoires [Reed and Toribio, 2004]. EHV-1 est également responsable d'avortements et, moins fréquemment, de maladies neurologiques [Ma et al., 2013]. Le terme rhinopneumonie est utilisé pour caractériser la pathologie respiratoire provoquée par EHV-1 ou 4 [Richard, 2015]. Les signes cliniques de la rhinopneumonie sont un écoulement nasal séreux abondant, des ganglions lymphatiques sous-mandibulaires élargis, de la fièvre et de la dyspnée. Après la première infection, le cheval peut rester porteur du virus sous forme latente. Plusieurs travaux de recherche ont montré que le virus en latence était principalement établi et maintenu dans les tissus lymphoïdes et les lymphocytes circulants [Ma et al., 2013]. Le virus est capable par la suite de se réactiver, mais les mécanismes liés à sa réactivation ne sont pas encore clairement établis [Bueno et al., 2020].

Les gamma herpèsvirus équins, EHV-2 et 5, sont régulièrement détectés, au niveau mondial, chez des chevaux présentant des signes cliniques respiratoires et chez des individus sains [Hartley et al., 2013 ; Scheurer et al., 2021]. L'EHV-2 a été associé à des pneumopathies de poulains en Hongrie [Pálfi et al., 1978]. Une infection expérimentale avec une souche d'EHV-2, réalisée à LABÉO en 2013, a montré une augmentation significative de la proportion des neutrophiles entre deux et trois semaines après l'infection [Fortier et al., 2013]. Une étude longitudinale a montré que ce virus est associé à l'apparition de toux et d'excès de mucus trachéal. L'EHV-5 n'a, quant à lui, été associé à aucun trouble alors qu'il était détecté dans 90,9 % des prélèvements des voies respiratoires supérieures [Doubli-Bounoua et al., 2016]. L'EHV-2 semble donc être étroitement associé à l'inflammation et la présence de signes cliniques respiratoires chez les jeunes chevaux, tandis que l'EHV-5 est plutôt responsable d'une infection persistante sans signes cliniques associés.

#### *c) Infection à Rhinovirus*

Les rhinovirus (« Equine RhinoVirus », ERV), A et B, sont des virus à ARN simple brin [Horsington et al., 2013]. Leur rôle dans les infections respiratoires n'est pas encore clair, puisqu'ils sont détectés aussi bien chez des chevaux sains que malades [Bernardino et al., 2021]. Dans une étude sérologique cas-témoins, l'ERVA a été associé à la présence d'asthme équin [Houtsma et al., 2015]. Une association significative entre la détection de ERVB et la présence de toux a été démontrée [Doubli-Bounoua et

*al.*, 2016]. Une étude américaine sur 32 chevaux a montré que l'ERVB était principalement retrouvé dans les voies respiratoires supérieures, sa détection pouvant être associée à de l'inflammation [Couetil *et al.*, 2021]. Cependant, dans cette étude, la présence de l'ERVB a également été associée à une plus grande proportion de poussière dans l'environnement. Toujours aux Etats-Unis, une étude rétrospective sur l'ERVB a montré une prévalence supérieure de ce virus chez les chevaux symptomatiques [Bernardino *et al.*, 2021].

#### *d) Artérite virale équine*

Le virus de l'artérite virale équine (« Equine viral arteritis », EVA) est un virus à ARN enveloppé responsable d'infections respiratoires (hyperthermie, jetage, larmolement) et génitales (avortements) [Timoney and McCollum, 1993]. Ce virus est souvent détecté chez des chevaux asymptomatiques qui restent capables de transmettre l'agent infectieux. C'est la raison de sa surveillance au niveau international [Balasuriya, 2014]. En 2007, le virus de l'EVA, non détecté avant saillie dans la semence d'un étalon, a conduit à sa dissémination dans toute la Normandie (18 élevages) et a provoqué une large épizootie (mort de sept chevaux sur 43 individus détectés positifs) [Pronost *et al.*, 2010]. Toujours en France, une étude épidémiologique réalisée sur les résultats des tests sérologiques de juments déclarées positives au virus de l'EVA a permis d'estimer un total de 287 épizooties dues à ce virus entre 2006 et 2012, confirmant la circulation de ce pathogène sur le territoire national [Amat *et al.*, 2016].

#### *e) Infection à Adénovirus 1*

L'adénovirus équin de type 1 (« Equine adenovirus type 1 », EAdV-1) est un virus à ADN double brin dont l'infection est le plus souvent subclinique ou associée à des maladies bénignes des voies respiratoires supérieures [Ataseven *et al.*, 2012]. Les signes cliniques d'une infection par l'EAdV-1 comprennent un écoulement nasal, de la toux, une augmentation de la taille d'un ganglion sous-mandibulaire et de la fièvre [Lee *et al.*, 2022]. Chez les poulains arabes et pur-sang, des infections par l'EAdV-1 ont été signalées comme pouvant entraîner une pneumonie sévère, parfois fatale [Cavanagh *et al.*, 2012]. En France, l'étude de Doubli-Bounoua montre une incidence à 1,9 % pour ce virus [Doubli-Bounoua *et al.*, 2016].

### 1.2.2. Infections bactériennes

Les infections bactériennes respiratoires chez le cheval peuvent impacter différentes zones du tractus respiratoire et impliquer un ou plusieurs genres et/ou espèces.

#### a) La gourme

L'espèce *S. equi* subsp. *equi* (*S. equi*) provoque une infection caractéristique des poches gutturales du cheval, nommée gourme (« strangle » en anglais). Des cas de gourme sont régulièrement mis en évidence à travers le monde et posent de graves problèmes économiques pour les structures touchées [Waller, 2014]. Cette infection se caractérise par une montée brusque de la fièvre, une inflammation du pharynx, et la formation d'abcès dans les ganglions lymphatiques [Boyle *et al.*, 2018]. La gourme peut être déclarée par des chevaux de tout âge, les plus jeunes ayant généralement des signes cliniques plus intenses [Sweeney *et al.*, 2005]. Le taux de morbidité de l'infection à *S. equi* dans un troupeau de poulains peut atteindre plus de 90 % et son taux de mortalité est compris entre 8 et 10 % [Boyle *et al.*, 2018]. Après avoir été contaminé par *S. equi*, certains individus peuvent devenir porteurs asymptomatiques de la bactérie pendant plusieurs mois voire plusieurs années [Pringle *et al.*, 2019]. Ces individus « porteurs silencieux », sont d'importants réservoirs de *S. equi*, et des acteurs clés dans la transmission de la gourme à des groupes de chevaux indemnes [Pringle *et al.*, 2019]. Les méthodes sérologiques, l'analyse des signes cliniques et des marqueurs de l'inflammation ne suffisent pas à distinguer les individus porteurs asymptomatiques des non-infectés [Pringle *et al.*, 2020]. La pathogénicité de *S. equi* est expliquée par ses nombreux facteurs de virulence lui permettant d'adhérer aux cellules, de moduler le système immunitaire de l'hôte, et surtout, d'évoluer [McLinden *et al.*, 2023].

#### b) La rhodococcose

*Rhodococcus (R.) equi*, anciennement appelée *Corynebacterium equi*, est une bactérie gram positive en forme de coccobacille, responsable de la rhodococcose. Cette infection touche majoritairement des poulains âgés d'un à six mois [Giguère and Prescott, 1997]. La rhodococcose est l'une des principales causes de problèmes de santé chez les poulains avant le sevrage [Rakowska *et al.*, 2020]. Elle se manifeste le plus souvent par une bronchopneumonie suppurée chronique avec formation d'abcès sous-cutanés et/ou pulmonaires et une hypertrophie des ganglions lymphatiques [Zink *et al.*, 1986]. La virulence de *R. equi* est associée à la présence du gène *VapA* sur un plasmide de 80 à 85 Kb, permettant la survie de la souche compétente à l'intérieur des macrophages [Vázquez-Boland and Meijer, 2019].

#### c) La pneumonie bactérienne

La pneumonie bactérienne est une infection respiratoire qui survient à la suite d'un événement compromettant le système immunitaire comme une infection virale, du stress ou de la malnutrition [Reuss and Giguère, 2015].

► **Tableau 2** : Agents bactériens liés à des pneumonies chez le cheval.

BACTÉRIES GRAM – NON-ENTÉRIQUES	BACTÉRIES GRAM - ENTÉRIQUES	BACTÉRIES GRAM + AÉROBIES	BACTÉRIES ANAÉROBIES
<i>Pasteurella</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	Streptocoques β-hémolytiques	<i>Bacteroides</i> spp.
<i>Actinobacillus</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.
<i>Bordetella</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Fusobacterium</i> spp.
			<i>Prevotella</i> spp.

Tableau adapté de Reuss et Giguère, 2015.

► **Tableau 3** : Agents fongiques liés à des infections respiratoires chez le cheval.

FUNGI PATHOGÈNE PRIMAIRE	FUNGI PATHOGÈNE OPPORTUNISTE
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Aspergillus</i> spp
<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Candida</i> spp.
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Fusarium</i> spp
<i>Conidiobolus coronatus</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>

Tableau adapté de Stewart et Cuming, 2015.

La primo-infection ou l'événement stressant va induire une dégradation de la clairance muco-ciliaire, qui repose sur la production de mucus et le mouvement coordonné des cils vibratiles présents dans les bronches, ayant pour fonction de protéger les poumons des particules nuisibles [Rush and Mair, 2006]. L'altération de la clairance muco-ciliaire va permettre aux bactéries inspirées par le cheval ou présentes dans la flore du tractus respiratoire de se développer dans les voies respiratoires inférieures et provoquer la maladie.

Si cette infection est localisée sur les membranes pulmonaires, une réaction inflammatoire peut entraîner la déclaration d'une pleuropneumonie [Reuss and Giguère, 2015]. Dans le cas d'une infection localisée, dans les poumons, l'infection bactérienne peut conduire à la formation d'un abcès [Mair and Lane, 1989].

Les signes cliniques généralement associés aux pneumonies bactériennes incluent le jetage nasal, la toux, la tachypnée, la détresse respiratoire et la fièvre [Reuss and Giguère, 2015].

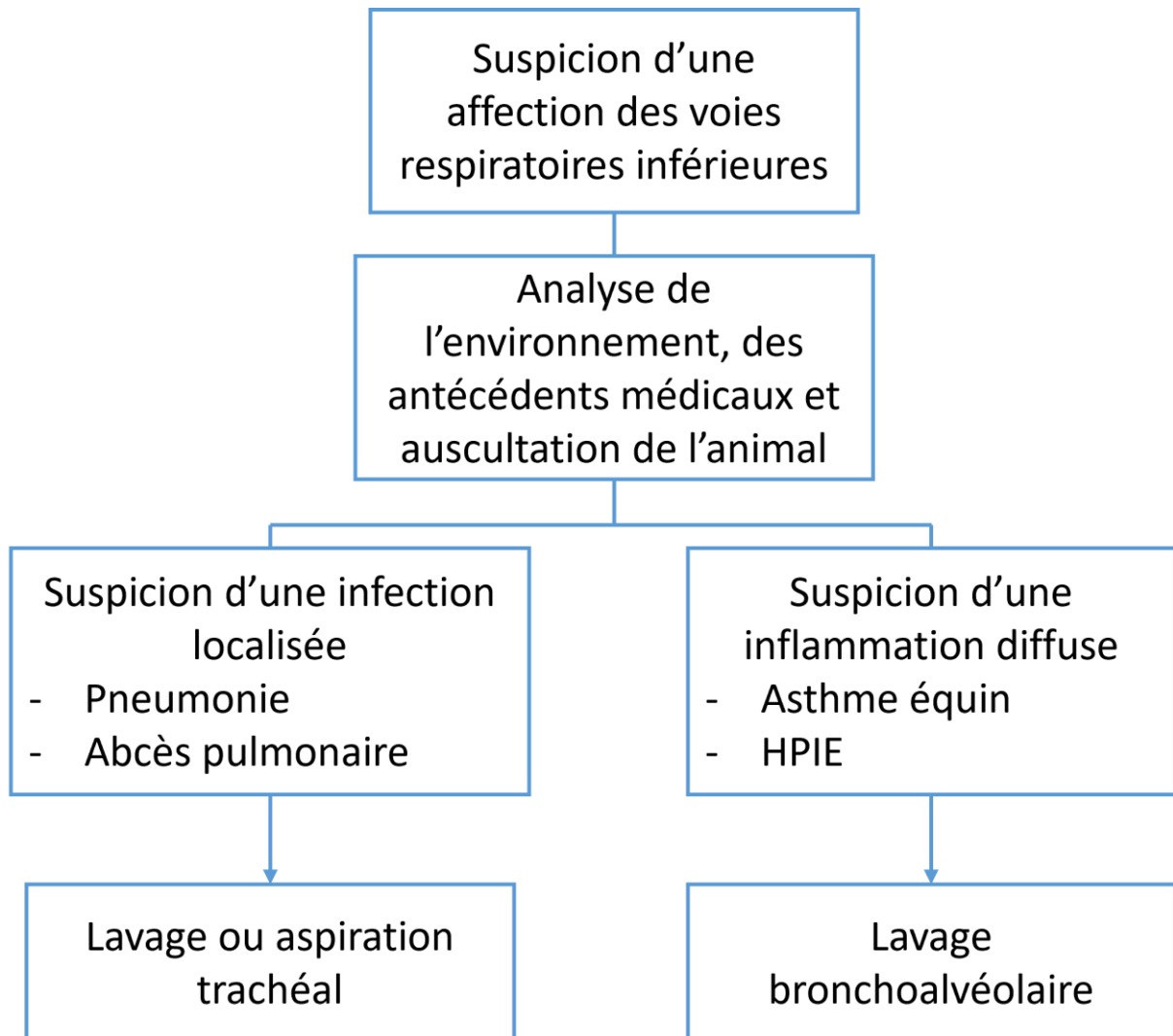
De nombreux genres bactériens ont été décrits comme potentiellement liés à l'apparition de pneumonies (**Tableau 2**). L'espèce *S. zooepidemicus* est la plus détectée dans les cas de bronchopneumonies chez le cheval [Carvallo *et al.*, 2017]. *S. zooepidemicus* possède une grande partie des facteurs de virulence décrits chez *S. equi* puisque ces deux espèces bactériennes ont 97 % d'homologie génomique [McLinden *et al.*, 2023]. Bien que qualifiée d'opportuniste, cette bactérie a été rapportée comme responsable d'une épizootie dans une population indemne en Islande en 2010 [Björnsdóttir *et al.*, 2017].

Cependant, la pneumonie chez le cheval n'est pas forcément la résultante d'une infection par un seul et unique genre et/ou espèce bactérienne [Rahman *et al.*, 2022]. Il a été montré que dans la majorité des cas de pneumonies, différentes espèces sont isolées [Racklyeft and Love, 2000].

### 1.2.3. Infections fongiques

Bien que des éléments fongiques soient régulièrement observés dans les voies respiratoires équinnes [Lemonnier *et al.*, 2023], ils n'induisent que peu fréquemment des infections. Cependant, lorsqu'elles surviennent, elles peuvent être très délétères et induire soit une mycose des poches gutturales, soit différentes formes de pneumonie [Stewart and Cuming, 2015]. Dans les voies respiratoires inférieures, ces éléments fongiques conduisent à des signes respiratoires tels que la toux, le jetage nasal et la dyspnée. De nombreuses espèces fongiques ont été associées à des infections respiratoires équinnes des chevaux immunocompétents ou non (**Tableau 3**).





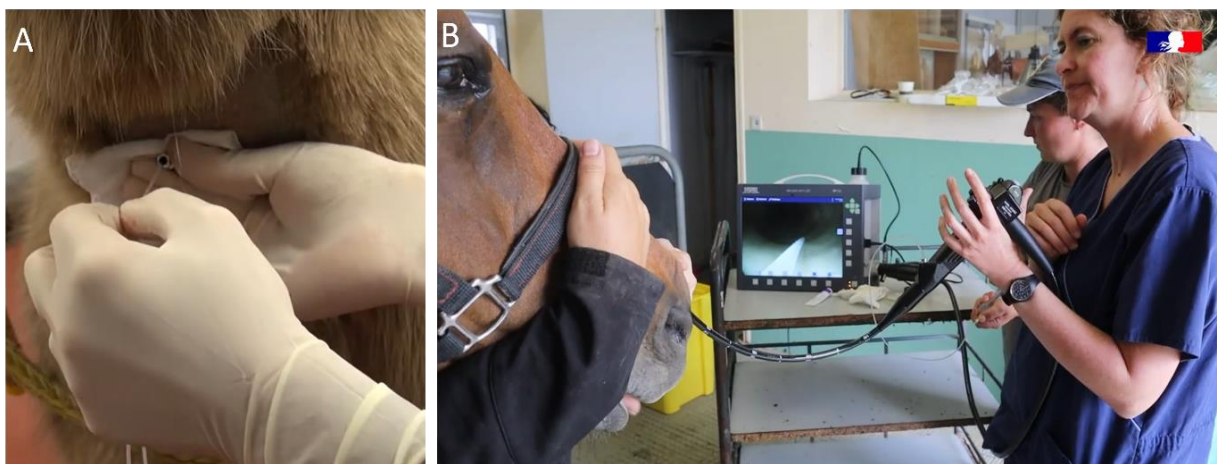
► **Figure 2** : Arbre de décision illustrant les facteurs influençant la méthode d'échantillonnage pour le tractus respiratoire inférieur. HPIE : Hémorragie Pulmonaire Induite par l'Exercice. Figure inspirée de Hewson and Arroyo, 2015 et Couetil et al. 2020.

### 1.3. Approches diagnostiques

La démarche diagnostique pour identifier les affections respiratoires équine est basée sur l'expertise clinique des vétérinaires sur le terrain, combinée à des analyses en laboratoire. L'observation des signes cliniques chez l'animal en tenant compte de son histoire de vie constitue la première approche diagnostique du clinicien [Hewson and Arroyo, 2015]. Le lieu de vie du cheval doit également être pris en compte, tant certains facteurs environnementaux sont impliqués dans le développement des troubles respiratoires [Couetil *et al.*, 2020]. Comme évoqué précédemment, les signes cliniques clés des affections respiratoires sont la toux, le jetage et la dyspnée, qui sont accompagnés d'hyperthermie en cas d'infection. D'autres signes tels que les bruits respiratoires anormaux, la contre-performance et l'épistaxis, peuvent aussi être associés. La présence, d'un ou plusieurs de ces signes, permet au praticien d'orienter son diagnostic et donc de conditionner le(les) prélèvement(s) qu'il réalisera.

#### 1.3.1. Les prélèvements

En test de première intention, la prise de sang constitue la méthode la moins invasive. L'analyse de paramètres sanguins permet de mettre en évidence un processus infectieux et/ou inflammatoire [Roy and Lavoie, 2003]. Les virus infectant le plus souvent le tractus respiratoire supérieur, leur présence est souvent recherchée après réalisation d'un écouvillon nasopharyngé [Doubli-Bounoua *et al.*, 2016]. Les écouvillons utilisés pour ce type de prélèvement chez le cheval font 40 cm de long afin de permettre le contact avec les voies respiratoires supérieures. La recherche de virus peut également être effectuée dans des liquides respiratoires lorsqu'il s'agit d'atteintes plus profondes. Le lavage trachéal (LT) et le lavage broncho-alvéolaire (LBA) sont les deux prélèvements effectués lors de suspicion d'un trouble respiratoire des voies inférieures (**Figure 2**). Les deux prélèvements peuvent être pratiqués sur le même animal afin d'obtenir une image globale des agents infectieux présents et du niveau d'inflammation dans le tractus respiratoire inférieur.



► **Figure 3** : Pratique d'un lavage trachéal par voie transtrachéale (A) et endoscopique (B). (A) Insertion du cathéter à travers la trachée après rasage de la zone, décontamination et incision à l'aide d'une aiguille pour pratiquer un lavage transtrachéal. Photo tirée des vidéos présentées dans Couetil et Thompson, 2020. (B) Pratique du LT par voie endoscopique. Photo tirée de la vidéo « Mycopab – caractérisation des mycoplasmes des affections respiratoires du cheval », effectuée au cours du projet MYCOPAB dans le cadre de prélèvements terrain ; <https://www.youtube.com/watch?v=SBresZ-inqE>, consultée le 09/10/2023.

Le lavage (ou l'aspiration) trachéal peut être fait par voie transtrachéale (LTT ou ATT), ou par voie nasale à l'aide d'un endoscope (LT ou AT) (**Figure 3**). La première nécessite une incision qui peut conduire à des abcès sous-cutanés, mais reste la méthode la plus économique (**Figure 3A**).

Avant de pratiquer le LT et le LBA, les animaux sont tranquilisés (xylazine, butorphanol), pour protéger l'animal et le praticien de tous mouvements brusques. Lors de signes cliniques trop importants chez l'animal ausculté, l'injection du sédatif peut aggraver l'état de l'animal. Certains praticiens vont alors préférer initier un traitement selon leurs premières observations.

Pour le LT, l'utilisation d'un endoscope permet d'obtenir des images de l'intérieur de la trachée. Grâce à elles, le praticien est guidé pendant toute la durée de son prélèvement. Il peut également évaluer la quantité de mucus trachéal, dont l'abondance est associée à certaines affections respiratoires comme l'asthme [Couetil *et al.*, 2016]. Pour pratiquer un LT, l'endoscope est inséré par l'une des cavités nasales jusqu'au nasopharynx (**Figure 3**). Le cathéter est avancé hors de l'endoscope lorsque ce dernier atteint la région proximale de la trachée. Une fois cette position atteinte dans l'appareil respiratoire, entre 20 et 50 mL de solution saline stérile sont instillés dans la trachée. L'endoscope est alors avancé dans la trachée jusqu'à être en amont de l'accumulation de liquide. Le liquide est aspiré à travers le cathéter, sans que l'endoscope ne touche le liquide. Enfin, le cathéter est remonté et l'endoscope retiré. Malgré ces précautions, les prélèvements trachéaux peuvent être contaminés par des micro-organismes présents dans le pharynx si le cheval tousse pendant la manipulation [Couetil and Thompson, 2020].

Comme pour le LT, il y a deux façons de réaliser un LBA. La première méthode utilise seulement une sonde (méthode à l'aveugle) et la seconde nécessite l'utilisation d'un endoscope qui est inséré dans un naseau du cheval jusqu'à la carène trachéale. Afin de pratiquer un LBA, la sonde est insérée par les cavités nasales jusqu'au nasopharynx tout en insérant l'endoscope dans l'autre naseau le cas échéant. Après avoir franchi le larynx, la progression se poursuit à l'intérieur de la trachée jusqu'à atteindre l'embranchement terminal qui conduit aux poumons. À ce stade, la sonde est déplacée dans une bronche principale, suivie du retrait de l'endoscope. Ensuite, la sonde est avancée jusqu'à rencontrer un blocage dans une bronchiole. Une quantité totale de 250 mL de solution saline est administrée de manière séquentielle en utilisant cinq seringues de 50 mL, alternant entre instillation et aspiration. Enfin, la sonde et l'endoscope sont soigneusement retirés.

Pour des infections particulières comme la gourme ou certaines mycoses, un lavage des poches gutturales est préconisé, pratiqué de façon similaire à un LT [Hewson and Arroyo, 2015].

En cas de pleuropneumonie, l'analyse conjointe d'un LT et du liquide pleural est conseillée pour identifier les agents mis en cause. La procédure de collecte du liquide pleural implique que le cheval soit tranquilisé. Le vétérinaire insère ensuite une aiguille ou un cathéter, connecté à un système de drainage, à travers la paroi et dans la cavité thoracique, guidé par échographie ou radiographie. Le liquide pleural peut alors lentement être évacué [Hewson and Arroyo, 2015].

Quel que soit le prélèvement effectué, il doit rapidement être acheminé vers un laboratoire d'analyse. En effet, le temps entre le prélèvement et l'analyse peut influencer la qualité des échantillons et donc la justesse des résultats obtenus [Hewson and Arroyo, 2015]. Également, la température de l'échantillon doit, dans l'idéal, être contrôlée durant l'acheminement pour empêcher la dégradation des cellules et la prolifération de bactéries [Pickles *et al.*, 2002].

### 1.3.2. Analyses de laboratoire

Elles sont prescrites par le vétérinaire à la suite de son examen clinique sur les prélèvements qu'il aura jugé nécessaires de réaliser.

#### a) Analyses sanguines

Sur un prélèvement sanguin, différents tests peuvent être pratiqués par les laboratoires de diagnostic.

Par méthode d'immunoabsorption par enzyme liée (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA), il est possible de montrer la présence de marqueurs de l'inflammation comme le serum amyloid A (SAA), qui présente une augmentation en cas de troubles inflammatoires ou infectieux [Long and Nolen-Walston, 2020]. Également, la numération de la formule sanguine, qui vise à compter et classer les différents composants du sang par cytométrie en flux, permet un regard global sur la concentration des cellules. La présence conséquente de fibrinogène (marqueur de l'inflammation) et la leucocytose sont les résultats les plus courants chez les chevaux atteints d'une maladie infectieuse des voies respiratoires qui dure depuis plusieurs jours. Les patients atteints d'affections chroniques peuvent également présenter une anémie et/ou une hyperprotéïnémie (due à l'augmentation du nombre d'anticorps dans le sang). Inversement, les chevaux atteints de maladies aiguës peuvent présenter une diminution du nombre de globules blancs en raison de leur émigration rapide vers le site de l'infection. Bien que les chevaux atteints d'une maladie infectieuse présentent souvent des modifications hématologiques, un bilan sanguin normal ne doit pas exclure complètement la possibilité d'une septicémie [Roy and Lavoie, 2003].

Les techniques de sérologie permettent de mesurer les anticorps circulants dirigés spécifiquement contre une espèce de micro-organisme. Cette méthode de détection indirecte ne permet pas de confirmer la présence de l'agent infectieux ciblé et se trouve dépendante de la réponse immunitaire de l'individu. La mise en évidence d'une augmentation du taux d'anticorps, preuve d'une infection en cours, est réalisée par l'analyse de deux prélèvements à dix jours d'intervalle [Boyle *et al.*, 2018]. L'utilisation de vaccins comme ceux prescrits pour la grippe équine (paragraphe 1.2.1.a) peut engendrer la détection d'anticorps circulants chez des chevaux indemnes par méthode de sérologie classique. Le test ELISA par différenciation de l'animal infecté de l'animal vacciné (« Differentiating Infected from Vaccinated Animals », DIVA) pour la grippe équine, permet de distinguer les anticorps générés par le vaccin de ceux produits après une infection par le virus [Galvin *et al.*, 2013].

#### *b) Cytologie*

Dans les liquides respiratoires, le pourcentage des différentes cellules immunitaires permet d'évaluer le niveau d'inflammation [Couetil *et al.*, 2016]. La procédure consiste à prendre un volume précis d'échantillon, le centrifuger pour isoler les cellules immunitaires, et faire leurs numérations [Orard *et al.*, 2016]. Le taux de neutrophiles chez un cheval sain n'excède pas 20 % dans le LT et 5 % dans le LBA [Rossi *et al.*, 2018]. Un cheval avec des taux supérieurs à ces limites dans l'un des prélèvements est considéré comme atteint d'inflammation respiratoire. L'analyse cytologique peut également permettre d'identifier des infections bactériennes ou fongiques [Couetil and Thompson, 2020 ; Lemonnier *et al.*, 2023].

#### *c) Culture*

La culture sur milieu gélosé est employée pour la détection de la plupart des bactéries issues de prélèvements respiratoires équins. Cette méthode nécessite différents milieux de culture pour optimiser la croissance d'un grand nombre de genres bactériens pouvant être impliqués dans les troubles respiratoires équins. Pour la plupart des agents bactériens, le temps d'apparition des colonies sur gélose est compris entre 24 et 48 h [Léon *et al.*, 2020 ; Lord *et al.*, 2022]. La charge de la (des) bactérie(s) présente(s) peut être évaluée par ensemencement de dilutions sériées du prélèvement initial. Un résultat est considéré comme positif pour une espèce ou un genre bactérien à partir d'un seuil de détection de 10 000 UFC/mL (UFC : Unité Formant Colonies). En dessous de ce seuil, les bactéries détectées sont considérées comme appartenant à la flore normale/saprophyte [Christley *et al.*, 2001 ; Kinoshita *et al.*, 2015 ; Laus *et al.*, 2009]. L'identification des bactéries isolées peut ensuite être réalisée grâce à des tests biochimiques/enzymatiques ou par l'utilisation de la technologie Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF), basée sur la caractérisation des protéines majoritaires [Léon *et al.*, 2020 ; Lord *et al.*, 2022].

L'isolement et l'identification du (des) souche(s) par culture donnent la possibilité, si le vétérinaire le souhaite, de déterminer pour chacune d'elle, leur profil de résistance *in vitro* aux antibiotiques par la réalisation d'un antibiogramme. Les résultats de cette analyse permettent ensuite d'orienter le praticien quant à sa prescription [Léon *et al.*, 2020].

Également, la recherche de moisissures et de levures peut être effectuée par culture sur milieux gélosés. Le prélèvement est alors directement déposé sur différents milieux (base Sabouraud) pouvant contenir un antibiotique pour éviter le développement de bactéries et/ou de l'actidione pour empêcher la croissance de dermatophytes, liés à des infections de la peau [Lemonnier *et al.*, 2023].

#### d) *Biologie moléculaire*

La réaction de polymérisation en chaîne (« Polymerase Chain Reaction », PCR) est une méthode couramment employée pour la détection d'agents pathogènes. D'ailleurs, la recherche des virus respiratoires équins est le plus souvent effectuée par PCR, tant la culture sur lignées cellulaires est complexe à mettre en œuvre [Doublé-Bounoua *et al.*, 2016]. Différentes études ont montré l'intérêt de détecter l'agent de la gourme, à l'aide d'une PCR quantitative ou qPCR conseillée par l'Association américaine des praticiens équins (AAEP) [Webb *et al.*, 2013 ; Knox *et al.*, 2023]. Pour *R. equi*, la PCR utilisée détecte le gène de virulence *VapA* porté par le plasmide et permet de différencier les souches en fonction de leur pathogénicité [Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2006].

L'amplification isotherme en boucle (« loop-mediated isothermal amplification », LAMP-PCR) est une technique récente et prometteuse permettant la détection d'agents pathogènes, directement sur le terrain. Cette méthode d'amplification de l'ADN utilise deux à six paires d'amorces par agent ciblé et se déroule à une température constante [Knox *et al.*, 2023]. Il est donc possible pour le vétérinaire d'obtenir des résultats en moins d'une heure, avec un matériel portatif, « au chevet du malade ». La sensibilité de cette technique est controversée pour des échantillons faiblement contaminés [Kinoshita *et al.*, 2015].

Le diagnostic de certitude des infections respiratoires repose donc sur une combinaison de méthodologies directes (culture et PCR). La culture est privilégiée pour les pathogènes de croissance simple ou pour lesquels des outils de biologie moléculaire sont inexistantes. La PCR quant à elle est utilisée pour les agents infectieux dont la culture est fastidieuse et longue. À LABÉO, la recherche des bactéries du genre *Mycoplasma* est effectuée par PCR temps-réel sur les prélèvements respiratoires reçus pour analyse depuis 2014. Depuis cette date, une prévalence de 15 à 20 % dans les prélèvements de type LT et LBA a été recensée. Cette proportion non négligeable a suscité l'intérêt porté à cet agent.

## 2. Bactéries du genre *Mycoplasma*

### 2.1. Taxonomie et phylogénie

Le premier mycoplasme (myco- : « *champignon* », -plasma : « *forme* » ; « *forme de champignon* ») détecté et étudié, a tout d'abord été nommé « microbe de la pleuropneumonie bovine », pour son association à cette pathologie respiratoire chez les bovins. Cette maladie, aujourd'hui appelée péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) est réglementée par l'OMSA (Organisation mondiale de la santé animale) à cause de sa contagiosité et de sa mortalité [Provost *et al.*, 1987]. L'agent de la PPCB a été cultivé pour la première fois, en France, en 1898 [Nocard and Roux, 1898]. Les auteurs ont fait face à plusieurs échecs d'isolement de ce microbe car les milieux de culture bactériens disponibles à l'époque n'étaient pas adaptés. Afin d'isoler cette souche, Nocard et Roux ont utilisé des sacs en collodion, contenant du bouillon de culture et du sérum d'un animal infecté, placé dans le péritoine de lapins sains. Cette méthode particulière, permettait le passage des nutriments du système sanguin de l'animal à l'intérieur du sac, créant des conditions propices à la croissance du mycoplasme.

En 1900, Dujardin-Beaumetz a mis en évidence le caractère « ultrafiltrable » de cette souche en la faisant passer par les filtres de Chamberland, capables de générer de l'eau pure [Chamberland, 1884 ; Dujardin-Beaumetz, 1900]. Cette découverte a entraîné une confusion sur la nature même du microbe de la pleuropneumonie bovine qui a été considéré dès lors comme un virus filtrable [Tang *et al.*, 1935]. En parallèle, Nowak, en cultivant cet agent pathogène sur milieu gélosé, a décrit des formes filaires entre les colonies ressemblant à des réseaux mycéliens et a donc proposé de le considérer comme un champignon [Nowak, 1929]. Ensuite, d'autres germes aux caractéristiques similaires ont été mis en évidence chez l'Homme et divers animaux [Bridré and Donatien, 1923 ; Dienes, 1940]. En 1948, l'emploi du microscope électronique a permis de mettre en évidence la présence d'une membrane et l'absence de paroi chez deux souches, regroupées sous le terme PPLO (pleuropneumonia-like organism) depuis les années 1930 [Smith *et al.*, 1948]. La présence d'une membrane cellulaire chez ces agents microbiens ainsi que la possibilité de les cultiver en milieu acellulaire a mis fin à leur description erronée en tant que virus.



► **Tableau 4** : Ordres, familles et genres appartenant à la classe des Mollicutes.

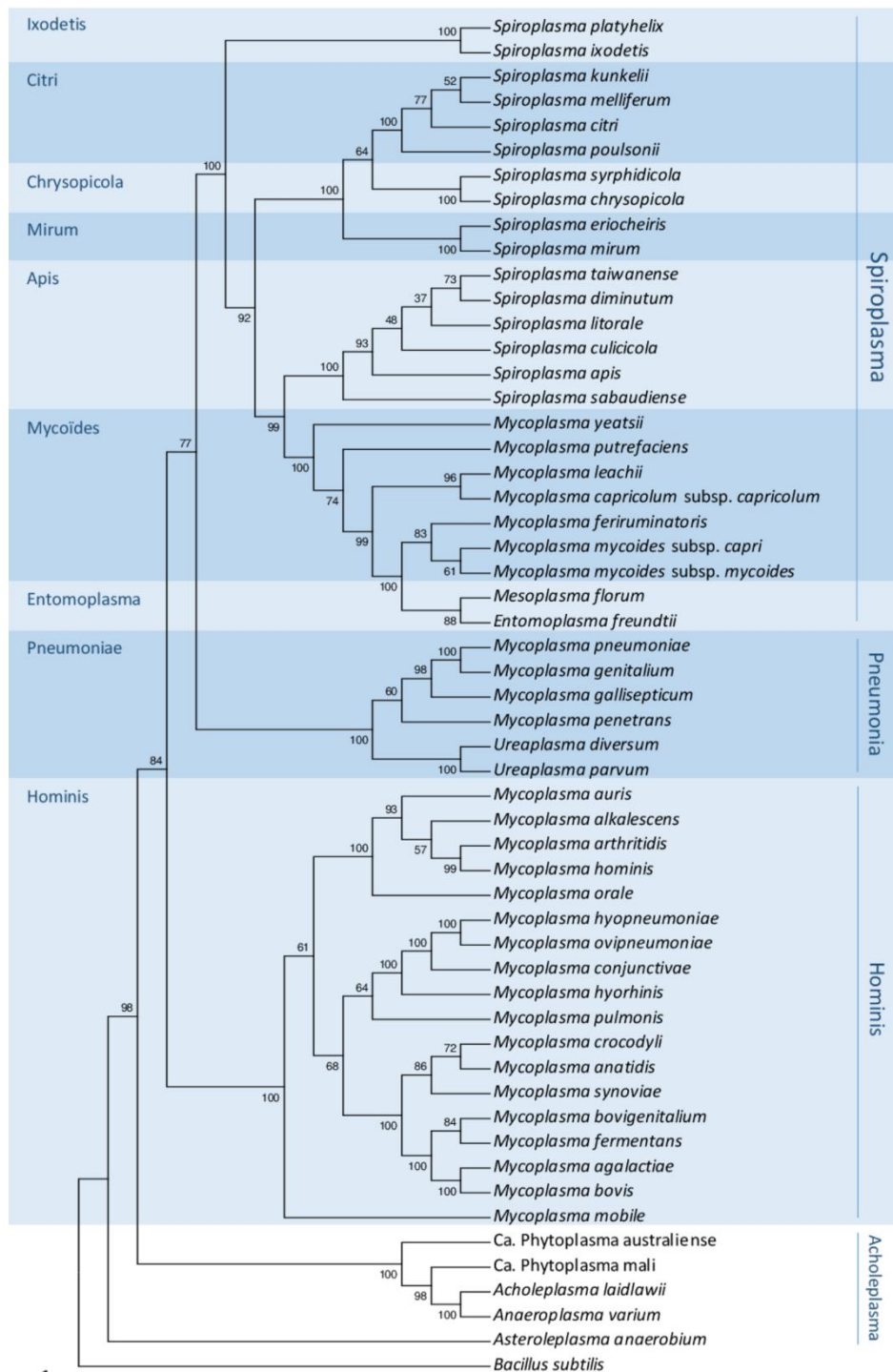
ORDRE	PHYLUM	GENRE	NOMBRE D'ESPÈCE(S)
<u>Mycoplasmatales</u>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>	<b>119</b>
		<i>Ureaplasma</i>	<b>7</b>
<u>Haloplasmatales</u>	<i>Haloplasmataceae</i>	<i>Haloplasma</i>	1
<u>Entomoplasmatales</u>	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Entomoplasma</i>	6
		<i>Mesoplasma</i>	12
	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>	<b>36</b>
<u>Acholeplasmatales</u>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i>	<b>15</b>
<u>Anaeroplasmatales</u>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasma</i>	4
		<i>Asteroleplasma</i>	1

Tableau adapté de Citti et al., 2018.

L'absence de paroi chez les PPLO a amené certains scientifiques à les considérer comme des bactéries de forme L, autrement dit des bactéries ayant perdu leur paroi après un traitement antibiotique ou thermique [Dienes and Weinberger, 1951].

Le nom *Mycoplasma* a été officiellement adopté en 1955 et l'agent de la pleuropneumonie contagieuse bovine a permis de définir l'espèce type du genre, *Mycoplasma (M.) mycoides* [Freundt, 1955 ; Edward and Freundt, 1956]. Par la suite, les PPLO, dont les bactéries du genre *Mycoplasma*, ont été catégorisés dans la classe des *Mollicutes*, en dehors des Eubactéries [Edward *et al.*, 1967].

En 1989, Weisburg et son équipe ont séquencé les gènes codants l'ARNr 16S de 47 espèces de *Mollicutes* permettant la première analyse phylogénétique de cette classe [Weisburg *et al.*, 1989]. Cette étude a montré que les *Mollicutes* possèdent un ancêtre commun avec certaines bactéries à Gram positif, proches du genre *Clostridium*, les catégorisant définitivement comme des bactéries à part entière. Aujourd'hui, la classe des *Mollicutes* comprend plus de 200 espèces bactériennes (**Tableau 4**).



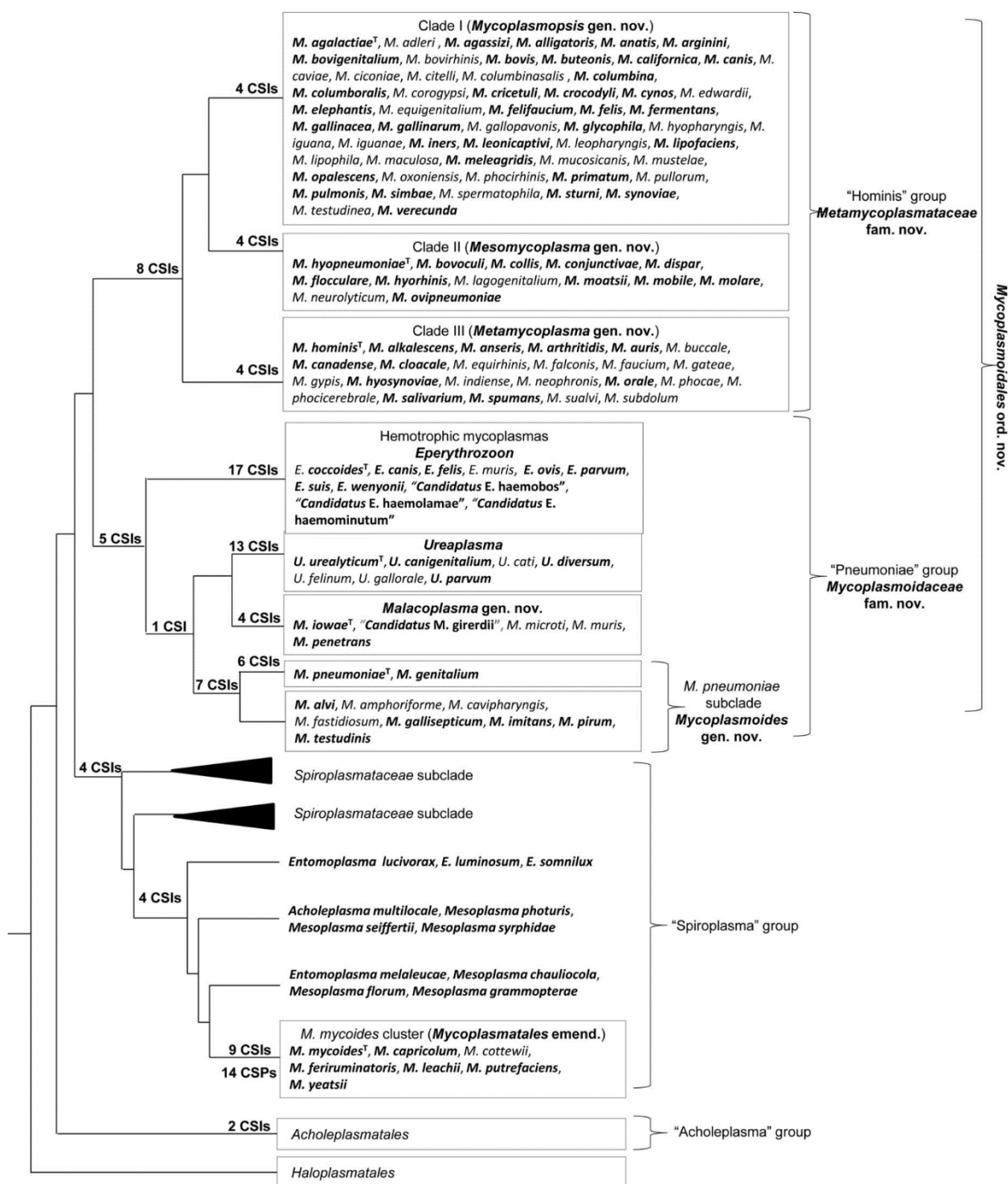
► **Figure 4 :** Arbre phylogénétique de certaines espèces de la classe des Mollicutes. L'arbre phylogénétique a été construit à partir de l'alignement multiple des séquences de l'ADNr 16S et obtenu par la méthode du plus proche voisin (Neighbour-Joining method). A chaque embranchement une valeur de bootstrap est indiquée (500 sous-ensembles ici). L'espèce *Bacillus subtilis* a été choisie pour enraciner l'arbre. Les « clusters » phylogénétiques sont indiqués sur la gauche de l'arbre et les groupes à droite. *Figure et légende adaptées de Citti et al., 2018.*

L'analyse de Weisburg a également permis de classer les *Mollicutes* à travers différents groupes, eux-mêmes sous-divisés en « clusters » représentés par une espèce (**Figure 4**). Trois groupes rassemblent les bactéries du genre *Mycoplasma* : Pneumoniae, Hominis et Spiroplasma, contenant respectivement les « clusters » Hominis (*M. hominis*), Pneumoniae (*M. pneumoniae*) et Mycoides (*M. mycoides*).

En 2001, Neimark et collaborateurs, à la suite d'analyses de l'ADNr 16S, proposent que les bactéries des genres *Haemobartonella* et *Epeythrozoon* soient ajoutées au genre *Mycoplasma* [Neimark *et al.*, 2001, 2002]. Ces deux genres bactériens sont composés d'espèces hémotrophes, exemptes de paroi, non cultivables en milieu acellulaire et proches génétiquement du genre *Mycoplasma*. Ces espèces, comme *M. ovis*, sont aujourd'hui rassemblées dans le groupe Pneumoniae et forment un « cluster » à part entière [Brown *et al.*, 2018].

En 2009, la taxonomie du « cluster » Mycoides est révisée sur la base d'analyses génétiques. Les deux biotypes nommés en fonction de la taille de leurs colonies sur gélose ; *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (small colonies) et LC (large colonies), sont séparés en deux sous espèces : *M. mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*) (responsable de la PPCB) et *M. mycoides* subsp. *capri* [Manso-Silván *et al.*, 2009]. Durant cette même étude, Manso-Silván et collaborateurs ont pu regrouper un ensemble de souches sous le nom de « *Mycoplasma* sp. Bovine group 7 » au sein d'une nouvelle espèce, nommée *M. leachii*. De plus, grâce aux avancées des analyses génétiques, en particulier celles basées sur la génomique, le « cluster » Mycoides a été récemment enrichi par l'identification d'une nouvelle espèce associée à l'arthrite chez les bouquetins, baptisée *M. feriruminatoris* [Jores *et al.*, 2013 ; Baby *et al.*, 2023].

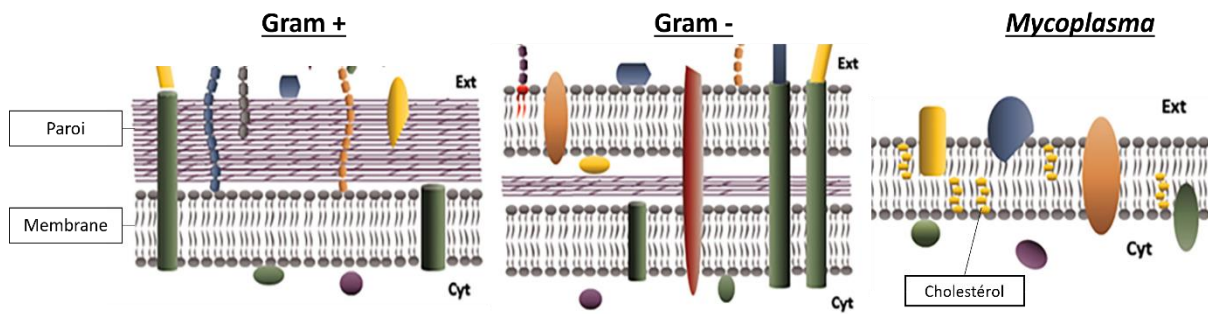
Cette classification en groupes et « clusters » est très utilisée aujourd'hui encore, même si elle a été récemment controversée par des approches purement phylogénétiques basées sur les données de séquençage génomique.



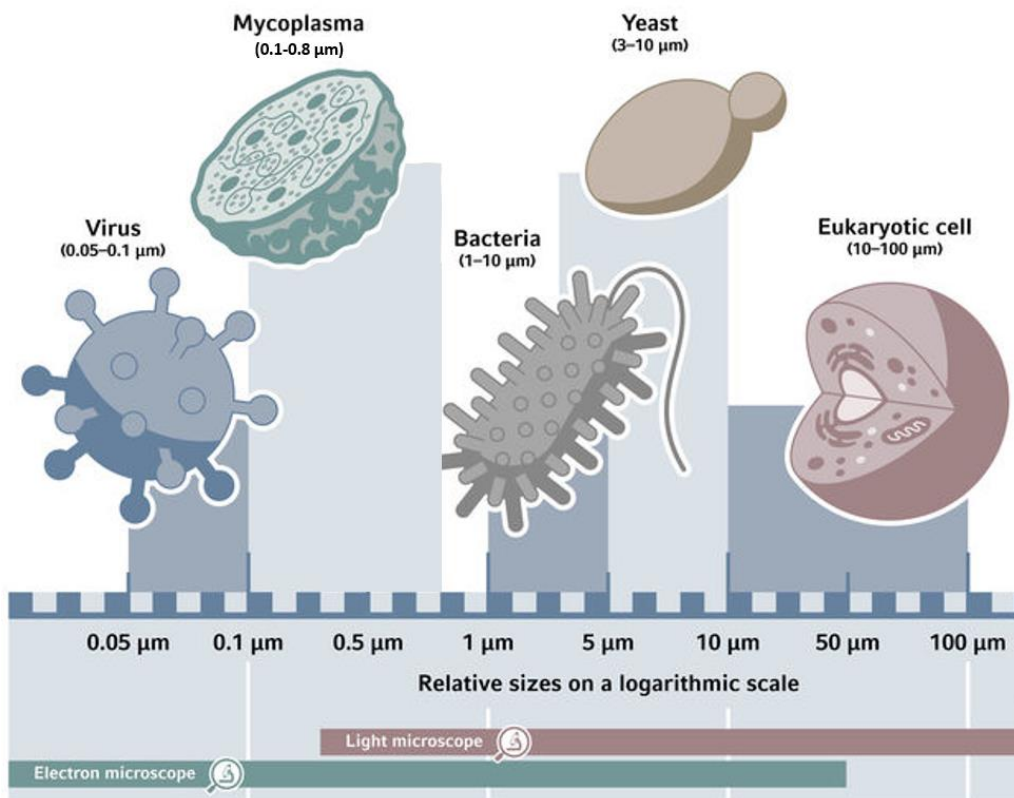
► **Figure 5 : Proposition de taxonomie issue des analyses phylogénétiques de Gupta et collaborateurs.** Les quatre groupes reconnus sont étiquetés et les modifications proposées, y compris les noms des nouveaux genres, familles et divisions au niveau de l'ordre, sont en gras. Les espèces, dont les séquences génomiques étaient disponibles, et analysées par l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques dans le cadre de l'étude, sont indiquées en gras. Les espèces dont les séquences génomiques n'étaient pas disponibles lors de l'étude sont classées dans un groupe sur la base de la similarité des séquences du gène codant l'ARNr 16S. CSI : conserved signature indels, CSP : conserved signature proteins. Figure et légende adaptées de Gupta et al., 2018.

La dernière révision phylogénétique de la classe des *Mollicutes* a été proposée en 2018 par Gupta et ses collaborateurs à travers une utilisation exhaustive des données génomiques disponibles [Gupta *et al.*, 2018]. La **figure 5** présente la proposition de taxonomie issue de cette étude. Cette tentative de réconciliation entre phylogénie et taxonomie reste controversée. Dans cette classification, seules les espèces proches de *Mmm* restent nommées *Mycoplasma*, les autres se voient classer dans de nouveaux genres. Cette classification est actuellement utilisée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI) et la Liste des noms procaryotes classés dans la nomenclature (« List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature », LPSN) depuis sa validation en 2022 par le comité international de systématique des procaryotes (CISP) mais a fait l'objet d'un rejet de la part du sous-comité sur la taxonomie des *Mollicutes* du CISP [Balish *et al.*, 2019 ; Arahall *et al.*, 2022]. Ce rejet est en grande partie fondé sur l'ancrage de la taxonomie dans l'étiologie de maladies majeures, historiques. Le changement d'appellation conduirait à une grande confusion pour les spécialistes, médecins et vétérinaires. A titre d'exemple, l'OMSA et les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (« Centers for Disease Control and Prevention », CDC) conservent l'appellation *Mycoplasma* pour le genre de ces bactéries (données des sites <https://www.woah.org/fr/> et <https://www.cdc.gov/>, consultés le 09/10/2023).

Dans la suite de ce manuscrit, nous emploierons donc le terme mycoplasme pour mentionner l'ensemble des espèces de la classe des *Mollicutes* comme il est d'usage dans la littérature [Razin, 1978 ; Citti *et al.*, 2018]. Nous conserverons aussi le terme *Mycoplasma* pour faire référence aux bactéries du genre comme décrit dans le dernier Manuel de Bergey [Brown *et al.*, 2018].



► **Figure 6 : Représentation schématique des membranes et parois chez les bactéries Gram positive, négative et Mycoplasma spp.** La membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif est entourée d'une épaisse paroi cellulaire de peptidoglycane. Chez les bactéries à Gram négatif, la couche de peptidoglycane est mince, mais elle est entourée d'une membrane externe phospholipidique. Les mycoplasmes ne sont limités que par une membrane phospholipidique riche en cholestérol (hexagones jaunes). Les formes de couleurs représentent les protéines associées à la membrane cellulaire. Ext : milieu extérieur ; Cyt : Cytoplasme. Figure et légende adaptées de Gaurivaud et Tardy, 2022.



► **Figure 7 : Comparaison de la taille cellulaire de différents micro-organismes et de cellules eucaryotes.** Figure inspirée d'une image du site internet <https://handling-solutions.eppendorf.com>



## 2.2. Caractéristiques phénotypiques

### 2.2.1. Absence de paroi et taille cellulaire réduite

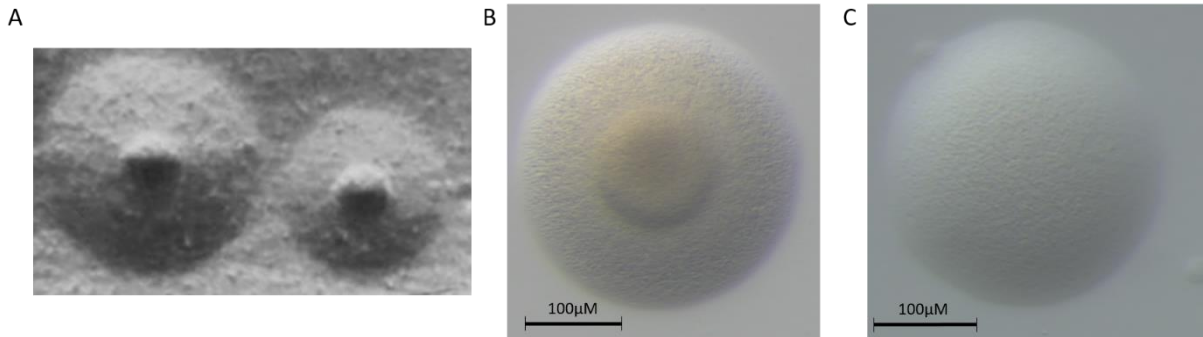
Les bactéries du genre *Mycoplasma* ont pour éléments communs l'absence de paroi et la présence d'une unique bicouche lipidique [Smith *et al.*, 1948 ; Brown *et al.*, 2018]. Ces caractéristiques, communes aux *Mollicutes*, sont uniquement retrouvées chez cette classe bactérienne à l'état naturel (**Figure 6**). Cette absence de paroi est liée à l'évolution des mycoplasmes, qui auraient perdu leur capacité à générer du peptidoglycane, le composant principal de la paroi bactérienne [Weisburg *et al.*, 1989]. Les bactéries du genre *Mycoplasma* sont donc pourvues d'une unique membrane, constituée entre 25 à 30 % de stérols, permettant de réguler leur fluidité membranaire [Razin, 1982].

L'absence de paroi rend les bactéries du genre *Mycoplasma* plus sensibles aux éléments physiques et biologiques extérieurs comparativement aux bactéries à Gram positif ou négatif [Tully and Razin, 1983]. De plus, cette absence de structure rigide externe permet à la plupart des espèces d'être pléomorphes, c'est-à-dire, de changer de forme en fonction de certaines contraintes environnementales. Ainsi, toutes les bactéries du genre *Mycoplasma* traversent les filtres de 0,45 µM, et pour la plupart des espèces même ceux de 0,22 µM [Tully and Razin, 1983].

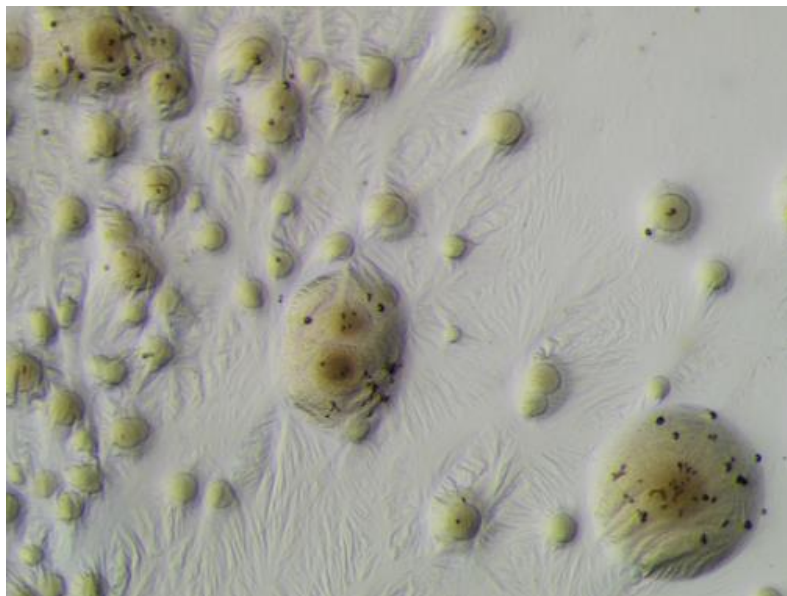
Les bactéries du genre *Mycoplasma* se distinguent également par leur taille cellulaire, réduite, par rapport à celle des autres bactéries (**Figure 7**). Le diamètre des bactéries du genre *Mycoplasma* peut varier de 100 à 800 nm. Sous forme de bâtonnets/filaments, leur longueur oscille entre 50 et 500 nm [Brown *et al.*, 2018]. En comparaison, l'espèce *Escherichia (E.) coli* forme des bâtonnets cylindriques d'environ 2 µm, soit environ deux à 40 fois plus grand que certaines espèces du genre *Mycoplasma* [Scheutz and Strockbine, 2015].

Bien que pléomorphes, les espèces du genre *Mycoplasma* ont une forme basale, observable en l'absence de stress environnemental. L'espèce *M. ovis*, possède une forme ronde lorsqu'elle est observée à la surface des érythrocytes [Neimark *et al.*, 2004]. *M. gallisepticum* a une forme de poire du fait de son organelle d'attachement mais peut devenir filamenteuse au contact d'une solution hypotonique [Razin *et al.*, 1980]. *Mmm* a été observé majoritairement dans une forme filamenteuse, expliquant la conclusion de Nowak quant à son aspect mycélien [Nowak, 1929 ; Chu and Horne, 1967]. *M. pneumoniae* a également été décrite comme filamenteuse avec une structure terminale supplémentaire [Maniloff and Morowitz, 1972]. Cette structure terminale ou organelle d'attachement, par ailleurs décrite chez les espèces *M. mobile* et *M. penetrans*, permet entre autres, l'adhésion de la bactérie aux cellules de l'hôte ainsi que sa motilité [Jurkovic *et al.*, 2013 ; Miyata and Hamaguchi, 2016 ; Nakane *et al.*, 2021].





► **Figure 8** : Photographies de colonies de *Mycoplasma* spp. Observées sur milieu gélosé. (A) Colonies de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* prise à l'aide d'un microscope optique (grossissement X 140). Figure extraite de Tang et al., 1935. (B) Colonies de *M. equirhinis* et (C) *M. pulmonis* prises à l'aide d'une loupe binoculaire (grossissement X 115). Photographies réalisées par M. Martineau à LABÉO.



► **Figure 9** : Photographie de l'aspect "film and spots" observé sur une gélose après culture d'une souche de *M. equirhinis*. Colonies de l'espèce *M. equirhinis* prises à l'aide d'une loupe binoculaire (grossissement X 115). Photographie réalisée par M. Martineau à LABÉO.

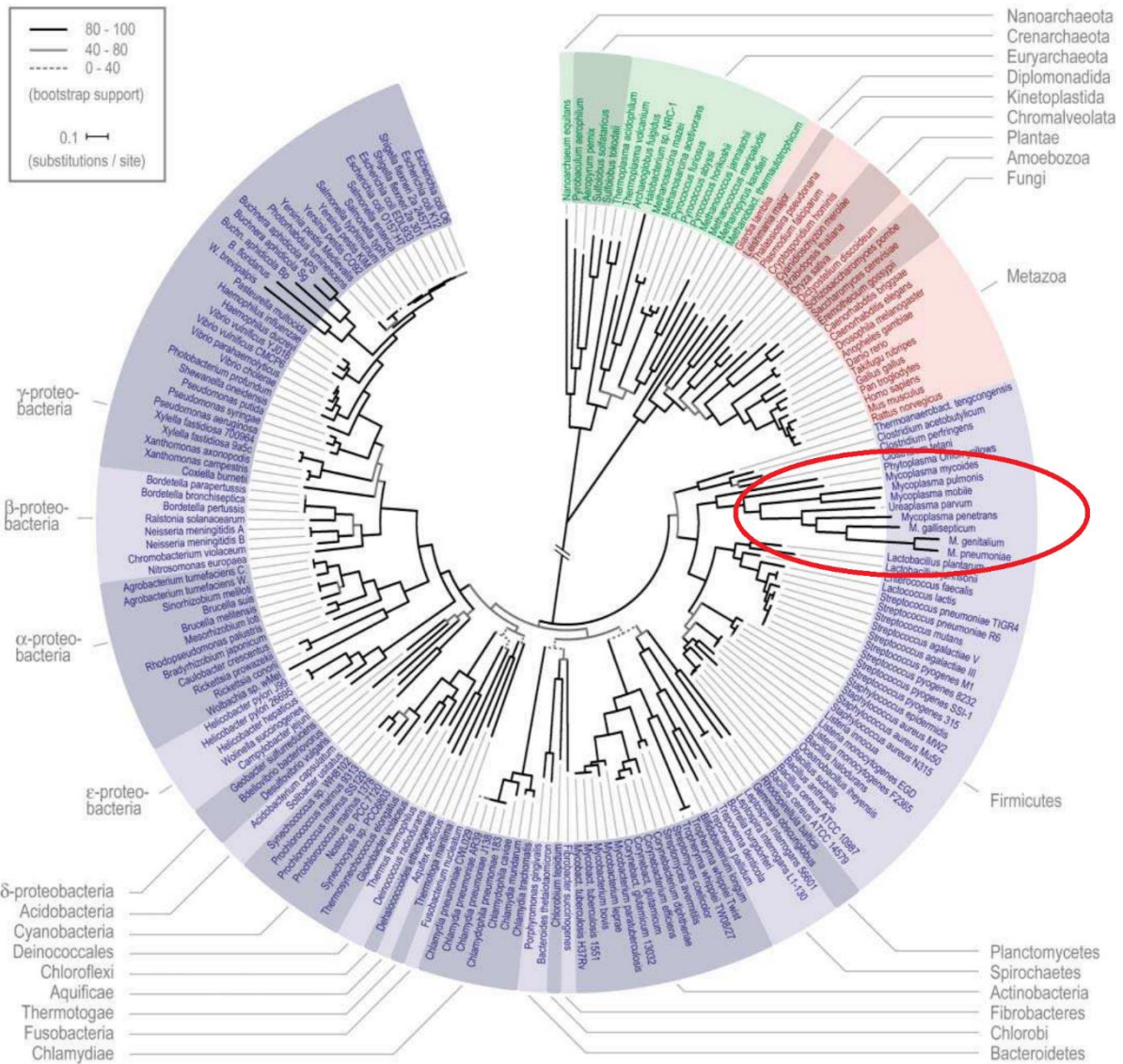
### 2.2.2. Morphologie des colonies sur milieu gélosé

Sur milieu gélosé adapté, les colonies des bactéries du genre *Mycoplasma* ont un aspect commun ressemblant pour la plupart à des œufs aux plats (**Figure 8**). Cette forme typique a été observée dès 1934 et résulte de la croissance de la partie centrale de la colonie dans la gélose et d'une zone de croissance environnante en surface [Razin, 1996]. Cette forme dépend du milieu de culture et de sa concentration en agar [Tully and Razin, 1983]. En fonction des espèces, cette forme diffère par le diamètre du rond central ou la granularité de la colonie (**Figure 8B**). Sur certains milieux, des espèces comme *M. pulmonis* présentent une morphologie sphérique sans cœur (**Figure 8C**).

Certaines espèces sont capables de générer du "film and spots", c'est-à-dire une pellicule à la surface du milieu de culture accompagnée de rainures (**Figure 9**), lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux enrichis en sérum de cheval ou en jaune d'œuf. Cet aspect résulte de l'action de lipases qui hydrolysent les stérols [Tully and Razin, 1983].

### 2.2.3. Capacité métabolique réduite

Les bactéries du genre *Mycoplasma* sont dépourvues de nombreuses voies métaboliques, conséquence d'un génome réduit [Pollack *et al.*, 1983]. Elles sont, par exemple, incapables de synthétiser leurs propres nucléotides [Smith, 1955]. Leur source de carbone majoritaire est issue de la glycolyse, de l'hydrolyse de l'arginine, ou de la combinaison de ces deux voies [Schimke and Barile, 1963]. Les sucres et stérols utilisables comme substrats constituent les rares possibilités d'identification biochimique de ces espèces [Allam and Lemcke, 1975 ; Niu *et al.*, 2021]. L'activité d'une phosphatase acide (EC 3.1.3.2) et la digestion de la caséine peuvent aussi être utilisées à cet effet [Shibata *et al.*, 1986 ; Maksimović *et al.*, 2022].



► **Figure 10 : Phylogénie de 191 espèces du vivant entièrement séquencés.** Cet arbre phylogénétique repose sur un alignement nettoyé et concaténé de 31 familles de protéines universelles. La section verte représente les archées, la rouge, les eucaryotes et la bleue les bactéries. L'échelle à gauche de l'arbre indique la taille utilisée pour représenter une substitution pour 10 positions nucléotidiques. L'ovale rouge entoure les bactéries du genre *Mycoplasma* analysées. Les étiquettes indiquent diverses subdivisions fréquemment utilisées en taxonomie. *Figure et légende adaptées de Ciccarelli et al., 2006.*

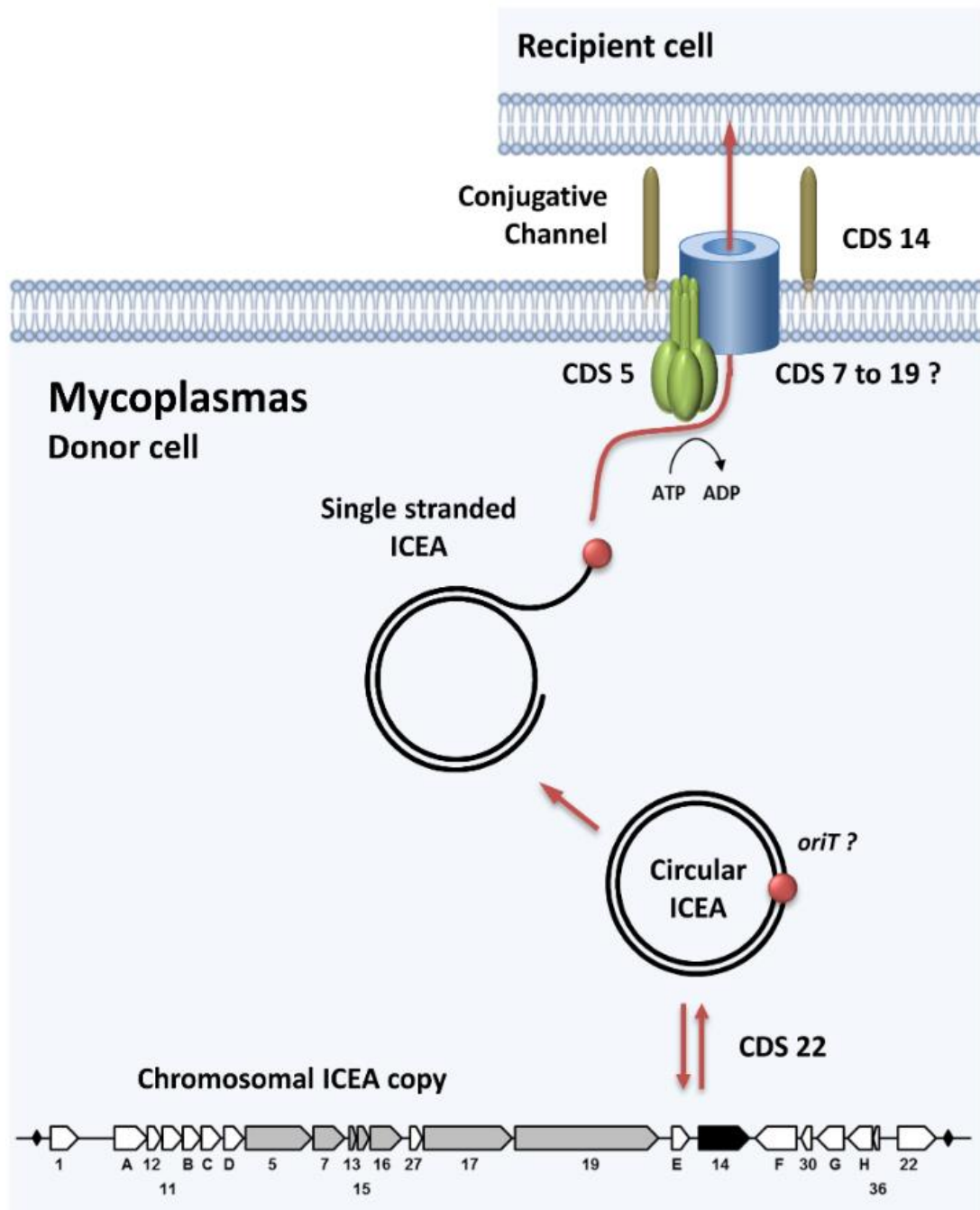
## 2.3. Caractéristiques génomiques

### 2.3.1. Taille et GC %

Parmi les bactéries du genre *Mycoplasma*, l'espèce *M. genitalium* (ASM2732v1) possède le plus petit génome connu à ce jour avec 580 Kb (Kilobases), le plus grand étant celui de l'espèce *M. penetrans* (ASM1122v1) avec 1,4 Mb (Mégabases). La taille très réduite de son génome fait de *M. genitalium* le plus petit organisme capable de répliation *in vitro*. En comparaison, le génome d'*E. coli* K12 (souche de référence) possède 4,6 Mb (ASM584v2) soit presque quatre fois plus que *M. penetrans* et huit fois plus que *M. genitalium* (données du site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, consulté le 09/10/2023).

Les bactéries du genre *Mycoplasma* possèdent des génomes avec un pourcentage en guanine et cytosine (GC %) réduit, compris entre 23 et 40 %, alors que ce pourcentage varie de 35 à 75 % pour les autres bactéries [Osawa *et al.*, 1990 ; Brown *et al.*, 2018]. De plus, chez les mycoplasmes, le codon UGA est traduit en tryptophane alors qu'il s'agit d'un codon stop, provoquant l'arrêt de la traduction de l'ARNm en protéine, chez la plupart des êtres vivants [Yamao *et al.*, 1985 ; Inamine *et al.*, 1990 ; Razin *et al.*, 1998]. La forte proportion d'adénosine-thymidine et les régions de faible complexité génomique associées ont été évoquées comme une des raisons de la fréquence élevée de mutation des bactéries du genre *Mycoplasma* [Gibson and Eyre-Walker, 2019]. De plus, ces bactéries possèdent un nombre limité de gènes associés aux systèmes de réparations de l'ADN et sont même dépourvues du système MutSLH impliqué dans la réparation des mésappariements de l'ADN [Carvalho *et al.*, 2005 ; Hakim *et al.*, 2021]. Ces éléments expliquent l'évolution rapide des génomes pour les espèces du genre *Mycoplasma*, telle qu'observée dans « l'arbre du vivant », dans lequel la longueur des branches des mycoplasmes, correspondant à un nombre de substitutions par site, est nettement supérieure à celles des autres bactéries [Ciccarelli *et al.*, 2006] (**Figure 10**).

Les mutations successives et la perte de gènes ont longtemps été considérées comme la seule source d'évolution chez les bactéries du genre *Mycoplasma*. Cependant, depuis 2007 on sait que ces génomes évoluent également par des transferts horizontaux de gènes entre « clusters » distants [Sirand-Pugnet *et al.*, 2007].



► **Figure 11** : Proposition du modèle de transfert des MICEs chez *M. agalactiae*. La recombinase codée par la CDS 22 permet l'excision du MICE du chromosome bactérien et sa circularisation. Ensuite, les protéines codées par l'ICEA sont activement exprimées pour générer un complexe linéaire d'ADN simple brin. La circularisation de l'ICEA induit l'expression du module conjugatif (CDS en gris) dont les produits s'assemblent dans le pore conjugatif (« conjugative channel »). Enfin, le transfert de l'ICE simple brin à travers le canal conjugatif est facilité par le composant énergétique TraG/VirD4 (codé par la CDS 5) qui se trouve à l'intérieur de la membrane. ICE : Integrative conjugative element ; ICEA : *M. agalactiae* ICE. Figure et légende tirées de Citti et al., 2018. Creative common attribution licence (CC-BY).



### 2.3.2. Éléments génétiques mobiles

L'étude des éléments génétiques mobiles des bactéries du genre *Mycoplasma* a montré son importance dans l'évolution du genre, mais également sur ses caractéristiques particulières [Breton *et al.*, 2012 ; Tardy *et al.*, 2012, 2015 ; Citti *et al.*, 2020].

#### a) Plasmide

Chez les bactéries du genre *Mycoplasma*, les plasmides ont été décrits quasiment exclusivement chez les espèces du « cluster » Mycoïdes et apparentées [Breton *et al.*, 2012 ; Baby *et al.*, 2023]. Ils sont de taille réduite, comprise en moyenne entre 1 000 à 2 000 pb (paires de base), le plus grand décrit allant jusqu'à 3 432 pb [Kent *et al.*, 2012]. En comparaison, le plasmide de la souche O157 de *E. coli* est constitué de 100 Kb [Lim *et al.*, 2010]. Ils sont constitués uniquement des gènes nécessaires à leur répllication dans la cellule bactérienne [Breton *et al.*, 2012]. Ces plasmides ne possèdent donc pas de gènes cargos, qui se définissent comme des gènes transportés ou déplacés d'un endroit à un autre d'un génome par l'activité d'un élément génétique mobile, et pouvant par exemple conférer à la bactérie un phénotype particulier comme la résistance à un antibiotique.

#### b) Éléments intégratifs et conjugatifs des mycoplasmes

Les éléments intégratifs conjugatifs des mycoplasmes (« *Mycoplasma Integrative Conjugative elements* », MICEs) sont des transposons de 22 à 37 Kb ayant la capacité de passer d'un mycoplasme à l'autre par excision, circularisation puis transfert par conjugaison. Des séquences codantes de l'ADN (« coding DNA sequences », CDS) communes entre les MICEs de différentes espèces comme *M. bovis* et *M. agalactiae* ont été identifiées [Tardy *et al.*, 2015]. Les CDS 1, 5, 17 et 22, nommées « backbone », ont par la suite été retrouvées par homologie de séquences chez certaines souches d'autres espèces avec des prévalences pouvant aller jusqu'à 98 % des souches testées pour *M. bovis* (n=42) et 45 % des souches de *M. hominis* (n=120) [Tardy *et al.*, 2015 ; Meygret *et al.*, 2019 ; Citti *et al.*, 2020].

La fonction de la CDS 1 est encore inconnue. Les CDS 5 et 17 sont des gènes codant respectivement pour les transposases TraG et TraE ayant des fonctions liées à la mobilité de l'ADN chez d'autres bactéries. Le CDS 22 code pour une recombinase/intégrase qui permet l'excision du MICE et son intégration aléatoire dans le génome receveur [Citti *et al.*, 2020]. Pour le MICE, le CDS 14 est également capital, car son inactivation expérimentale chez des souches de *M. agalactiae* supprime leur capacité conjugative [Dordet Frisoni *et al.*, 2013]. En plus des CDS 5 et 17, l'ensemble des gènes, de la CDS 5 à 19, sont constitutifs des MICEs et sont supposés jouer un rôle dans leurs transferts (**Figure 11**).

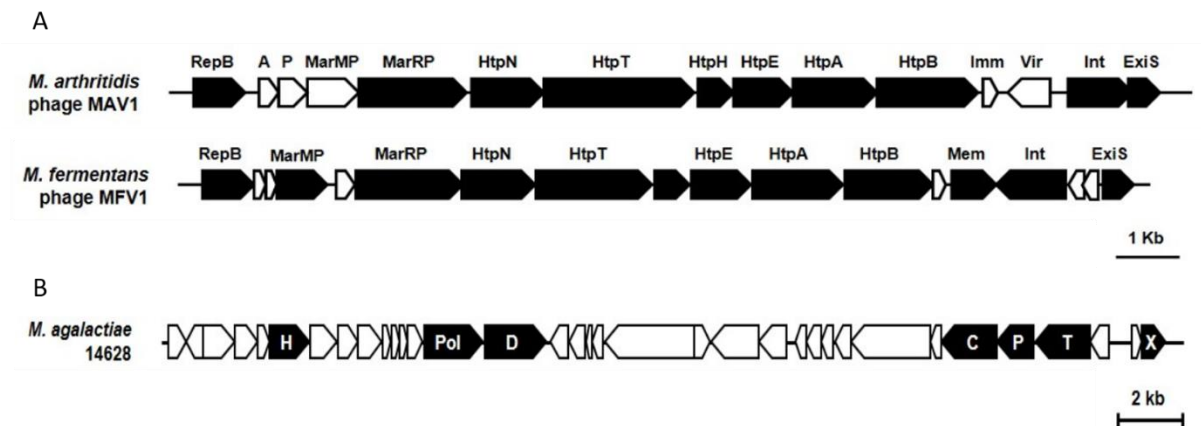


Un autre mécanisme d'échange de gènes, le Mycoplasma Chromosomal Transfert (MCT), a été mis en évidence en lien avec la présence de MICE [Citti *et al.*, 2018 ; García-Galán *et al.*, 2022]. Ces MCT utilisent le pore conjugatif créé par le MICE mais le transfert de gènes se fait dans l'autre sens (de la souche dépourvue de MICE vers celle en possédant un) [Citti *et al.*, 2018]. Cet échange de matériel génétique a été démontré *in vitro* sous pression de sélection antibiotique chez l'espèce *M. agalactiae* [Faucher *et al.*, 2019]. Lors de cette étude, le transfert des gènes *parC*, *parE*, *gyrA* et *gyrB* de souches résistantes à des souches sensibles à l'enrofloxacin a conduit à une augmentation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) chez les souches receveuses. Ces échanges concernent des fragments d'ADN de taille variable pourraient expliquer les transferts horizontaux de gènes (« Horizontal Gene Transfert », HGT) constatés entre espèces distantes [Sirand-Pugnet *et al.*, 2007]. Ils n'ont toutefois pas été démontrés chez l'hôte.

### c) Séquences d'insertion et transposon

Les séquences d'insertion (IS) sont des courtes séquences génomiques dont la taille est comprise entre 0,7 et 2,5 Kb. Les IS possèdent à leurs extrémités, comme les MICEs, des séquences inversées répétées ainsi que des sites de reconnaissance pour leurs propres transposases [Siguier *et al.*, 2014]. Les IS sont divisés en différentes familles en fonction, principalement, de leur type de transposase mais également de leurs séquences inversées répétées, de la longueur et composition des courtes répétitions d'ADN périphériques, de l'organisation de leurs cadres de lecture ouverts (Open Reading Frame, ORF) et des séquences cibles dans lesquelles ils s'insèrent [Mahillon and Chandler, 1998]. Le site ISFinder, qui regroupe les IS des procaryotes, comptabilise aujourd'hui 26 familles. Trois familles d'IS (IS3, IS30 et IS1634) ont été détectées chez les bactéries du genre *Mycoplasma* (isfinder.biotoul.fr consulté le 09/10/2023). Le nombre d'IS est variable entre les espèces du genre *Mycoplasma* d'une part et les souches de certaines espèces d'autre part. Pour exemple la souche de référence de *M. bovis* (PG45) comporte 54 IS complets ou tronqués [Lysnyansky *et al.*, 2009] alors que certaines souches cliniques en ont jusque 103 [Ambroset *et al.*, 2022]. La variation du nombre de copies d'IS au sein d'une espèce a été régulièrement proposé comme outil de sous-typage des souches, comme chez *M. mycoides* subsp. *capri* ou *M. bovis* [Miles *et al.*, 2005 ; Tardy *et al.*, 2007].





► **Figure 12** : Représentation schématique des deux principaux types (A et B) de prophage retrouvés chez les bactéries du genre *Mycoplasma*. Les CDS en noir correspondent à ceux utilisés durant l'étude pour identifier la présence d'autres prophages du même type dans une base de données protéiques de *Mollicutes*. (A) RepB, une hélicase, participe à la réplication de l'ADN du phage, tandis que RepA (notée A) se lie à l'ADN pour enclencher le processus de réplication. RepP (notée P) est également supposée jouer un rôle dans l'initiation de la réplication. MarMP agit en tant que méthylase, assurant la protection de l'ADN phagique une fois qu'il est intégré dans le génome bactérien. MarRP, est une protéine régulatrice de la transcription. Les protéines Htp sont les éléments constitutifs de la structure du phage, assurant son assemblage et sa stabilité. Imm, en tant que répresseur du phage, maintient le phage dans un état lysogène. Vir et mem sont des protéines de surface, Vir empêche la surinfection de la bactérie par des phages du même type. Int est une intégrase essentielle à l'intégration du génome phagique dans le génome bactérien, tandis qu'ExiS est une excisionase, permettant l'excision du génome phagique du génome bactérien lors du cycle lytique. (B) H, représentant l'hélicase ; Pol, pour l'ADN polymérase ; D, pour l'ADN primase (initiant la réplication de l'ADN) ; C, pour les protéines « prohead, » qui jouent un rôle clé dans l'assemblage, la maturation et la protection de la capsid du phage. P, symbolisant la protéine « portail, » une composante multifonctionnelle jouant un rôle central dans le processus d'encapsulation de l'ADN. Elle facilite l'initiation, la translocation, et la terminaison de l'encapsulation de l'ADN dans la capsid. T, représentant la « terminase, » est responsable de la reconnaissance, du clivage, et de l'empaquetage de l'ADN du phage dans la capsid lors de l'assemblage de nouvelles particules de phage. X, symbolisant la « Xer » (recombinase), joue un rôle central dans la médiation des événements de recombinaison spécifiques à un site qui régissent l'intégration de l'ADN du phage dans le génome de l'hôte pendant la lysogénie et son excision pendant la transition vers le cycle lytique. *Figure et légendes adaptées de Citti et al. 2020.*

Les IS sont considérées comme des éléments essentiels dans la plasticité génomique intra-espèce. Ils peuvent jouer un rôle majeur dans la rupture de la synténie des génomes, contribuant ainsi à la diversification génétique au sein du genre *Mycoplasma* [Lysnyansky *et al.*, 2009 ; Ambroset *et al.*, 2022]. Par ailleurs, des types ou des familles d'IS peuvent être similaires entre plusieurs espèces : par exemple, certains IS présents chez *M. bovis* sont très similaires à ceux présents chez *M. agalactiae* et *Mmm*, suggérant un possible transfert horizontal ou une conservation de ces éléments au fil de l'évolution [Thomas *et al.*, 2005].

Chez l'espèce *M. hominis*, un transposon composite nommé Tn916 a été identifié. Ce transposon contient le gène *tetM* qui permet à la bactérie de devenir résistante à la tétracycline [Calcutt and Foecking, 2015].

#### d) Phages

Les phages ou bactériophages sont des virus ciblant uniquement les cellules bactériennes. *M. bovirhinis* est la première bactérie du genre *Mycoplasma* chez qui un phage a été décrit [Howard *et al.*, 1980]. Comme pour les autres éléments listés ci-dessus, ces bactériophages sont supposés être des facteurs évolutifs des génomes et à l'origine de potentiels transferts de gènes entre souches et entre espèces ayant un intérêt dans la survie de la bactérie infectée. Si le virus possède un cycle lysogénique, il peut insérer son matériel génétique dans le génome de la bactérie infectée et passer sous forme de prophage. Ces derniers ont été décrits chez certaines espèces comme *M. pulmonis*, *M. arthritidis* ou encore *M. agalactiae* [Maniloff, 1988 ; Voelker and Dybvig, 1998 ; Citti *et al.*, 2020]. Pour le genre *Mycoplasma*, les prophages peuvent être classés en deux catégories, selon leur organisation et leur taille. La première catégorie regroupe des prophages représentés par MAV1 et MFV1, issus respectivement de *M. arthritidis* et *M. fermentans* [Citti *et al.*, 2020]. Ces prophages, d'une longueur d'environ 16 kb, exhibent une organisation compacte et une orientation des CDS presque exclusivement unidirectionnelle (**Figure 12A**). La seconde catégorie est composée de prophages d'approximativement 34 Kb, représentée par MagV1, détectée chez *M. agalactiae* [Tardy *et al.*, 2012]. Ces prophages font approximativement 34 Kb et leur organisation génomique correspond à l'assemblage de plusieurs régions dont les CDS présentent la même orientation (**Figure 12B**).

► **Tableau 5** : Principales espèces pathogènes ou opportunistes du genre *Mycoplasma* identifiées chez l'Homme et les animaux d'élevage.

ESPÈCE DU GENRE <i>MYCOPLASMA</i>	SIGNES CLINIQUES OU SYNDRÔME	HÔTE
<i>M. genitalium</i>	Urétrites, souvent associées avec des vaginoses et des cervicites	Homme
<i>M. hominis</i>	Infections du tractus génital	
<i>M. pneumoniae</i>	Maladies des voies respiratoires supérieures	
<b><i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i></b>	<b>Péripleurite contagieuse bovine (PPCB)</b>	Bovins
<i>M. bovis</i>	Bronchopneumonies infectieuses enzootiques, mammites, arthrites et otites	
<b><i>M. gallisepticum</i></b>	<b>Maladies respiratoires chroniques, sinusites infectieuses</b>	Volailles
<b><i>M. synoviae</i></b>	<b>Infections du tractus respiratoire subclinique, synovites infectieuses, syndrome d'anomalie de l'apex de la coquille d'œuf chez les poules pondeuses</b>	
<i>M. hyopneumoniae</i>	Pneumonies enzootiques	
<i>M. hyorhinis</i>	Polysérosites, arthrites	Porc
<i>M. hyosynoviae</i>	Arthrites, polyarthrites	
<i>M. ovipneumoniae</i>	Bronchopneumonies chroniques	Ovins
<b><i>M. agalactiae</i></b>		Ovins et Caprins
<b><i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i></b>	<b>Agalactie contagieuse : mammites, arthrite, kératoconjunctivites, avortements, pneumonies</b>	
<b><i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i></b>		Caprins
<b><i>M. putrefaciens</i></b>		
<b><i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i></b>	<b>Pleuropneumonie contagieuse caprine (PCC)</b>	Caprins

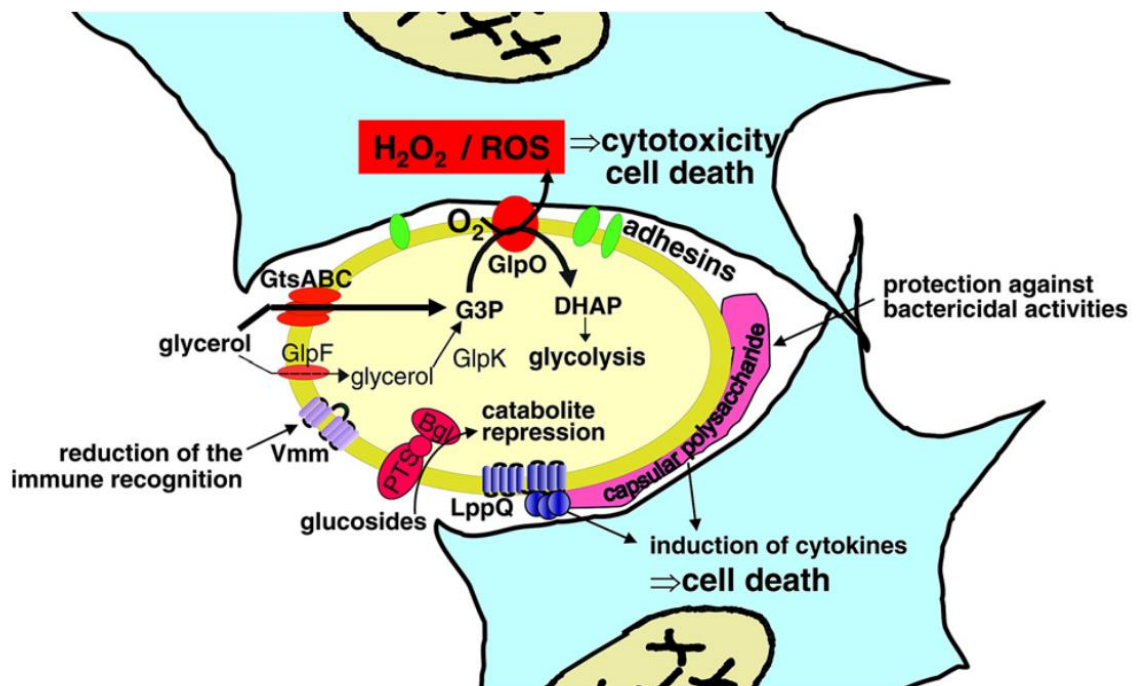
Les espèces réglementées par l'OMSA sont indiquées en gras. *Tableau adapté de Gautier-Bouchardon, 2018.*

## 2.4. Importance médicale

Le genre *Mycoplasma* comporte des espèces commensales, opportunistes ou pathogènes primaires présentes chez de très nombreux hôtes, animaux domestiques, sauvages et également chez l'Homme [Brown *et al.*, 2018]. Pour la majorité, les espèces du genre *Mycoplasma* sont inféodées à un hôte. Cependant, certaines espèces, comme *M. arginini*, sont tout de même détectées chez de nombreux hôtes comme les bovins, les ovins et caprins et certains félins (liste non exhaustive) et peuvent être considérées comme ubiquistes [Brown *et al.*, 2018]. De très rares cas d'infections zoonotiques ont été décrites, essentiellement en lien avec une immunodépression inhabituelle de l'hôte [Watanabe *et al.*, 2012 ; Heller *et al.*, 2015].

Les bactéries du genre *Mycoplasma* affectent le plus souvent les tractus respiratoire ou génital, où elles sont trouvées liées à des cellules épithéliales ou de la muqueuse [Razin *et al.*, 1998]. Leurs caractéristiques génomiques et métaboliques font de ces espèces des parasites obligatoires, exempts pour la majorité de facteurs de virulence classiques comme des toxines ou des cytolysines [Razin *et al.*, 1998]. Certaines espèces sont cependant responsables de pertes économiques importantes chez les animaux de rente, et à l'origine de problèmes de santé publique chez l'Homme (**Tableau 5**).

Dans ce manuscrit, en raison du sujet des travaux de recherche, un focus sur les bactéries du genre *Mycoplasma* impliquées dans les infections respiratoires sera réalisé.



► **Figure 13 :** Représentation schématique des différentes voies de virulence de *M. mycoides subsp. mycoides*. Les cellules de l'hôte sont représentées en bleu et *Mmm* en jaune. La présence d'adhésines, bien que représentée sur le schéma, n'a pas encore été démontrée chez *Mmm*. Figure et légende tirées de Pilo et al. 2007. Creative common attribution licence (CC-BY).

#### 2.4.1. Implications dans les infections respiratoires

De nombreuses espèces du genre *Mycoplasma* sont impliquées dans des infections respiratoires de sévérité variable en fonction de l'hôte (**Tableau 5**). Quelques exemples seront présentés dans la suite de ce manuscrit afin d'exposer différents profils et modalités de la pathogénicité décrits dans le genre *Mycoplasma*.

##### a) *M. mycoides* subsp. *mycoides*

L'agent de la PPCB a été à l'origine de nombreuses épizooties à travers le monde depuis sa découverte, dues à l'essor du commerce international de bovins [Provost *et al.*, 1987]. Aujourd'hui, *Mmm* a été éradiqué des Etats-Unis, d'Australie et d'Europe à l'aide de mesures strictes d'abattage et de vaccination, mais reste en Afrique sub-saharienne responsable d'importantes pertes économiques [Dupuy *et al.*, 2012 ; Anyika *et al.*, 2021].

L'infection à *Mmm* provoque une inflammation localisée importante des poumons pouvant conduire à la mort de l'animal par détresse respiratoire [Provost *et al.*, 1987]. Des lésions caractéristiques à la plèvre et aux poumons sont observées sur les carcasses d'animaux infectés. Pour une partie des bovins atteints, l'infection peut devenir chronique, faisant de l'hôte un réservoir pour la bactérie et donc un potentiel contaminant pour les autres individus du cheptel [Provost *et al.*, 1987]. *Mmm* possède différents éléments impliqués dans sa pathogénicité [Pilo *et al.*, 2007] :

- Une capsule, présente en surface, qui lui permet de se protéger de certaines actions bactéricides du système immunitaire de l'hôte comme la phagocytose [Gaurivaud *et al.*, 2014].
- Des protéines de surface, nommées Vmm, qui peuvent être responsables de son échappement au système immunitaire [Persson *et al.*, 2002].
- Différentes voies de production d'énergie, comme la voie d'assimilation du glycérol, qui génèrent du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), qui une fois dans le milieu extracellulaire, peut provoquer la lyse des cellules eucaryotes proches [Rice *et al.*, 2001].

L'ensemble de ces mécanismes sont représentés dans la **figure 13**.

## b) *M. bovis*

Les mycoplasmoses bovines dues à *M. bovis* surviennent dans la majorité des pays du monde avec des prévalences variables. *M. bovis* est considéré comme l'un des principaux agents pathogènes émergents du bétail dans les pays industrialisés, entraînant des pertes économiques significatives [Maunsell *et al.*, 2011 ; Nicholas, 2011].

Les infections par *M. bovis* sont associées à diverses manifestations cliniques, dont des symptômes respiratoires et des mammites [Maunsell *et al.*, 2011]. Des infections expérimentales ont montré que cette espèce peut se comporter comme un pathogène primaire et donc provoquer des symptômes après inoculation [Nicholas *et al.*, 2002]. Pour autant, *M. bovis* est très régulièrement isolé des voies respiratoires supérieures d'animaux sains [Maunsell *et al.*, 2011].

Lors de sa détection chez des individus symptomatiques, *M. bovis* est majoritairement isolée avec d'autres espèces bactériennes, comme *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* [Bürki *et al.*, 2015 ; Kudirkiene *et al.*, 2021]. L'action synergique de *M. bovis* et *Mannheimia haemolytica* conduit à des signes cliniques respiratoires plus intenses chez les bovins coinfestés [Gourlay and Houghton, 1985]. Concernant les virus, la détection de *M. bovis* est souvent associée à celle du virus de la diarrhée virale bovine (BVDV), de Parainfluenza virus bovin de type 3 (BPIV-3) et du virus syncytial bovin [Zhou *et al.*, 2023]. *M. bovis* est donc souvent décrite comme agent du bovine respiratory disease complex (BRDC), terme générique employé pour décrire des syndromes pneumoniques chez des bovins, résultants d'infections virales et/ou bactériennes [Grissett *et al.*, 2015]. Le BRDC est une cause de pertes économiques très importantes pour la filière bovine [Dubrovsky *et al.*, 2020].

Tout comme *Mmm*, *M. bovis* possède des protéines de surface lui permettant d'induire la chronicité de l'infection. Ces protéines de surfaces variables (Variable surface protein, Vsp), sont codées par des gènes sensibles à la recombinaison, permettant des modifications de leurs antigènes de surface [Lysnyansky *et al.*, 2001]. Cette capacité empêche l'hôte de s'affranchir de *M. bovis* naturellement [Buchenau *et al.*, 2010]. L'aptitude de *M. bovis* à former du biofilm est également supposée jouer un rôle dans la chronicité de son infection [McAuliffe *et al.*, 2006].

### c) *M. hyopneumoniae*

L'espèce *M. hyopneumoniae* est inféodée au porc. Détectée à travers le monde avec des prévalences comprises entre 10 et 80 % en fonction des pays, cette espèce a un fort impact sur la filière porcine [Leal Zimmer *et al.*, 2020]. Une toux sèche chronique est typique de la pneumonie enzootique du porc, dont *M. hyopneumoniae* est l'agent pathogène principal [Maes *et al.*, 1996].

Bien que considéré comme un pathogène primaire, *M. hyopneumoniae* est souvent détecté avec d'autres pathogènes comme le virus de la grippe porcine (Swine Influenza viruses, SIV) ou *Actinobacillus pleuropneumoniae* dans le cadre du complexe des maladies respiratoires porcines (« Porcine Respiratory Disease Complex », PRDC) [Saade *et al.*, 2020].

L'adhésion de *M. hyopneumoniae* aux cellules de l'épithélium respiratoire est permise grâce à plus de 30 adhésines présentes à la surface de la bactérie. Ces protéines sont capables d'induire une réponse immunitaire provoquant l'apoptose de la cellule à laquelle *M. hyopneumoniae* s'est attaché. D'ailleurs, *M. hyopneumoniae* est la seule espèce de mycoplasmes pour laquelle une dégradation des cellules ciliées a été clairement démontrée [DeBey and Ross, 1994]. La mort des cellules épithéliales et les interactions avec le système immunitaire sont les principales raisons des signes cliniques chez les porcs infectés [Leal Zimmer *et al.*, 2020].

### d) *M. pneumoniae*

L'espèce *M. pneumoniae*, anciennement appelée agent d'Eaton, est un pathogène des voies respiratoires chez l'Homme, endémique dans le monde entier [Waites *et al.*, 2017]. Depuis 2010, des épidémies d'infections à *M. pneumoniae* sont récurrentes dans de nombreux pays d'Europe et d'Asie. L'espèce *M. pneumoniae* est responsable de 10 à 40 % des pneumonies communautaires, c'est-à-dire, développées chez des personnes qui ne sont pas hospitalisées [Chanock *et al.*, 1963].

Les manifestations cliniques de l'infection à *M. pneumoniae* varient largement en fonction des individus, mais les symptômes principalement décrits sont une inflammation de la trachée et des bronches, associée à de la toux, chez l'enfant et l'adolescent [Waites *et al.*, 2017]. Sa détection aussi bien chez des individus sains que malades montre son caractère chronique et opportuniste [Spuesens *et al.*, 2013]. Une étude a également montré une prévalence plus importante de l'espèce *M. pneumoniae* chez les individus atteints d'asthme [Martin *et al.*, 2001].

*M. pneumoniae* est souvent détecté dans des coinfections virales ou bactériennes. Une étude, réalisée sur 216 échantillons positifs à *M. pneumoniae*, a permis de prouver la présence d'au moins un autre pathogène dans 65 % des échantillons testés provenant d'enfants [Diaz *et al.*, 2016]. Dans cette



étude, les agents microbiens, les plus retrouvés avec *M. pneumoniae*, étaient les bactéries *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*, ainsi que les rhinovirus.

A l'aide de son organelle d'attachement, *M. pneumoniae* est capable de se lier à la surface des cellules ciliées de la muqueuse bronchique. Cette interaction entraîne des changements dans le métabolisme cellulaire, des altérations de la structure des cellules infectées, une réorganisation du cytosquelette, et conduit à une diminution des ressources nutritionnelles disponibles pour les cellules de l'hôte [Hu *et al.*, 2023].

La particularité de *M. pneumoniae* est sa capacité à produire une toxine, caractère unique au sein du genre *Mycoplasma* [Medina *et al.*, 2012]. Cette toxine appelée syndrome de détresse respiratoire acquis dans la communauté (« community-acquired respiratory distress syndrome », CARDS), a été décrite comme capable d'induire des réactions inflammatoires et serait un facteur important dans l'apparition des symptômes liés à *M. pneumoniae* [Medina *et al.*, 2012 ; Waites *et al.*, 2017].

#### 2.4.2. Diagnostic

Dans le cadre des infections respiratoires liées à des bactéries du genre *Mycoplasma*, à l'exception de certaines espèces comme *Mmm*, les signes cliniques seuls ne suffisent pas à incriminer une espèce mycoplasmique. L'aspect chronique de la maladie, décrit pour de nombreuses espèces, peut être un indice de l'implication de ces bactéries. Cependant, leur détection directe et/ou indirecte, est nécessaire pour confirmer leur rôle.

##### a) Sérologie

De par leurs caractéristiques génomiques et phénotypiques, les infections provoquées par les bactéries du genre *Mycoplasma* entraînent une réponse immunitaire variable.

*Mmm* est responsable d'une infection localisée, qui peut engendrer peu d'anticorps circulants, sans pour autant exclure des lésions pulmonaires chez l'hôte [Bygrave *et al.*, 1968]. Il est possible de ne jamais détecter une infection provoquée par *M. pneumoniae* par les méthodes de sérologie actuelles [Waites *et al.*, 2017]. La sérologie présente cependant plusieurs avantages : son coût réduit, son aspect non-invasif (prise de sang) et la rapidité des résultats obtenus après quelques minutes pour certains kits commerciaux [Register *et al.*, 2013 ; Waites *et al.*, 2017]. En médecine vétérinaire, la sérologie est donc préférentiellement utilisée pour le dépistage de groupes, comme les troupeaux de bovins. En cas de signes cliniques sur un individu, cette méthode permet de tester à moindre coût tous les sujets proches afin de mettre en place une prise en charge adaptée [Parker *et al.*, 2018]. À l'inverse, cette méthode peut permettre de prouver rapidement l'absence d'infection dans un troupeau [Andersson *et al.*, 2019].

Différents kits ciblant les anticorps produits contre *M. bovis* sont aujourd'hui disponibles sur le marché comme BIO K 260 (Bio-X diagnostics) ou Bovichek (Biovet Inc) [Register *et al.*, 2013 ; Parker *et al.*, 2018]. À l'inverse, il n'existe pas de kit actuellement pour la détection des mycoplasmes du groupe Mycoides chez les chèvres dues aux difficultés de création de tels outils et le marché réduit que représente cette filière.

#### b) Culture

À cause de la variabilité dans leurs caractéristiques génomiques, métaboliques et structurales, chaque espèce du genre *Mycoplasma* est cultivée dans des conditions particulières et des milieux spécifiques. Seule la température fait exception. En effet, la plupart des espèces mycoplasmiques ont une température optimale de croissance à 37 °C avec un développement possible entre 20 et 45 °C. Elles sont donc majoritairement mésophiles [Brown *et al.*, 2018].

Au fil du temps, certains scientifiques ont mis au point des milieux de culture pour les mycoplasmes comme le milieu de Frey, Hayflick ou encore Friis [Chanock *et al.*, 1962 ; Frey *et al.*, 1968 ; Friis, 1971]. Ces milieux diffèrent par leurs apports nutritifs, par exemple le milieu de Hayflick contient du sérum de cheval, le milieu de Frey du sérum de porc et celui de Friis comporte les deux. Ces sérums servent à apporter les stérols nécessaires à la croissance des bactéries du genre *Mycoplasma*. Les nombreux milieux de culture développés peuvent être supplémentés avec différents cofacteurs ou sources d'énergie, comme de l'arginine, nécessaire à certaines espèces [Razin *et al.*, 1998]. Le problème majeur de ces milieux de culture enrichis est la présence de réactifs biologiques comme le sérum dont la composition peut varier entraînant des différences de croissance d'un lot de milieu à l'autre. Des tentatives de création de milieu de croissance définis (dont tous les composants sont connus) sans sérum, ont eu lieu chez les espèces *M. pneumoniae* [Yus *et al.*, 2009], *M. hyorhinis* et *M. hyopneumoniae* [Beier *et al.*, 2018], mais ces milieux restent moins performants que ceux contenant du sérum et ne sont pas adaptés à toutes les espèces du genre *Mycoplasma*.

En raison de leur absence de paroi les bactéries du genre *Mycoplasma* sont naturellement résistantes aux antibiotiques ciblant cette structure (e.g :  $\beta$ -lactames, glycopeptides et fosfomycine) [Gautier-Bouchardon, 2018]. Ces molécules sont donc ajoutées au milieu de culture pour permettre l'inhibition de la flore bactérienne concomitante et donc leur croissance exclusive [Allam and Lemcke, 1975]. La filtrabilité des bactéries du genre *Mycoplasma* est un avantage en culture, car il permet leur sélection par filtration sur membrane à partir de prélèvements ou de bouillons de culture [Niu *et al.*, 2021].

Les temps d'incubation des bactéries du genre *Mycoplasma* sont supérieurs à la plupart des autres agents bactériens. L'espèce *M. bovis* croît sur gélose en 3 à 5 jours environ après ensemencement,

faisant d'elle une bactérie du genre *Mycoplasma* de croissance relativement rapide. L'espèce *M. hyopneumoniae* nécessite quatre à huit semaines avant d'être isolée à partir d'échantillons, et entre sept à dix jours d'incubation après enrichissement en bouillon de culture [Friis, 1975 ; Maes *et al.*, 1996]. De plus, des conditions d'humidité importante ( $\approx 95\%$ ) sont essentielles pendant ces longues incubations pour éviter la dessiccation des géloses, favorisant aussi le développement de champignons. C'est pourquoi des molécules antifongiques peuvent être aussi ajoutées dans les milieux de cultures afin de contrôler ces contaminations [Sharma *et al.*, 1998].

La forme caractéristique des bactéries du genre *Mycoplasma* sur certains milieux solides spécifiques peut aussi orienter leur identification. Cependant d'autres genres bactériens peuvent former des colonies en « œuf sur le plat », comme par exemple les bactéries appartenant au genre *Acholeplasma* [Parker *et al.*, 2018].

Comme certaines espèces du genre *Mycoplasma* sont des bactéries dites opportunistes, la détermination de leur charge dans le prélèvement initial peut être un bon indicateur de leur implication clinique dans l'infection. Cette évaluation est possible par l'ensemencement de géloses après dilutions sériées du prélèvement [Wood *et al.*, 1997]. En médecine humaine, pour la détection de l'espèce *M. hominis*, il existe des kits commerciaux de culture sur plaque qui permettent l'identification et le titrage de cette espèce en 24 à 48 h, e.g. Mycoplasma Duo Kit (Biorad) ou Mycoplasma IST 3 kit (Biomérieux).

La culture est donc toujours utilisée pour certaines espèces, mais pour d'autres, son temps de réalisation n'en fait pas un bon outil de diagnostic de première intention. Malgré tout, elle reste la seule technique permettant l'isolement des souches. Elle est donc indispensable pour caractériser plus finement les souches impliquées par des tests complémentaires, comme la détermination du profil de résistance aux antibiotiques, le clonage ou le séquençage.

### c) Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire, telles que la PCR, sont aujourd'hui privilégiées pour la détection des bactéries du genre *Mycoplasma* car elles sont plus sensibles et rapides que la culture [Sibila *et al.*, 2009 ; Waites *et al.*, 2017 ; Parker *et al.*, 2018]. Il est donc courant que lors de l'analyse de prélèvements respiratoires, les bactéries communes soient plutôt isolées par culture puis identifiées, et que les bactéries du genre *Mycoplasma* soient détectées par PCR [Wang *et al.*, 2020].

Le développement de certaines qPCR spécifiques de l'espèce, permet de coupler l'identification de l'espèce concernée et l'évaluation de sa charge dans le prélèvement [Chauhan *et al.*, 2021]. Des kits

commerciaux de détection simultanée de plusieurs espèces, souvent onéreux, existent. Ils peuvent également être développés selon les besoins [Cornelissen *et al.*, 2017].

La variabilité génétique des bactéries du genre *Mycoplasma* nécessite des mises à jour régulières des PCR pour assurer leur bon fonctionnement sur les souches terrains [Bashiruddin *et al.*, 2005 ; Wisselink *et al.*, 2019]. L'inconvénient majeur de la PCR est qu'il cible l'ADN, ce qui ne permet pas de dire si le pathogène détecté est vivant et virulent au moment du prélèvement [Wang *et al.*, 2020].

#### d) Méthodes alternatives

Les espèces du genre *Mycoplasma* après culture peuvent être identifiées à l'aide de la spectrométrie de masse par l'utilisation du MALDI-TOF [Pereyre *et al.*, 2013]. Une optimisation de l'utilisation du MALDI-TOF montre sa capacité à détecter les espèces mycoplasmiques après 48 à 72 h d'enrichissement en bouillon de culture, avec une bonne spécificité et sensibilité, en comparaison du test de référence PCR [Bokma *et al.*, 2019, 2020]. L'avantage de cette technique est sa capacité d'identifier un large panel d'espèces différentes, à partir de colonies ou de prélèvements enrichis. Cependant, les espèces ne peuvent être identifiées que si une banque de profils de référence par espèce a été générée au préalable. Ainsi, l'utilisation de cette technologie donne de bons résultats sur des espèces de mycoplasmes aviaires [Baudler *et al.*, 2019].

Le « dot immunobinding on membrane filtration » (MF dot) est une technique d'identification antigénique basée sur l'utilisation de sérums polyclonaux spécifiques des différentes espèces fréquemment isolées [Poumarat *et al.*, 1991]. Cette technique est employée aujourd'hui en France pour l'identification de bactéries du genre *Mycoplasma* chez les ruminants dans le cadre du réseau d'épidémiosurveillance Vigimyc [Jaÿ *et al.*, 2021]. Comme pour le MALDI-TOF, cette méthode est intéressante pour du diagnostic de routine sur des espèces connues.

L'avantage de ces deux technologies est la possibilité de tester un grand nombre d'espèces différentes, ce qui peut être très intéressant puisque plusieurs espèces de mycoplasmes peuvent cohabiter dans un même spécimen clinique. Elles nécessitent cependant une expertise et une connaissance des espèces potentiellement détectables afin d'éviter les faux négatifs.



### 2.4.3. Antibiorésistance

Dans le cadre du traitement d'une mycoplasmosse, l'évaluation du profil de résistance aux antibiotiques de la souche isolée est capitale, cette résistance pouvant être différente au sein d'une même espèce.

Il existe plusieurs résistances intrinsèques aux bactéries du genre *Mycoplasma* dues à leurs caractéristiques particulières. Le premier processus de résistance est structural, l'absence de paroi confère aux mycoplasmes une résistance aux antibiotiques ciblant sa synthèse, comme les  $\beta$ -lactamines ou les glycopeptides. Ces espèces sont également insensibles aux molécules ciblant la synthèse des lipopolysaccharides (polymixines) et de l'acide folique (sulfamide), car elles sont dépourvues de ces voies métaboliques [Gautier-Bouchardon, 2018]. Tous les mycoplasmes sont aussi résistants à la rifampicine (famille des rifamycines) suite à une mutation du gène *rpoB*, empêchant l'attachement de la molécule antibiotique à sa cible [Pereyre and Tardy, 2021]. Certaines espèces possèdent des résistances intrinsèques particulières, c'est le cas de *M. hominis* qui est résistante aux macrolides à 14 et 15 atomes de carbone [Waites *et al.*, 2013].

Pour les bactéries du genre *Mycoplasma*, les résistances acquises résultent principalement de mutations ponctuelles dans les gènes cibles [Gautier-Bouchardon, 2018 ; Pereyre and Tardy, 2021]. Les mécanismes liés à l'acquisition d'éléments génétiques mobiles sont plus rares (voir paragraphe 2.3.2). Des mécanismes d'efflux ont également été mis en évidence comme pouvant participer à la réduction de la sensibilité pour la ciprofloxacine et l'oxytétracycline [Raheison *et al.*, 2002 ; Tatay-Dualde *et al.*, 2021]. La formation de biofilm a montré chez différentes espèces, comme *M. pneumoniae* ou *M. hyopneumoniae*, une augmentation de la résistance aux molécules antibiotiques par un empêchement mécanique de l'antibiotique pour atteindre sa cible [Tassew *et al.*, 2017 ; Feng *et al.*, 2020].

Les mutations ponctuelles sont responsables de l'apparition de souches multirésistantes préoccupantes, par exemple chez les espèces *M. genitalium* et *M. bovis* qui sont toutes deux d'intérêt respectivement en médecine humaine et vétérinaire [Jensen *et al.*, 2016 ; Gautier-Bouchardon, 2018]. Ces résistances sont observées sur le terrain par des échecs thérapeutiques mais sont également démontrées par l'analyse *in vitro* des CMI.



► **Figure 14 :** Illustration de la technique d'estimation de la sensibilité de souches de *M. equirhinis* par dilution en milieu gélosé. La gélose présentée ici contient 0,5 µg/mL d'oxytétracycline. Chaque point de dépôt du multi- inoculateur correspond à un inoculum calibré d'une souche de *M. equirhinis*, observé après cinq jours d'incubation. L'absence de croissance pour une souche donnée signifie que sa CMI est inférieure ou égale à 0,5 µg/mL pour l'oxytétracycline. Photographie réalisée par le laboratoire Anses de Lyon.

Les milieux de croissance des mycoplasmes empêchent la diffusion linéaire des antibiotiques, ce qui ne permet pas l'utilisation de la méthode de diffusion en milieu gélosé (NF U47-107) généralement utilisée pour la majorité des autres espèces bactériennes. La technique consensuelle actuelle pour les bactéries du genre *Mycoplasma*, la CMI par dilution, consiste à déposer des gouttes chargées en bactéries (charges normalisées) sur des milieux gélosés ou liquides contenant des concentrations d'antibiotiques connus [Hannan, 2000 ; Gautier-Bouchardon, 2018]. Ensuite, les géloses ou les bouillons ainsiensemencés sont incubés en conditions optimales de croissance. La CMI est définie par le milieu avec la concentration de molécule la plus faible où la bactérie n'a pas réussi à se développer (**Figure 14**). Cependant, aucun milieu standardisé n'est pour le moment utilisé pour la culture des différentes espèces du genre *Mycoplasma*, ni même pour une espèce particulière, ce qui peut conduire à des résultats différents entre les laboratoires [Pereyre and Tardy, 2021]. En 2011, l'Institut des normes cliniques et de laboratoire (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) a défini les concentrations cliniques seuils pour les antibiotiques d'intérêts vis-à-vis de *M. hominis* et *M. pneumoniae* [Pereyre and Tardy, 2021]. Pour les différentes espèces mycoplasmiques d'intérêt vétérinaire, il n'existe pas de méthode standardisée ni de seuils cliniques validés par un organisme de référence comme le Comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ou EUCAST. L'interprétation clinique des tests de sensibilité *in vitro* doit donc être faite avec prudence.



► **Tableau 6 : Principales études de prévalence de bactéries du genre *Mycoplasma* par culture à partir d'écouvillons des voies respiratoires supérieures.**

Pays / Date(s)	Référence	Type de chevaux	Condition clinique	Région du tractus respiratoire analysée	Nombre de chevaux prélevés	Préincubation des écouvillons dans un milieu de culture adapté	Prévalence des bactéries du genre <i>Mycoplasma</i>
Allemagne 1972	Kirchhoff <i>et al.</i> , 1972	Non spécifié	Asymptomatique	Pharynx et poche gutturale	83	Oui	2,4 %
			Maladie respiratoire aigue				21
Angleterre 1973 - 1975	Allam et Lemcke, 1975	Pur-sang	Asymptomatique	Nasopharynx	198	Non	1,5 %
			Maladie respiratoire aigue				130
Australie 1976	Moorthy et Spradbrow, 1976	Non spécifié	Asymptomatique	Cavité nasale	25	Non	0 %
			Maladie respiratoire				18
Hongrie 1986	Antal <i>et al.</i> , 1988	Poulains	Pneumonie	Cavité nasale	30	Oui	93,3 %

### 3. Bactéries du genre *Mycoplasma* chez le cheval

Avant de nous concentrer sur les bactéries du genre *Mycoplasma* dans la sphère respiratoire équine, il est important de mentionner que ce genre bactérien est également rapporté dans la sphère génitale équine [Dienes, 1940 ; Moorthy *et al.*, 1977 ; Doig, 1981], comme chez beaucoup d'autres espèces hôtes. Ces mycoplasmes ont été associés à la stérilité, l'endométrite, la vulvite et aux avortements chez les juments, ainsi qu'à une fertilité diminuée et à l'inflammation du pénis chez les étalons [Heitmann *et al.*, 1979 ; Kirchhoff *et al.*, 1980]. En 2002, Spergser et son équipe ont identifié les espèces *M. equigenitalium* (47 %), *M. subdolum* (39 %) et *M. equirhinis* (19 %) à partir de 438 échantillons génitaux de 116 étalons et ce, sans corrélation avec des anomalies des organes génitaux ni de réduction de la fertilité [Spergser *et al.*, 2002]. Les étalons peuvent être des porteurs asymptomatiques et de potentiels réservoirs contaminants lors des saillies. Aujourd'hui, *M. equigenitalium* et *M. subdolum* sont considérés comme des pathogènes opportunistes de la sphère génitale équine [Brown *et al.*, 2018]. Leur implication dans les pathologies associées n'est pas totalement comprise et nécessite davantage de travaux sur le sujet [Nehra *et al.*, 2015]. Par ailleurs, des mycoplasmes hémotrophes ont également été détectés chez le cheval avec une prévalence de 26,5 % en Allemagne, en association avec une diminution du nombre de globules rouges et d'hémoglobine mais sans anémie [Dieckmann *et al.*, 2012].

La première détection de bactéries du genre *Mycoplasma* à partir d'écouvillons respiratoires équins ciblant le pharynx et la poche gutturale a eu lieu en Allemagne en 1972 par culture bactérienne [Kirchhoff *et al.*, 1972]. Trois études ont par la suite utilisé le même outil de prélèvement mais en ciblant des régions différentes (nasopharynx ou cavité nasale) [Allam and Lemcke, 1975 ; Moorthy and Spradbrow, 1976 ; Antal *et al.*, 1988]. Les prévalences obtenues sont très variables en fonction des pays et de la région écouvillonnée. Elles sont systématiquement augmentées en présence de signes cliniques (**Tableau 6**). L'utilisation de la pré-incubation des écouvillons en milieu de culture semble apporter une meilleure détection des bactéries du genre *Mycoplasma*.

Les auteurs de la dernière étude suggèrent un rôle clinique des bactéries du genre *Mycoplasma* dans les pneumonies du poulain [Antal *et al.*, 1988]. Cependant, 76 % des poulains testés, pour la détection d'autres bactéries, étaient également positifs à des streptocoques ou à *R. equi*. Par ailleurs, la détection de bactéries du genre *Mycoplasma* dans les cavités nasales de neuf poulains, juste après leur naissance (31,2 %) suppose une possible contamination par la mère. Cette étude ne permet donc pas de conclure sur la relation entre la présence des bactéries du genre *Mycoplasma* et l'apparition des signes.

► **Tableau 7 : Synthèse des prévalences des bactéries du genre *Mycoplasma* décrites dans les voies respiratoires équines à partir de lavages trachéaux.**

Pays / Date(s)	Publication	Population	Méthode d'analyse des prélèvements	Pourcentage de détection de <i>Mycoplasma</i> spp.	Pourcentage de détection de <i>M. equirhinis</i>	Pourcentage de détection de <i>M. felis</i>
Australie 1997 - 1998	Christley <i>et al.</i> , 2001	100 cas de toux à l'effort	<b>Culture</b> : Dépôt sur gélose après dilution en série et incubation 28 jours	0 %	/	/
		148 cas contrôles				
Angleterre 1993-1996	Newton <i>et al.</i> , 2003 et Wood <i>et al.</i> , 2005	564 cas contrôles	<b>Culture</b> : dépôt sur gélose et incubation en bouillon de culture 21 jours	14,9 %	11,4 %	1,2 %
		129 cas cliniques		27,1 %	13,9 %	7,8 %
Angleterre 2003 - 2005	Cardwell <i>et al.</i> , 2013	295 cas de chevaux à l'entraînement	Non précisé	14,6 %	10,2 %	1,4 %
Turquie 2017	Mete <i>et Özgür</i> , 2017	111 chevaux présentant de la contre performance et/ou des bruits respiratoires	<b>Culture</b> : Deux passages à l'aveugle des bouillons de culture ensemencés et 14 jours d'incubation après dépôt sur gélose <b>PCR</b> : Deux passages à l'aveugle des bouillons de culture ensemencés et 14 jours d'incubation avant extraction de l'ADN	16,2 %	16,2 %	0 %
				59,5 %	6,3 %	1,8 %
Japon 2018 - 2020	Uchida-Fujii <i>et al.</i> , 2021	37 chevaux asymptomatiques	<b>Culture</b> : Dépôt sur gélose après 72h d'incubation en bouillon de culture puis incubation 7 jours	13,5 %	13,5 %	0 %
		40 chevaux avec de la toux		40 %	40 %	0 %
		22 chevaux présentant des signes respiratoires		18,2 %	13,6 %	2,5 %

De façon générale, toutes ces études portant sur les voies respiratoires supérieures interrogent sur le choix du prélèvement au vu des maladies respiratoires décrites. Les études qui ont suivi se sont donc concentrées sur des prélèvements des voies respiratoires profondes, comme le LT, plus à même d'expliquer les signes respiratoires rencontrés en cas de positivité. Le **tableau 7** résume les différentes études conduites à partir de ces prélèvements.

La non-détection des bactéries du genre *Mycoplasma* en Australie par méthode culturale montre l'intérêt d'une étape d'enrichissement en bouillon de culture au regard des pourcentages de détection observés dans les autres études (**Tableau 7**). Malgré tout, lorsque la méthode de culture et d'isolement n'est pas précisée ou reste confuse, il est impossible de comparer les résultats ou de reproduire les manipulations effectuées [Newton *et al.*, 2003 ; Cardwell *et al.*, 2013].

La combinaison de la PCR et de la méthode culturale conduite par Mete et Özgür, montre que la détection par biologie moléculaire est potentiellement beaucoup plus sensible pour l'analyse du genre *Mycoplasma* dans les LT équins [Mete and Özgür, 2017]. Cependant, les travaux de Poulain (thèse vétérinaire) suggèrent une prévalence de 12 % après l'analyse de 83 LT de chevaux en France malgré l'utilisation de la PCR [Poulain, 2017]. Cette dernière étude non publiée constitue une des rares sources de données chiffrées concernant ces bactéries en France.

Aujourd'hui, les vétérinaires suspectent la présence de mycoplasmes dans la sphère respiratoire équine en cas d'une infection chronique, avec toux ou jetage et un échec de rémission clinique après traitement antibiotique classique [Poulain, 2017]. Cependant, ce diagnostic est empirique et le réel rôle des bactéries du genre *Mycoplasma* dans l'apparition de signes cliniques est incertain.

### 3.1. Espèces non spécifiques du cheval

Parmi les différentes espèces du genre *Mycoplasma* identifiées dans le tractus respiratoire équin, certaines n'ont pas été décrites exclusivement chez le cheval. Parmi ces espèces, il faut différencier celles qui sont le fruit d'une contamination extérieure et celles qui pourraient être des agents infectieux équins. Les espèces *M. salivarium*, *M. arginini* et les souches *Mycoplasma* sp. N3 et N11 font assurément partie de la première catégorie. En effet, *M. salivarium* est une espèce endémique de la cavité buccale chez l'Homme pouvant jouer un rôle dans des gingivites [Engel and Kenny, 1970]. Son isolement à partir des tonsilles (pourtour du pharynx) de trois chevaux exempts de signes respiratoires pourrait être dû à une contamination par un opérateur au moment des prélèvements ou de la réalisation de la culture [Tully and Whitcomb, 1979]. *M. arginini* est une espèce considérée comme potentiellement pathogène uniquement chez les bovins et les moutons [Brown *et al.*, 2018]. Son identification à partir des cavités nasales d'un cheval atteint d'une rhinite ne permet pas de lier son

implication à la maladie [Moorthy and Spradbrow, 1976]. Les souches de *Mycoplasma* N3 et N11 ont été isolées à partir d'écouvillons nasopharyngés équins et ont été rapportées comme proches de l'espèce *M. mycoides* subsp. *capri* [Allam and Lemcke, 1975 ; Lemcke *et al.*, 1981]. La souche N3 est incapable de proliférer dans le tractus respiratoire équin après infection expérimentale [Lemcke *et al.*, 1981].

Toutes ces espèces ont été isolées des voies respiratoires supérieures chez le cheval, mais détectées chez très peu d'individus, tant et si bien qu'il est impossible d'établir un lien de causalité entre leur détection et de potentiels signes cliniques observés.

### 3.1.1. *M. pulmonis*

Chez le cheval, l'espèce *M. pulmonis* est particulière, car elle a été isolée uniquement du nasopharynx de trois chevaux atteints de maladie respiratoire aiguë [Allam and Lemcke, 1975]. En Allemagne, l'analyse de 38 sérums de chevaux atteints de maladies respiratoires a montré une détection d'anticorps ciblant *M. pulmonis* dans 40 % des prélèvements [Kirchhoff *et al.*, 1982]. L'espèce *M. pulmonis* n'ayant pas été retrouvée par la suite dans le système respiratoire équin, son rôle clinique est toujours incertain.

L'hôte préférentiel de l'espèce *M. pulmonis* est la souris ou le rat chez qui elle est associée à des infections respiratoires [Schoeb, 2000 ; Tully and Whitcomb, 1979]. Cette espèce est capable de provoquer des pneumonies et des lésions pulmonaires, mais la sévérité des signes est souche dépendante [Davidson *et al.*, 1988]. Il a également été démontré que cette espèce était capable d'infection des voies génitales chez le rat et la souris [Saito *et al.*, 1976]. *M. pulmonis* a déjà été détecté chez l'Homme à partir d'écouvillons oropharyngés, chez des personnes en contact régulier avec des rats, mais jamais sa détection n'a été reliée à des symptômes cliniques [Piasecki *et al.*, 2017].

### 3.1.2. *M. felis*

Chez le cheval, l'espèce *M. felis* a été identifiée en 1975 par Allam et Lemcke, à partir des échantillons de l'étude de 1973 de Windsor et collaborateurs, sans établir de lien entre l'isolement et les signes cliniques [Windsor, 1973 ; Allam and Lemcke, 1975]. Par la suite, certaines souches de *M. felis*, ont été associées à des pleurites et péricardites équines [Ogilvie *et al.*, 1983 ; Hoffman *et al.*, 1992 ; Morley *et al.*, 1996]. La première étude d'Ogilvie et collaborateurs a permis l'isolement d'une souche de *M. felis* à partir de la cavité thoracique d'un cheval atteint de pleurite. Ensuite, les auteurs ont inoculé la souche isolée dans le thorax d'un poney et montré le développement d'une inflammation pleurale [Ogilvie *et al.*, 1983]. Dans l'étude de Hoffman et collaborateurs, après diagnostic d'une pleurésie d'origine bactérienne chez deux chevaux athlètes, l'agent causal de la

maladie a été recherché par culture et seule l'espèce *M. felis* a été détectée [Hoffman *et al.*, 1992]. Le cas rapporté par Morley et collaborateurs en 1996 concerne un cheval diagnostiqué comme atteint de pleurésie et de péricardite. À nouveau, seul *M. felis* a été isolée à la suite des analyses par culture bactérienne [Morley *et al.*, 1996].

En 1997, Wood et collaborateurs observent des signes cliniques liés à des maladies respiratoires des voies inférieures chez 22 chevaux à l'entraînement. Après analyse sérologique, les auteurs ont montré que 19 des 22 animaux testés présentaient une séroconversion à *M. felis* [Wood *et al.*, 1997]. La détection par méthode culturale quantitative a montré la présence de l'espèce *M. felis* à plus de 10<sup>4</sup> CFU/mL dans quatre des cinq LT positifs en culture. Les auteurs ont conclu à l'implication unique de *M. felis* dans cet épisode infectieux en raison de leur charge importante et en l'absence de séroconversion à EHV-1 et EHV-4 [Wood *et al.*, 1997].

Par la suite, différentes études ont identifié l'espèce *M. felis* à partir de lavages trachéaux (**Tableau 7**). Lors de leur étude, Newton et collaborateurs ont montré une association positive entre la détection de *M. felis* et la présence de signes respiratoires [Newton *et al.*, 2003]. Cependant, dans toutes les autres études, la trop faible prévalence de *M. felis* ne permet pas de l'associer à des signes cliniques (**Tableau 7**). Quelle que soit la méthode employée pour mettre en évidence *M. felis*, les prévalences observées sont proches (**Tableau 7**). Malgré la faible prévalence de *M. felis* dans les prélèvements respiratoires équin, sa récurrence dans les différentes études indique que cette espèce est à même de coloniser les voies respiratoires du cheval [Brown *et al.*, 2018]. Le premier génome d'une souche de *M. felis* isolée du lavage trachéal d'un cheval a été publié en 2020 par une équipe japonaise [Kinoshita *et al.*, 2020]. Le génome de la souche équine présente une homologie nucléotidique de 98,2 % avec la souche de référence ATCC 23391 isolée d'un chat.

L'hôte préférentiel de l'espèce *M. felis*, comme son nom l'indique, est le chat. *M. felis* est principalement impliqué dans des conjonctivites infectieuses [Cole *et al.*, 1967] et dans les infections des voies respiratoires supérieures. *M. felis* est considéré comme un pathogène secondaire des voies respiratoires et responsable de surinfection chez son hôte [Haesebrouck *et al.*, 1991 ; Fernandez *et al.*, 2017 ; Le Boedec, 2017]. Les mécanismes de virulence associés à cette espèce sont peu décrits, toutefois elle serait capable d'agir sur le système immunitaire de l'hôte [McLellan, 2017].

## 3.2. Espèces inféodées au cheval

### 3.2.1. *M. fastidiosum*

L'espèce *M. fastidiosum* a été isolée en 1978 de prélèvements nasopharyngés équins par Lemcke et Poland. Elle doit son nom à sa culture fastidieuse ayant nécessité le développement d'un milieu spécifique [Lemcke and Poland, 1980]. L'infection expérimentale de deux poulains par la souche de référence 4822 a montré une persistance de cette espèce dans les voies nasales et une réaction du système immunitaire, mais l'absence de signes respiratoires [Lemcke and Poland, 1980].

### 3.2.2. *M. equirhinis*

Les premières souches de l'espèce *M. equirhinis* ont été isolées en 1975 par Allam et Lemcke à partir d'écouvillons nasopharyngés et trachéaux. Ces souches ont été retrouvées chez des chevaux sains et d'autres présentant des signes cliniques respiratoires [Allam and Lemcke, 1975]. Une infection expérimentale avec une souche de *M. equirhinis* isolée d'un cheval malade, par voie nasale, a montré la production d'anticorps neutralisant par le cheval infecté [Hooker and Butler, 1977]. Comme pour *M. fastidiosum*, cette espèce est donc capable de provoquer une réaction immunitaire de l'hôte mais aucun signe respiratoire associé n'a été mis en évidence.

Lors de son isolement, Allam et Lemcke ont relevé deux traits caractéristiques pour l'espèce *M. equirhinis*. Les souches sont capables d'hydrolyser l'arginine, provoquant une basification du milieu de culture, et forment du « film and spot » sur gélose (**Figure 9**). Comme pour l'espèce *M. felis*, *M. equirhinis* a été identifiée lors de nombreuses études conduites à partir de lavages trachéaux dans différents pays (**Tableau 7**).

Au cours de ces différentes études, la prévalence de *M. equirhinis*, présente des variations, vraisemblablement attribuables aux divergences méthodologiques et aux spécificités des populations étudiées (**Tableau 7**). L'étude menée en Angleterre par Newton et ses collaborateurs n'a pas révélé d'association significative entre la présence de *M. equirhinis* et des signes cliniques respiratoires chez les équidés. En revanche, l'étude conduite par Wood, basée sur la même population, a suggéré une association potentielle entre la détection de *M. equirhinis* et la présence d'une inflammation des voies respiratoires inférieures [Newton *et al.*, 2003 ; Wood *et al.*, 2005]. La prévalence la plus élevée (40 %) a été observée dans l'étude réalisée au Japon, en 2021, dans le groupe de chevaux analysé lors d'une épizootie dans un centre d'entraînement [Uchida-Fujii *et al.*, 2021].

L'analyse de cette espèce par les outils de génomique semble complexe vu le nombre très faible de séquences disponibles. À ce jour, seules deux génomes sont disponibles. La souche NCTC 10148,

isolée par Allam et Lemcke en 1975, a été séquencée en 2019 et son génome définitif est fragmenté en 67 contigs. En 2023, un génome circularisé d'une souche de *M. equirhinis* provenant d'un cheval au Japon a été rendu public sur NCBI (GCF\_030295865.1).

Ces différents travaux pointent le manque de standardisation des méthodes de détection des bactéries du genre *Mycoplasma* dans les prélèvements respiratoires équins, ce qui rend la comparaison des différents résultats obtenus difficile. En France, seuls des travaux d'une thèse vétérinaire ont été réalisés sur le sujet et n'ont pas permis de définir le rôle clinique de ces bactéries, obligeant les vétérinaires à agir de manière empirique sur le terrain en cas de détection [Poulain, 2017]. Une prévalence de 15 à 20 % des bactéries du genre *Mycoplasma* a pu être déterminée sur les prélèvements reçus à LABÉO où la recherche par PCR en temps-réel de ces bactéries a été développée dès 2014.

Ces constats ont conduit à la construction du projet MYCOPAB, dans lequel s'inscrit cette thèse de doctorat, dont le but est de comprendre l'association entre la détection des espèces du genre *Mycoplasma* et les affections respiratoires des chevaux. Le projet MYCOPAB comprend trois objectifs :

- Optimiser et caractériser des outils de détection, d'isolement et d'identification des bactéries du genre *Mycoplasma* dans les prélèvements respiratoires équins.
- Définir les espèces du genre *Mycoplasma* circulantes en France et leur implication dans les affections respiratoires équines.
- Caractériser ces bactéries, à l'aide d'analyses phénotypiques et génomiques, pour décrire leur diversité et conclure sur leur importance clinique.

Ces objectifs ont pour but d'aider la filière équine et en particulier les vétérinaires afin qu'ils puissent réagir de façon adaptée en cas de détection de bactéries du genre *Mycoplasma*.





**– CHAPITRE 1 –**

---

**DÉTECTION DU GENRE *MYCOPLASMA*  
CHEZ DES CHEVAUX ATTEINTS DE  
TROUBLES RESPIRATOIRES**

## CHAPITRE 1 : DÉTECTION DU GENRE *MYCOPLASMA* CHEZ DES CHEVAUX ATTEINTS DE TROUBLES RESPIRATOIRES

---

Pour atteindre le premier objectif du projet MYCOPAB, une première étude a été conçue pour optimiser et caractériser un ensemble d'outils permettant de détecter, d'isoler les bactéries du genre *Mycoplasma* dans des échantillons respiratoires de chevaux et d'identifier les souches isolées jusqu'au niveau de l'espèce. Ces outils ont ensuite été validés sur un ensemble de prélèvements cliniques pour préciser la prévalence des mycoplasmes et définir les prévalences par espèce. Des facteurs de risque associés à une infection par des bactéries du genre *Mycoplasma* ont été recherchés, en fonction des commémoratifs du cheval, en comparant ces résultats de détection et d'identification.

La PCR en temps réel (rt-PCR) de LABÉO, précédemment validée sur la souche NCTC 10160 de *M. felis* a été testée pour son efficacité sur *M. felis*, *M. equirhinis* (souches terrains) et *M. pulmonis* (souche NCTC 10139) selon les directives de la norme AFNOR NF U47-600-2. La sensibilité analytique de la méthode, avec et sans enrichissement, a été déterminée sur les mêmes souches, en suivant les recommandations de l'association américaine des diagnosticiens de laboratoire vétérinaire (AAVLD) [Toohey-Kurth *et al.*, 2020]. La sensibilité d'un protocole de culture prenant en compte les différents temps de croissance des espèces a été déterminée selon les mêmes recommandations. Ces outils ont été évalués sur un grand nombre d'échantillons cliniques (n= 616) et la prévalence de *Mycoplasma* spp. a été analysée en fonction du type d'échantillon ainsi que de l'âge, la race et le sexe des chevaux. L'identification jusqu'à l'espèce a été réalisée à partir des bouillons positifs en PCR et des souches isolées par séquençage Sanger de l'ADNr 16S de *Mycoplasma* spp. et de deux PCR spécifiques d'espèces en point-final, ciblant respectivement le gène ADNr 16S de *M. pulmonis* et *M. equirhinis* [van Kuppeveld *et al.*, 1992 ; Robinson, 2006].

Des rendements de PCR allant de 81 à 90 % ont été obtenus pour les trois espèces ciblées, ce qui est conforme aux exigences de la norme AFNOR NF U47-600-2 qui préconise une efficacité comprise entre 75 et 125 %. La limite de détection de la rt-PCR ciblant l'ADNr 16S a été définie entre 4,5 et 12,3 copies du génome par microlitre pour les espèces testées. L'étape de pré-enrichissement en bouillon a été validée comme permettant un gain de sensibilité important puisque l'espèce *M. equirhinis* est détectée à une concentration 10 000 fois inférieure à celle détectée par la PCR sans enrichissement. Les limites de détection de la méthode, par PCR post-enrichissement, sont inférieures à 1 UFC/mL pour *M. felis* et *M. equirhinis* et de 100 UFC/mL pour *M. pulmonis*. La PCR post-enrichissement est 10 fois plus sensible que la culture pour *M. felis* et *M. equirhinis* mais les deux méthodes sont équivalentes pour détecter *M. pulmonis*.

Parmi les échantillons cliniques testés, un prélèvement a été considéré comme positif pour la présence de mycoplasmes s'il était positif par au moins l'une des deux méthodes utilisées (PCR post-enrichissement et culture). Dans notre population, 104 prélèvements se sont révélés positifs au genre *Mycoplasma*, soit une prévalence de 16,9 %. L'espèce *M. equirhinis* a été identifiée dans 85 % des extraits ADN disponibles provenant de bouillons positifs en PCR et 98 % des souches isolées. *Mycoplasma* spp. et *M. equirhinis* ont été détectés plus fréquemment dans les LT que dans les LBA et dans les prélèvements provenant de chevaux de races de course (trotteurs et galopeurs).

Les outils de détection ont donc été optimisés pour permettre une détection sensible et spécifique des bactéries du genre *Mycoplasma* à partir de prélèvements respiratoires équins. Le protocole de culture a permis d'isoler pour la première fois en France un nombre conséquent de souches issues de prélèvements respiratoires équins et permet d'envisager leur étude plus approfondie. La détection plus importante des bactéries du genre *Mycoplasma* chez les chevaux de course pourrait s'expliquer par leur suivi médical régulier, ou leur mode de vie lié aux compétitions. Cette étude montre, en France, une détection majoritaire de l'espèce *M. equirhinis* dont le rôle clinique reste encore à définir.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue « Equine Veterinary Journal », combinés à une infographie.



Volume 55 | Number 6 | November 2023 | ISSN 0425 1644

# Equine Veterinary Journal

A journal of the  
British Equine Veterinary Association

**Publication**

View this journal online at  
[www.wileyonlinelibrary.com/journal/evj](http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/evj)  
[www.beva.org.uk/education/journals](http://www.beva.org.uk/education/journals)

WILEY

 BEVA

# INFOGRAPHIE

## DETECTION OF *MYCOPLASMA* SPP. IN HORSES WITH RESPIRATORY DISORDERS

Matthieu MARTINEAU, Sophie CASTAGNET, Elena KOKABI, Agnès TRICOT, Maryne JAÿ, Albertine LEON, Florence TARDY



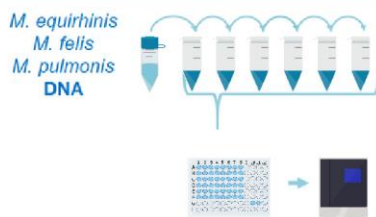
### INTRODUCTION

Bacteria belonging to the genus *Mycoplasma* are often involved in respiratory disorders in their animal hosts. Three species have been reported so far from the respiratory tract of horses worldwide: *Mycoplasma (M.) equirhinis*, *M. pulmonis* and *M. felis*. Their clinical role remains unclear, partly owing to the lack of standardised detection tools.

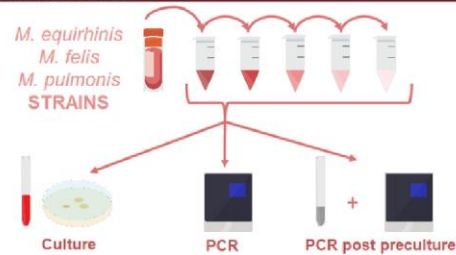
### AIM OF THE STUDY

- i) developing and validating tools to detect, isolate and identify strains from different *Mycoplasma* species in clinical respiratory equine specimens and
- ii) subsequently defining the three species' prevalence in France depending on the sample types and horses' characteristics (age, breed and sex).

### VALIDATION OF DETECTION TOOLS

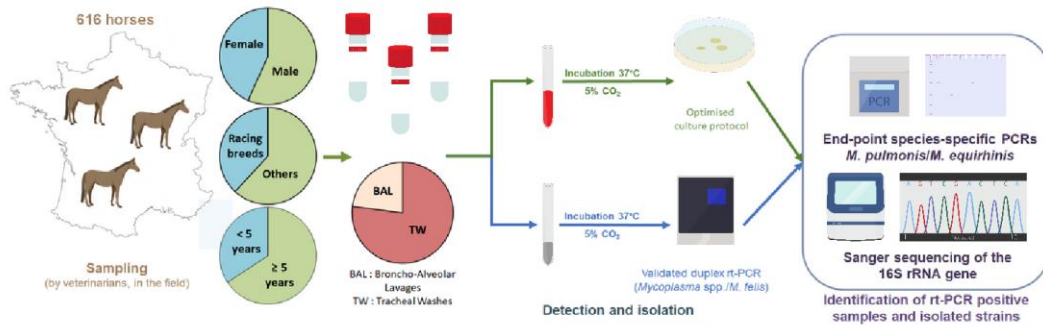


Validation of a real-time PCR assay

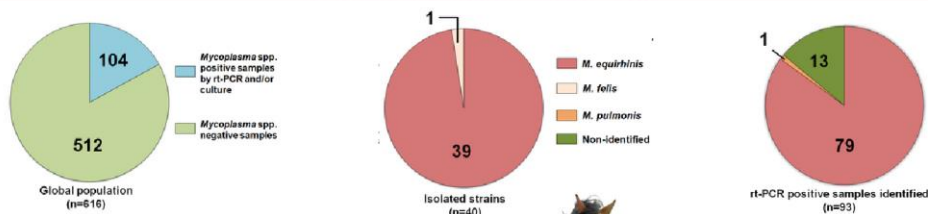


Compared analytical sensitivity of three methods

### ANALYSIS OF THE CLINICAL POPULATION



### DETECTION AND IDENTIFICATION RESULTS



### PREVALENCE IN DIFFERENT SUBGROUPS

Racing breed horses have a significantly higher prevalence of *Mycoplasma* spp. and *M. equirhinis* and a significantly greater risk of being positive in multivariate analysis. *Mycoplasma* spp. and *M. equirhinis* are significantly more frequently detected in tracheal washings in our population.



[HTTPS://BEVA.ONLINELIBRARY.WILEY.COM/DOI/10.1111/EJ.13918](https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ej.13918)

# Detection of *Mycoplasma* spp. in horses with respiratory disorders

Matthieu Martineau<sup>1,2,3</sup>  | Sophie Castagnet<sup>1,2</sup> | Elena Kokabi<sup>1,2</sup> |  
Agnès Tricot<sup>3</sup> | Maryne Jaÿ<sup>3</sup>  | Albertine Léon<sup>1,2</sup>  | Florence Tardy<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>LABÉO, Research Department, St Contest, Caen, France

<sup>2</sup>NormandieUniversité, CAEN/ROUEN Universités, DYNAMICURE, INSERM U1311, France

<sup>3</sup>Université de Lyon, Anses, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses Animales, Lyon, France

## Correspondence

Albertine Léon, LABÉO, Research Department, St Contest, Caen, France.

Email: [albertine.leon@laboratoire-labeo.fr](mailto:albertine.leon@laboratoire-labeo.fr)

Florence Tardy, Université de Lyon, Anses, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses Animales, 69280 Marcy-l'Étoile, Lyon, France.

Email: [florence.tardy@anses.fr](mailto:florence.tardy@anses.fr)

## Funding information

Fonds Eperon; Groupement d'Intérêt Scientifique Centaure; Institut Français du Cheval et de l'Équitation

## Abstract

**Background:** Bacteria belonging to the genus *Mycoplasma* are small-sized, have no cell walls and small genomes. They commonly cause respiratory disorders in their animal hosts. Three species have been found in the respiratory tract of horses worldwide, that is., *Mycoplasma* (*M.*) *equirhinis*, *M. pulmonis* and *M. felis*, but their role in clinical cases remains unclear.

**Objectives:** The aim of this study was to i) develop and validate tools to detect, isolate and identify different *Mycoplasma* spp. strains in clinical equine respiratory-tract specimens and ii) subsequently define the prevalence of the three species in France depending on sample types and horse characteristics (age, breed, sex).

**Study design:** Validation of a workflow for mycoplasma diagnosis and subsequent prevalence study.

**Methods:** Mycoplasma-free tracheal wash samples spiked with numerated strains and DNA dilutions were used to validate the culture methods and real-time PCR (rt-PCR) assay. Isolated strains were identified by 16S rRNA gene sequencing. Prevalences were determined on a population of 616 horses with respiratory disorders, sampled in France in 2020.

**Results:** In total, 104 horses (16.9%) were found to be positive for *Mycoplasma* spp. by at least one method. *M. equirhinis* was the predominant circulating species, accounting for 85% of the rt-PCR-positive samples and 98% of the 40 cultured strains.

**Main limitation:** The proposed pre-enrichment procedure improves the sensitivity of detection but hinders the quantification of the initial mycoplasma load in the clinical specimens.

**Conclusions:** Prevalence of mycoplasma varied with age, breed, and type of sample.

## KEYWORDS

detection, horse, *M. equirhinis*, *Mycoplasma* spp., respiratory tract

Albertine Léon and Florence Tardy contributed equally.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Equine Veterinary Journal* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of EVJ Ltd.



## 1 | INTRODUCTION

Bacteria belonging to the genus *Mycoplasma* (*M.*) are small-sized cells that have no cell walls. Their small genomes and thus narrow metabolic pathways make them the simplest organisms able to self-replicate in cell-free media *in vitro*.<sup>1</sup> They are fastidious to culture, requiring specific complex growth media and controlled CO<sub>2</sub> and humidity conditions.<sup>2</sup> More than a hundred *Mycoplasma* species have so far been found in different animal hosts, where they are either commensals, opportunists or primary pathogens.<sup>3</sup> *Mycoplasma* infections commonly target the respiratory tract. Mycoplasmal respiratory infections are typically caused by *M. pneumoniae* in humans,<sup>4</sup> *M. bovis* in cattle,<sup>5</sup> and *M. gallisepticum* in poultry.<sup>6</sup> Respiratory disorders in horses are a major cause of poor performance<sup>7,8</sup> and thus of significant economic losses for the equine industry,<sup>9</sup> and include both equine asthma and bacterial or viral infections.<sup>10</sup> Bacteria responsible for bronchopneumonia, pneumonia or pleuropneumonia of horses are numerous, including non-enteric (e.g., *Pasteurella* or *Actinobacillus* spp.) or enteric (e.g., *Klebsiella* spp.) Gram-negative bacteria or anaerobes (e.g., *Bacteroides* spp.) or more frequently gram-positive aerobes (*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* being the commonest while *Rhodococcus equi* is seldom found in immunocompetent adults).<sup>11,12</sup> Viral respiratory infections are mostly caused by equine influenza virus or equine herpesviruses (EHV-1 and EHV-4) and are associated with various signs such as fever, cough and nasal discharge.<sup>13</sup> An old study conducted in 1975 reported the isolation of three *Mycoplasma* species, that is., *M. equirhinis*, *M. felis* and *M. pulmonis*, from nasopharyngeal swabs of both healthy horses and horses with severe respiratory disorders.<sup>14</sup> In the early 1980s another *Mycoplasma* species, isolated from the respiratory tract of horses, was described, namely *M. fastidiosum*.<sup>15</sup> From that day on, there have been regular reports of *M. felis* and *M. equirhinis* but not *M. pulmonis*, nor *M. fastidiosum*<sup>16,17</sup> in the respiratory tract of horses in various countries, but their clinical significance remains unclear.<sup>18</sup> The difficulty in specifying the aetiological role of these bacteria is partly due to the lack of systematic detection during diagnostic investigation and the absence of characteristic clinical signs. For instance, *M. felis*, a recognised cat pathogen, was suspected to be involved in pericarditis and/or pleuritis of horses, as it was isolated from pleural fluid in which no other bacterial species were detected.<sup>19,20</sup> *M. pulmonis*, a rodent pathogen, has occasionally been isolated from the nasopharynx of horses.<sup>21</sup> *M. fastidiosum* has never been documented in clinical cases so far. *M. equirhinis*, considered an opportunistic pathogen in horses,<sup>3</sup> was recovered from tracheal washes (TW) of horses with or without clinical signs.<sup>16,17</sup> In France, there are still no data available on how often mycoplasmas circulate in equids and which species are involved. A rough estimate based on routine real-time PCR (rt-PCR) analysis at LABÉO suggested an approximate prevalence of *Mycoplasma* spp. of 15.2% in clinical respiratory specimens. Unfortunately, we cannot reasonably compare this prevalence figure with other datasets from different countries due to differences in experimental designs and detection methods.<sup>16–18,22</sup> Furthermore, we have no details concerning the *Mycoplasma* species present.

This study was designed to optimise and validate a set of tools to detect *Mycoplasma* spp. in horse respiratory specimens and to identify the strains involved to species level. We then assessed these tools on a large set of clinical specimens collected in 2020. The prevalence of *Mycoplasma* spp. was analysed according to sample type and to the main characteristics of the horses (age, breed, sex) in order to determine whether presence of a mycoplasma is significantly associated with specific horse characteristics.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study population and samples

A total of 616 samples were collected in 2020 from horses in France and submitted to LABÉO laboratory (Saint-Contest, France) for diagnosis of suspected respiratory disorders. Samples were either tracheal washes (TW, *n* = 473, 76.8%) including tracheal aspirates or bronchoalveolar lavages (BAL, *n* = 143, 23.2%). Horses with known characteristics were grouped into different categories: < 5 years and ≥ 5 years of age, racing breeds (i.e., Thoroughbreds and trotters) versus others (for instance, saddle horse, pony, etc.), and males versus females.

### 2.2 | Handling of incoming clinical specimens

Clinical samples sent to LABÉO were processed via a routine workflow, that is., 200 µl of the TW or BAL samples was seeded into 1.8 ml of mycoplasma culture broth (INDICIA) and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for *Mycoplasma* spp. enrichment during 3–7 days before DNA extraction. For this study purpose, another 200 µl of the sample was seeded in 1.8 ml of culture broth (broth B1) containing phenol red, used as pH indicator, and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for mycoplasma growth. The B1 broth was examined daily for 72 hours to track any changes in turbidity, pH, and contamination, then further processed as described in Data S1 in order to optimise the isolation of mycoplasma colonies.

### 2.3 | Real-time PCR (rt-PCR) assays on enriched clinical specimens

A multiplex rt-PCR adapted from previous works<sup>23–25</sup> was developed and validated to detect *Mycoplasma* spp. and *M. felis* (Data S2). The 20 µl PCR mix was composed of 12.5 µl Taqman Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), primers at 200–300 nM, probes at 50–150 nM, and water. The rt-PCR was performed on a StepOne™-model Applied Biosystems thermocycler. Five µl of DNA or water (negative control) was added to the premix before the run.

Validation of the rt-PCR (i.e., target, non-target species, and limit of detection [LOD<sub>PCR</sub>]) was done according to French AFNOR standard NF U47-600-2. Briefly, LOD<sub>PCR</sub> was determined using 6 five-fold

serial dilutions of quantified DNA extracts from three strains, that is., *M. equirhinis* (field strain, ANSES-F13945), *M. felis* (field strain, ANSES-F13444), and *M. pulmonis* (NCTC 10139). Eight replicates of each dilution were tested in three independent rt-PCR runs. LOD<sub>PCR</sub> at 95% was set as the highest dilution with at least 23/24 positive replicates (interpretation was done using a cut-off value for cycle threshold, Ct, of 40 per default). To convert the LOD<sub>PCR</sub> from a DNA amount in ng into equivalent genome copy numbers, the following formula was used ( $\text{Amount [ng]} \times 6.022 \times 10^{23}$ ) / ( $\text{Length (bp)} \times 10^9 \times 660$ ), with genome sizes of respectively 841 695 bp for *M. felis*; 730 410 bp for *M. equirhinis* and 963 879 bp for *M. pulmonis* according to the NCBI databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). *Mycoplasma* or non-*Mycoplasma* species and strains used for inclusivity and exclusivity testing are listed in Data S3.

The analytical sensitivity of the whole method (from DNA extraction to rt-PCR analysis) was also determined according to guidelines developed by the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD).<sup>26</sup> Briefly, five-fold serial dilutions of three enumerated mycoplasma suspensions (same strains as for LOD<sub>PCR</sub>) were added to a mycoplasma-negative TW down to a theoretical concentration of 1 CFU/ml each. Then 200 µl of the spiked TW was either analysed directly (after a 4 days' storage at -80°C) and 200 µl were seeded in 1.8 ml of mycoplasma broth and incubated for 4 days (enrichment procedure). DNA of 100 µl of each sample was extracted according to the routine workflow at LABÉO and amplified in three independent runs. The analytical sensitivity was the highest dilution where 3/3 replicates were positive.<sup>26</sup>

Nucleic acids were extracted from 100 µl of routine *Mycoplasma* spp. enrichment broth using the Adiamag Kit<sup>c</sup> and the KingFisher Flex robot (ThermoFisher Scientific). rt-PCR was then performed on an Applied Biosystems thermocycler as described above. An exact Ct cut-off value was defined according to rt-PCR performances (see results section) to discriminate tested samples as positive, doubtful, or negative.

## 2.4 | Identification of rt-PCR-positive extracts and isolated strains

Positive-testing DNA extracts (with Ct < the Ct cut-off value of rt-PCR) were further amplified using 16S rDNA PCR for identification purposes (Data S2). Sanger sequencing of the amplicons using the primer U1/583 (5'-TTGATCCTGGCTCAGG-3)<sup>27</sup> was outsourced (Genewiz, Germany). Identification of *Mycoplasma* to species level was done using the leBIBI<sup>QBPP</sup> online tool (<https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>).<sup>28</sup> These DNA extracts were also analysed in parallel using two previously-described PCR assays targeting *M. equirhinis*<sup>29</sup> and *M. pulmonis*,<sup>23</sup> respectively. These PCR assays were performed in a 20 µl mix containing 5 µl 5X Buffer (with MgCl<sub>2</sub>) (Promega), 1 µl dNTP, 0.4 µl Go Taq polymerase (Promega) and primers at 40 µM. All PCR runs were performed on a T100 thermal cycler (Bio-Rad) in conditions detailed in Data S2. Size of the

amplicons (211 bp and 266 bp, respectively) was verified by capillary electrophoresis using the QIAxcel Advanced system (Qiagen).

In the strain isolation process (Data S1), each colony picked on an agar plate was grown in liquid broth using serial dilution to track pH changes, and 200 µl taken from the tube that showed a colour change (from red to orange for acidifying species or red to darker red for alkalising species, with or without additional turbidity depending on the strains) indicative of mid-exponential growth was used for DNA extraction via a QIAamp DNA mini kit (Qiagen). Elution was performed in 50 µl of sterile water, and 5 µl of the extract was submitted to PCR for species identification as described above for positive DNA extracts.

## 2.5 | Data analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9.1.12 software. In initial univariable analyses, the prevalence of *Mycoplasma* spp. was compared between groups using a chi-squared test. Explanatory variables that had an individual impact on *Mycoplasma* spp. prevalence were further analysed using a multivariable logistic regression model. *P* values ≤0.05 were considered significant.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Validation of our rt-PCR workflow for *Mycoplasma* spp. detection

The LOD<sub>PCR</sub> at 95% CI for the rt-PCR workflow targeting 16S rRNA gene was 4.2 E-6, 6.0 E-6 and 1.3 E-5 ng/µl for *M. felis*, *M. equirhinis* and *M. pulmonis*, respectively (Data S4). This corresponds to approximately 4.5, 7.5 and 12.3 genome copy numbers per µl, respectively. The LOD<sub>PCR</sub> for the *M. felis*-specific rt-PCR was similar to that of 16S rDNA, with a mean Ct slightly below the mean 16S rDNA Ct (36.7 vs. 36.9). Linear regression analysis was performed for each rt-PCR assays (Data S4), resulting in comparable, satisfactory PCR efficiencies (82.1%, 90.5%, 81.5%, 81.2% for *M. felis* (16S rRNA gene and *tuf*), *M. pulmonis*, *M. equirhinis*, respectively) and suitable linearity with  $0.96 < R^2 < 0.98$ . Since the mean Ct values for LOD<sub>PCR</sub> were around 37, we set this value as an exact cut-off to interpret positive-testing samples. Samples were subsequently classified into three categories, that is., positive if Ct < 37, doubtful if  $37 \leq Ct \leq 40$ , and negative if Ct > 40.

Based on these interpretative criteria, all the target materials, that is *Mycoplasma* species listed in Data S3, were found positive by 16S rDNA rt-PCR, but only the *M. felis* strain was also positive for the *M. felis tuf* signal. The non-target materials (viruses and bacteria) were all negative (SD 3), which points to very good specificity.

The analytical sensitivity of the rt-PCR-based method, with the Ct cut-off of 37 as set above, varied from <1 to 10 000 CFU/ml without any enrichment and from <1 to 100 CFU/ml after 4-day in-broth enrichment (Table 1, and details in Data S4), showing a clear effect of

**TABLE 1** Comparative sensitivity of three methods (culture, rt-PCR, and rt-PCR post pre-enrichment) for detecting three *Mycoplasma* species in spiked TW.

	Culture	rt-PCR	rt-PCR post pre-enrichment
<i>M. equirhinis</i>	10	10 000	<1
<i>M. felis</i>	10	10 and <1 <sup>a</sup>	<1 <sup>a</sup>
<i>M. pulmonis</i>	100	1000	100

Note: Lowest concentrations, in CFU/ml, of mycoplasma detected in spiked samples by each of the methods in 3/3 replicates (see details in Data S2). Cultures were considered positive when characteristic ‘fried-egg’ colonies were observed on agar medium. 16S rDNA rt-PCR-positive samples were defined using the Ct < 37 as cut-off.

<sup>a</sup>Results are identical using the *M. felis*-specific rt-PCR assays.

**TABLE 2** Comparative rates of detection of *Mycoplasma* spp. in 616 clinical specimens using either 16S rt-PCR post-enrichment or culture.

		Culture		Total
		Positive	Negative	
rt-PCR	Positive	41	57	98
	Doubtful	1	5	6
	Negative	5	507	512
	Total	47	569	616

Note: Cultures were considered positive when characteristic ‘fried-egg’ colonies were observed on agar medium. The results of 16S rRNA rt-PCR assays were interpreted as positive if Ct < 37, doubtful if 37 ≤ Ct ≤ 40, and negative if Ct > 40.

a mean 4-day enrichment versus none on efficiency of detection. Post-enrichment rt-PCR-based detection also had better sensitivity than culture-based detection (from 10 to 100 CFU/ml), except for *M. pulmonis* where it was equivalent.

### 3.2 | Comparative efficiency of culture versus rt-PCR for mycoplasma detection in clinical samples

Of 616 horses, 98 (15.9%) tested positive by rt-PCR targeting 16S rRNA gene for *Mycoplasma* spp. (Table 2), of which four were also positive for the *M. felis tuf* gene. Among the rt-PCR positive horses only 41 were also positive by culture-based detection. Only 6 samples were positive by culture-based detection but negative or doubtful by rt-PCR (Table 2), illustrating the better sensitivity of the rt-PCR-based method and demonstrating that the methods are complimentary for optimal detection.

### 3.3 | Prevalence of *Mycoplasma* spp.

The overall cumulative (by culture- or rt-PCR-based detection) prevalence of *Mycoplasma* spp. in our population was 16.9% (104/616).

Among the 98 rt-PCR (16S rDNA)-positive DNA extracts, 93 were available for further sequencing analysis for species-level identification. *M. equirhinis* was identified in a majority of samples (79/93, 85%) whereas *M. pulmonis* was identified just once (1%). The rest of the DNA extracts ( $n = 13$ ) were either not identified further than the genus *Mycoplasma* ( $n = 4$ , with an ambiguous positioning between different species) or else not identified at all as Sanger sequencing resulted in superposed chromatograms.

Interestingly, of the six samples tested as doubtful by rt-PCR ( $37 \leq Ct \leq 40$ ), two were identified as *M. equirhinis* and one as *M. pulmonis*. The higher proportion of *M. pulmonis* in the doubtful category is consistent with the lower sensitivity of the method for this species. For the four rt-PCR *tuf*-positive DNA extracts, that is., *M. felis* positive, one was identified as *M. equirhinis*, suggesting a potential mix of different species in the clinical specimen, and the other three were among the non-available DNA extracts ( $n = 2$ ) and were either non-sequenceable or resulted in a non-exploitable sequence ( $n = 1$ ).

Out of the 47 culture-positive samples, 7 did not lead to isolation because of viability loss during subcultivation steps and 40 strains were isolated: 39 were identified as *M. equirhinis* (98%) and one as *M. felis* (2%). Note that this *M. felis* strain was isolated from the rt-PCR *tuf*-positive sample for which extracted DNA was identified as *M. equirhinis*.

### 3.4 | Prevalence of *Mycoplasma* spp. by horse characteristics or sample types

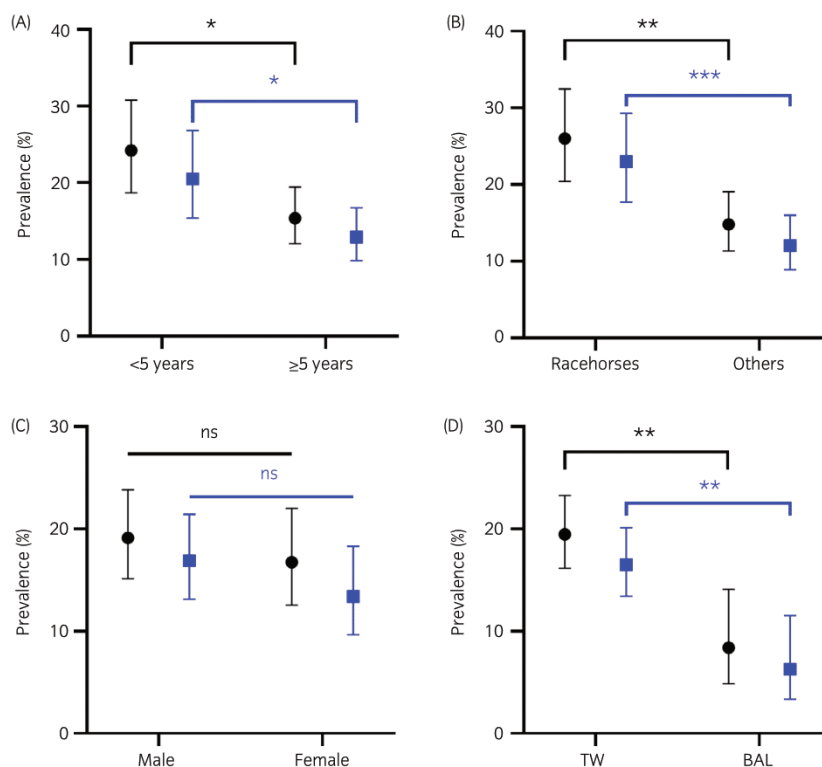
Age data was available for 554 (90%) horses, which were 190 horses (34%) in the ‘under 5 years’ group and 364 (66%) in the ‘5 years and more’ group. For breed, 524 (85%) horses were classified as Thoroughbreds and trotters ( $n = 200$ , 38%) or other breeds ( $n = 324$ , 62%). Sex data was available for 553 (90%) individuals and were 314 males (gelded or not, 57%) and 239 females (43%). Figure 1 charts the prevalence of *Mycoplasma* (positive by at least one method) by horse subgroup or type of sample. On univariable analysis, the prevalence of *Mycoplasma* was significantly higher in young horses ( $p = 0.01$ ). We found a significant association ( $p = 0.002$ ) between breed group and presence of mycoplasmas with prevalence almost two-fold higher among racing breeds (26.0%) than other types (14.8%). There was no significant association between sex and presence of *Mycoplasma* in our horse population. Regarding type of clinical specimens investigated, mycoplasmas were detected in 19.4% of TW versus only 8.4% of BAL ( $p = 0.002$ ). The same associations were also found when we considered only samples in which *M. equirhinis* was identified (Figure 1). For multivariate logistic regression analyses the subpopulation was composed of 515 horses and these analyses confirmed the higher risk of having mycoplasmas and *M. equirhinis* in TW samples and in racing breeds, but an association with age was not confirmed (Table 3).

## 4 | DISCUSSION

To refine our knowledge on the prevalence of mycoplasmas in respiratory specimens from horses, we developed a mixed-method



**FIGURE 1** Prevalence of *Mycoplasma* spp. (●) and *M. equirhinis* (□) in clinical specimens (testing positivity by rt-PCR and/or culture) as a function of (A) age, (B) breed, (C) sex, and (D) sample types. Error bars correspond to 95% confidence intervals. “ns”: not significant, “\*”, “\*\*” and “\*\*\*” refer to *p*-values of  $\leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$  and  $\leq 0.001$ , respectively, after a Chi-square test. TW: Tracheal washes, BAL: Bronchoalveolar lavages.



**TABLE 3** Multivariable analysis of factors associated with the identification of *Mycoplasma* spp. and of *M. equirhinis*.

	<i>Mycoplasma</i> spp.					<i>M. equirhinis</i>				
	Estimate coefficient	SE	OR	95% CI	<i>p</i>	Estimate coefficient	SE	OR	95% CI	<i>p</i>
Age										
<5 years	0.093	0.277	1.098	(0.635–1.885)	0.8	−0.003	0.298	0.996	(0.553–1.782)	0.9
≥5 years			1.000					1.000		
Breed										
Racehorses	0.559	0.273	1.750	(1.023–2.990)	0.04	0.628	0.293	1.874	(1.053–3.335)	0.03
Others			1.000					1.000		
Sample type										
TW	0.964	0.341	2.623	(1.397–5.385)	0.005	1.097	0.390	2.996	(1.473–6.941)	0.005
BAL			1.000					1.000		

Abbreviations: SE, standard error; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval; P, *p*-value.

diagnostic screening approach based on both culture and duplex rt-PCR after pre-enrichment. The rt-PCR assay, targeting a specific region of *Mycoplasma* spp. 16S rRNA gene, has been described previously<sup>25</sup> and is an adaptation of an older end-point protocol.<sup>23</sup> Here we ran a detailed analysis of its specificity, sensitivity, and Ct cut-off for interpretation on three target *Mycoplasma* species already described in horses, that is., *M. equirhinis*, *M. pulmonis*, and *M. felis*.<sup>14,16–18</sup> This genus-specific rt-PCR assay was run in duplex with an *M. felis*-specific rt-PCR assay targeting the *tuf* gene adapted from previous work.<sup>24</sup> By extending the probe by four bases in the 3'

extremity, we were able to modify the acceptable cut-off for positivity to 37 in our experimental setup versus 35 in Söderlund et al.<sup>24</sup> Pre-enrichment for 4 days in a *Mycoplasma* growth culture medium of spiked TW before DNA extraction and rt-PCR was shown to improve the sensitivity of the method by a factor of four for *M. equirhinis*, although the effect was more limited for *M. felis* and *M. pulmonis* (due to different growth capacity in our broth medium, data not shown). Note, that this pre-enrichment step hinders the quantitative dimension of the rt-PCR and prevents an estimation of the initial mycoplasma load in the clinical samples. In the routine workflow at LABÉO,

the enrichment time before DNA extraction is not controlled and can vary from 3 to 7 days due to weekend breaks. We showed in our validation procedure that a mean of 4 days of enrichment makes it possible to detect even minute amounts of mycoplasmas, but its benefit is not equivalent for all species. Indeed, overall analytical sensitivity of the method remains lower for *M. pulmonis*. Culture-based detection was shown to be sensitive, although a little bit less than rt-PCR post-enrichment. Given the low positivity rate for *M. felis*, the association of *Mycoplasma* spp. PCR with *M. felis* PCR should be removed as a first-line testing strategy in this epidemiological context. A duplex PCR including *M. equirhinis* detection would be a relevant alternative.

The performance of the method was further evaluated on a set of 616 clinical samples, either TW or BAL, collected on horses with respiratory disorders in France in 2020. Of these 616 samples, 104 tested positive by rt-PCR ( $n = 98$ ) and/or culture ( $n = 47$ ), of which only 41 tested positive by both rt-PCR and culture, thus illustrating the methods were complementary. However, only six samples were detected as positive by culture but not rt-PCR, of which five were *M. equirhinis*, due to its lower sensitivity, as already stated.<sup>17,30</sup> Non-viable mycoplasmas in the clinical samples can partly explain this difference in detection between culture-based versus rtPCR based assays. Culture-based detection proved time-consuming but provided access to isolated strains, which could be useful for further characterisation.

We then managed to identify 86% of the rt-PCR-positive samples and 100% of the isolated strains down to species level. Consistent with two previous studies,<sup>17,18</sup> the commonest species detected was *M. equirhinis*, representing 98% of the isolated strains and 85% of the rt-PCR-positive DNA. The proportion of the two non-horse-specific species was very low, with only 4 positive DNAs and one isolated strain for *M. felis* and one positive DNA for *M. pulmonis*. This low proportion of *M. felis* might accurately reflect the prevalence in clinical samples, but we cannot rule out a bias due to the weaker sensitivity of our method for *M. pulmonis*. Another hypothesis is that *M. pulmonis* very rarely colonises the lower respiratory tract, as it has not been recovered in recent studies.<sup>16–18,22</sup> As *M. pulmonis* is essentially a rodent pathogen, it may get transmitted to horses through sharing the same habitat and thus be isolated from horse nasal cavities, but not deeper in the respiratory tract.

Thirteen rt-PCR-positives samples were not identified by sequencing. These failures might be due to i) non-specific amplification, a well-known phenomenon with the 16 S rRNA gene targets, or ii) the presence of different mycoplasma species in the DNA extract. This second hypothesis is supported by both the situation in other animal hosts where species mixtures are frequent<sup>31</sup> and by the fact that in one sample we evidenced both *M. felis* and *M. equirhinis*.

Our results showed a significantly higher prevalence of *Mycoplasma* spp. or *M. equirhinis* in Thoroughbreds and trotters than in other breeds, and in horses under 5 years of age than in older horses but the latter association was not confirmed in multivariate analysis. The majority (71.6%) of the young horses (<5 years) were Thoroughbreds and trotters and breed was retained in the multivariable model. Several hypotheses can be put forward to explain this higher

prevalence in Thoroughbreds and trotters, most of which are likely to be racehorses: 1) racehorses attract close scrutiny for health issues, 2) racehorses frequently contact with horses from other locations during race meets, 3) repeated strenuous exercise and frequent transport might impact the immune system and increase susceptibility, and 4) heavy breathing during strenuous exercise might enhance mycoplasma colonisation of the lower respiratory tract.

Interestingly, the prevalence of *Mycoplasma* spp. and *M. equirhinis* was higher in TW than in BAL samples. TW is recommended by some clinicians when infectious disease is suspected as it gives a more complete picture of the whole lung since secretions accumulate in the trachea. Conversely, BAL is often preferred for diagnosis of non-infectious lower airway inflammation.<sup>32</sup> However, the choice of the most suitable sample type remains a matter of clinician preference and, to further understand the impact of sample technique on *Mycoplasma* spp. detection would require parallel tests on the two types of samples, as has been done for other purposes.<sup>32</sup>

Now that we have optimised the methods for detection, future studies should aim to decipher the actual clinical role of mycoplasmas and more specifically the prevalent *M. equirhinis* species in equine respiratory infections. This could be done through systematic detection of mycoplasmas in horses with no clinical signs versus horses with respiratory disorders. It would also be helpful to gain further insight into the genomic diversity of *M. equirhinis* strains currently in circulation, as there is still too little genomic data available.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Matthieu Martineau contributed to study design, laboratory analyses, data analysis and interpretation, and preparation of the manuscript. Sophie Castagnet contributed to study design and laboratory analyses. Elena Kokabi and Agnès Tricot contributed to laboratory analyses. Maryne Jaÿ contributed to laboratory analyses, data analysis, and preparation of the manuscript. Albertine Léon and Florence Tardy contributed to study design, data interpretation, and preparation of the manuscript. All authors approved the final manuscript.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Adélie Colin at the Anses laboratory for assisting with strain management.

#### FUNDING INFORMATION

This work received financial support from IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation, grant number CS-2020-2023-022-MYCO-PAB), the Fonds Eperon (grant number N15-2020), and the GIS (Groupement d'Intérêt Scientifique) CENTAURE (grant number GIS20-SEP-01).

#### CONFLICT OF INTEREST

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper. No competing interests have been declared.

**PEER REVIEW**

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/evj.13918>.

**DATA AVAILABILITY STATEMENT**

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**ETHICAL ANIMAL RESEARCH**

Research ethics committee oversight not required: retrospective analysis of clinical specimens.

**ORCID**

Matthieu Martineau  <https://orcid.org/0000-0002-9143-9072>

Maryne Jaÿ  <https://orcid.org/0000-0003-0443-5565>

Albertine Léon  <https://orcid.org/0000-0003-3151-4947>

Florence Tardy  <https://orcid.org/0000-0003-3968-4801>

**REFERENCES**

- Razin S, Yogeve D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1094–156.
- Tully JG, Razin S. *Methods in Mycoplasmaology*. United Kingdom edition. Massachusetts: Academic Press Inc.; 1983.
- Brown DR, May M, Bradbury JM, Balish MF. In: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, et al., editors. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. 1st ed. New York: Wiley; 2018. <https://doi.org/10.1002/9781118960608>
- Waites KB, Xiao L, Liu Y, Balish MF, Atkinson TP. *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(3):63–809.
- Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, et al. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J Vet Intern Med*. 2011;25(4):772–83. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0750.x>
- Levisohn S, Kleven SH. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Rev Sci Tech Int Off Epizoot*. 2000;19:425–42.
- Jeffcott LB, Rosedale PD, Freestone J, Frank CJ, Towers-Clark PF. An assessment of wastage in thoroughbred racing from conception to 4 years of age. *Equine Vet J*. 1982;14(3):185–98. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1982.tb02389.x>
- Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie J-P, Léguillette R, Richard EA. Inflammatory airway disease of horses—revised consensus statement. *J Vet Intern Med*. 2016;30(2):503–15. <https://doi.org/10.1111/jvim.13824>
- Wilsher S, Allen WR, Wood JLN. Factors associated with failure of thoroughbred horses to train and race. *Equine Vet J*. 2006;38(2):113–8. <https://doi.org/10.2746/042516406776563305>
- Couetil L, Cardwell JM, Leguillette R, Mazan M, Richard E, Bienzle D, et al. Equine asthma: current understanding and future directions. *Front Vet Sci*. 2020;7:450. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00450>
- Wood JLN, Burrell MH, Roberts CA, Chanter N, Shaw Y. Streptococci and *Pasteurella* spp. associated with disease of the equine lower respiratory tract. *Equine Vet J*. 1993;25(4):314–8. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb02970.x>
- Estell KE, Young A, Kozikowski T, Swain EA, Byrne BA, Reilly CM, et al. Pneumonia caused by *Klebsiella* spp. in 46 horses. *J Vet Intern Med*. 2016;30(1):314–21. <https://doi.org/10.1111/jvim.13653>
- Gilkerson JR, Bailey KE, Diaz-Méndez A, Hartley CA. Update on viral diseases of the equine respiratory tract. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2015;31(1):91–104. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.007>
- Allam NM, Lemcke RM. Mycoplasmas isolated from the respiratory tract of horses. *J Hyg (Lond)*. 1975;74(3):29–408. <https://doi.org/10.1017/s0022172400046908>
- Lemcke RM, Poland J. *Mycoplasma fastidiosum*: a new species from horses. *Int J Syst Bacteriol*. 1980;30(1):151–62. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-151>
- Wood JLN, Newton JR, Chanter N, Mumford JA. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):120–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.120-126.2005>
- Mete A, Özgür NY. Investigation of the presence of *Mycoplasma* as an etiologic agent of inflammatory airway diseases in thoroughbred racehorses in Istanbul Province. *Turk J Vet Anim Sci*. 2017;41:365–71. <https://doi.org/10.3906/vet-1606-90>
- Uchida-Fujii E, Kinoshita Y, Niwa H, Maeda T, Nukada T, Ueno T. High prevalence of *Mycoplasma equirhinis* in thoroughbred horses with respiratory symptoms in autumn 2018. *J Vet Med Sci*. 2021; 83(12):1907–12. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0163>
- Hoffman A, Baird JD, Kloetze HJ, Rosendal S, Bell M. *Mycoplasma felis* pleuritis in two show-jumper horses. *Cornell Vet*. 1992;82(2):155–62.
- Morley PS, Chirino-Trejo M, Petrie L, Krupka L, Schwab M. Pericarditis and pleuritis caused by *mycoplasma felis* in a horse. *Equine Vet J*. 1996;28(3):237–40. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1996.tb03779.x>
- Tully JG, Whitcomb RF. *Human and Animal Mycoplasmas*. Vol 8. Massachusetts: United Kingdom Edition. Academic Press Inc.; 1979. Accessed July 13, 2022. <http://journals.lww.com/00007435-198101000-00004>
- Christley RM, Hodgson DR, Rose RJ, Wood JL, Reids SW, Whitear KG, et al. A case-control study of respiratory disease in thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet J*. 2003;33(3): 256–64. <https://doi.org/10.2746/042516401776249796>
- Van Kuppelveld FJM, Van der Logt JT, Angulo AF. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16 S rRNA amplification. *Appl Env Microbiol*. 1992;58(8):2608–15. <https://doi.org/10.1128/aem.58.8.2606-2615>
- Söderlund R, Bölske G, Holst BS, Aspán A. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction method for the detection of *Mycoplasma felis*. *J Vet Diagn Invest*. 2011;23(5):890–3. <https://doi.org/10.1177/1040638711407479>
- Denys M, Léon A, Robert C, Saulnier N, Josson-Schramme A, Legrand L, et al. Biosafety evaluation of equine umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells by systematic pathogen screening in peripheral maternal blood and paired UC-MSCs. *Biopreserv Biobank*. 2020;18(2):73–81. <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0071>
- Toohy-Kurth K, Reising MM, Tallmadge RL, Goodman LB, Bai J, Bolin SR, et al. Suggested guidelines for validation of real-time PCR assays in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*. 2020; 32(6):802–14. <https://doi.org/10.1177/1040638720960829>
- Johansson KE, Heldtander MUK, Pettersson B. Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16 S rDNA primers. *Methods Mol Biol*. 1998;104:145–65. <https://doi.org/10.1385/0-89603-525-5:145>
- Flandrois JP, Perrière G, Gouy M. leBIBIQBPP: a set of databases and a webtool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. *BMC Bioinformatics*. 2015;16(1):251. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0692-z>
- Robinson. HBLB funded project. *HBLB Vet News!* Published online 2006.
- Pusterla N, Leutenegger CM, Barnum SM, Byrne BA. Use of quantitative real-time PCR to determine viability of *Streptococcus equi*

- subspecies *equi* in respiratory secretions from horses with strangles. *Equine Vet J.* 2018;50(5):697–700. <https://doi.org/10.1111/evj.12809>
31. Jaÿ M, Poumarat F, Colin A, Tricot A, Tardy F. Addressing the antimicrobial resistance of ruminant mycoplasmas using a clinical surveillance network. *Front Vet Sci.* 2021;8:667175. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.667175>
  32. Rossi H, Virtala AM, Raekallio M, Rahkonen E, Rajamäki MM, Mykkänen A. Comparison of tracheal wash and bronchoalveolar lavage cytology in 154 horses with and without respiratory signs in a referral hospital over 2009–2015. *Front Vet Sci.* 2018;5:61. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00061>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

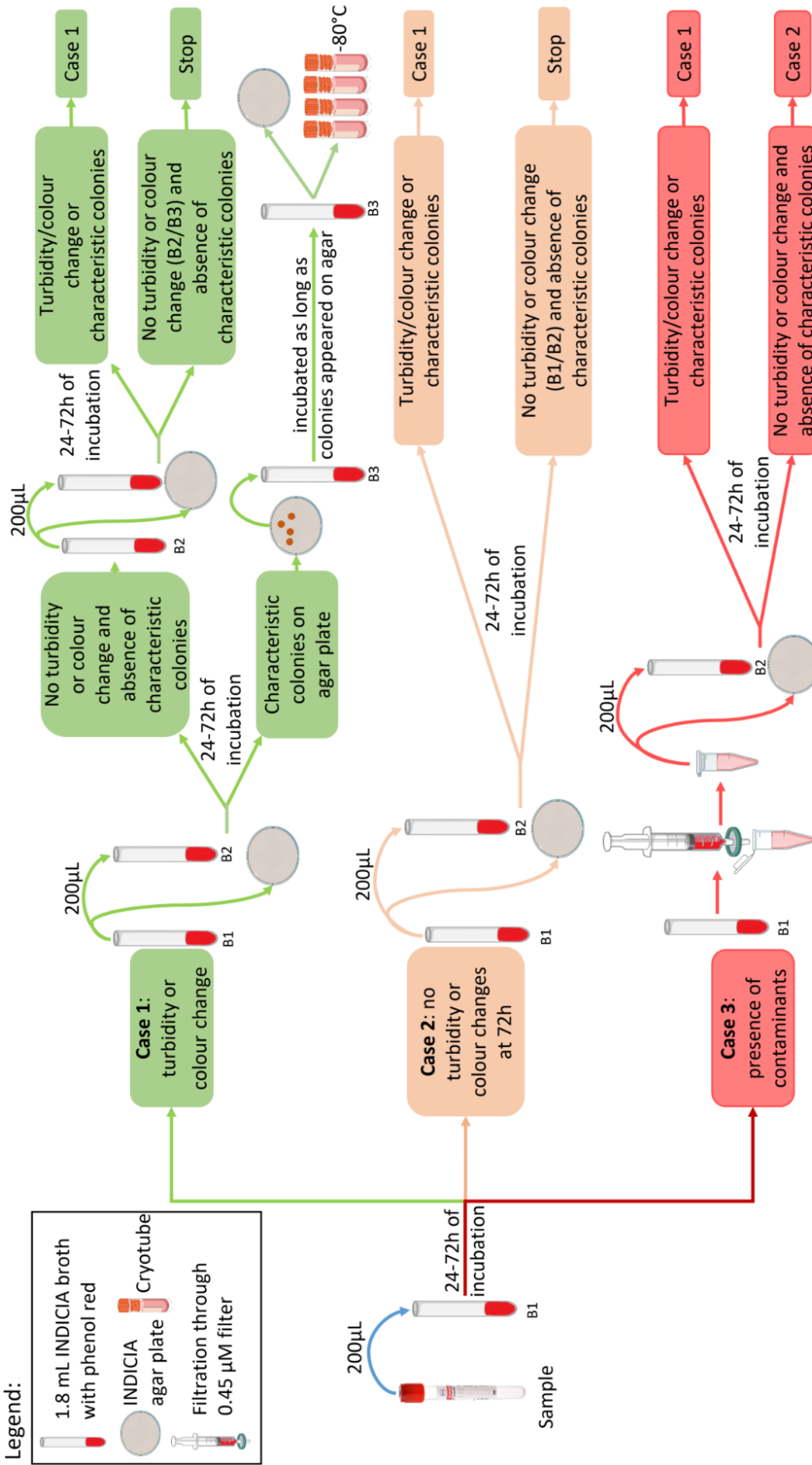
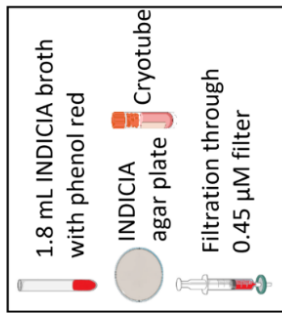
**How to cite this article:** Martineau M, Castagnet S, Kokabi E, Tricot A, Jaÿ M, Léon A, et al. Detection of *Mycoplasma* spp. in horses with respiratory disorders. *Equine Vet J.* 2023;55(5): 747–54. <https://doi.org/10.1111/evj.13918>



**Data S1:** Detailed culture protocol used to detect and isolate *Mycoplasma* spp. strains from clinical samples

Agar plates were seeded with one 10-to-20  $\mu\text{L}$  drop that was allowed to migrate on the agar surface by tilting the plates, and then incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The cultures were considered positive when characteristic 'fried-egg' colonies were observed on the agar plates. In case 1, one isolated colony per plate was picked to be subcultured.

**Legend:**







**Data S2: PCR workflows: experimental details.**

Assay conditions: I. PCR volume: 25 µL & Taqman Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific); II. PCR volume: 50 µL & Go Taq (Promega); III. PCR volume: 25 µL & Go Taq (Promega)

FAM: Fluorescein amidite, BHOQ-1: Black Hole Quencher 1

PCR type	Target	Type	Primers and probe			PCR cycle			Reference
			Sequence 5'-3'	Denaturation	Amplification cycles	Elongation	Conditions	PCR product size (bp)	
rt-PCR duplex	<i>Mycoplasma</i> spp. (16S rRNA)	Forward	GGGAGCAAAACAGGATTAGATACCT	95°C for 10"	40 cycles	/	/	25	
		Reverse	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC						
		Probe	YY-CCGCACAAGCGTGGAGCATG-BHO1						
	<i>M. felis</i> ( <i>tuf</i> )	Forward	TAAATTAGCTCTTGATGGTGTCTCT	95° for 15", 60° for 1'	/	/	/	adapted from 24	
		Reverse	TTCAAAGTCTTTTTCTGGAGTTTCA						
		Probe	FAM-TGAGAAGAAAAAGTTATGGAATTAATGGATGCAGTTG-BHO1						
end-point PCR	<i>Mycoplasma</i> spp. (16S rRNA)	Forward (U1)	GTTTGATCCTGGCTCAGGAYDAACG	94°C for 4'	35 cycles	72°C for 10'	1505	27	
		Reverse (U8)	GAAAGGAGGTRWTCAYCCSCAC						
end-point PCR	<i>M. equirhinis</i>	Forward	CACCGCCCGTCACACCA	94°C for 1'	35 cycles	72°C for 5'	211	29	
		Reverse	GATCTCTCAAAACTGAATACG						
end-point PCR	<i>M. pulmonis</i>	Forward	AGCGTTTGCTCAGTTTGAA	94°C for 1'	40 cycles	72°C for 5'	266	23	
		Reverse	GGGCATTTCTCCCTAAAGCT						



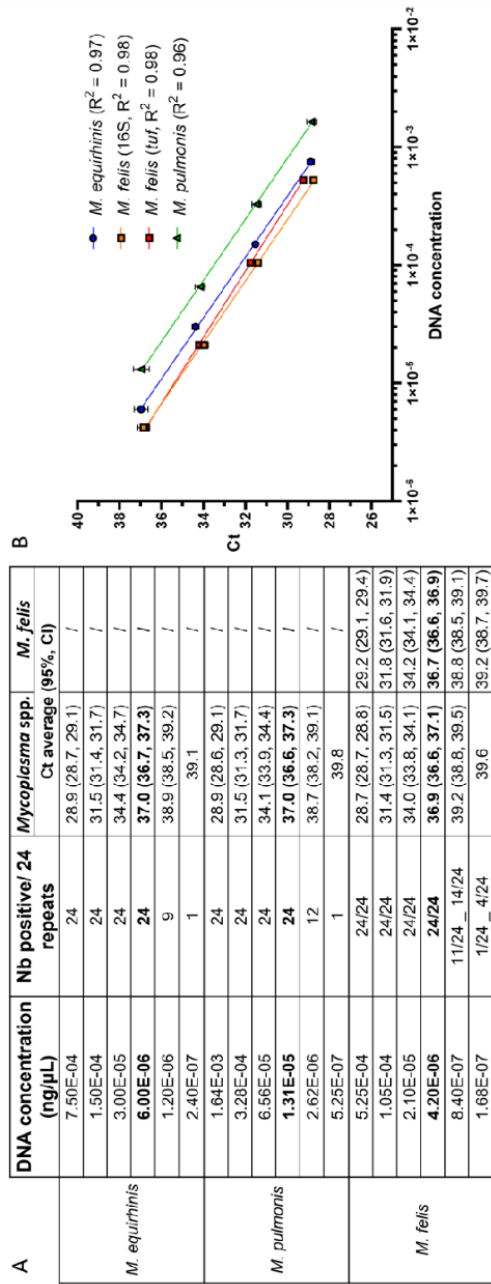
**Data S3:** Specificity of the real-time duplex PCR *Mycoplasma* spp./*M. felis* workflow as estimated by detection of target and non-target materials.

The results of the rt-PCR assays were interpreted as positive (“+”) if Ct < 37, and negative if Ct ≥ 37 (“-”).

ATCC: American Type Culture Collection, CIP: Collection de l’Institut Pasteur, ECL: Escherichia Coli Laboratory,

NCTC: National Collection of Type Cultures

	Species	Strains	rt-PCR results	
			16S rRNA <i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. felis</i> ( <i>tuf</i> )
Non-target materials	EHV1	Field strain	-	-
	EHV2	Field strain	-	-
	EHV4	ATCC 405/76	-	-
	Equine Influenza Virus	Field strain	-	-
	Equine Arteritis Virus	Field strain	-	-
	Rhinovirus type B	Field strain	-	-
	<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 33701	-	-
	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	CIP 103228	-	-
	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	CIP 102910	-	-
	<i>Coxiella burnetti</i>	Field strain	-	-
	<i>Chlamydomphila abortus</i>	Field strain	-	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CIP 82.91	-	-
	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	CIP 66.16	-	-
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CIP 106622	-	-
	<i>Actinobacillus equuli</i>	CIP 103284	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	ECL 13421	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 76.110	-	-
	<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 103214	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> HB AB	ATCC 9144	-	-	
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	CIP 103235	-	-	
Target materials	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 15531	+	-
	<i>Mycoplasma synoviae</i>	ATCC 25204	+	-
	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	CIP 59.7	+	-
	<i>Mycoplasma arginini</i>	CIP 71.23	+	-
	<i>Mycoplasma arthritis</i>	CIP 104678	+	-
	<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	CIP 71.24	+	-
	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	CIP 104967	+	-
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	CIP 103767	+	-
	<i>Mycoplasma meleagridis</i>	CIP 103833	+	-
	<i>Mycoplasma mycoides</i>	CIP 71.28	+	-
	<i>Mycoplasma primatum</i>	CIP 105531	+	-
	<i>Mycoplasma equirhinis</i>	NCTC 10148	+	-
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	NCTC 10139	+	-
<i>Mycoplasma felis</i>	NCTC 10160	+	+	



**C**

CFU/mL	Culture Nb positive/ 3 repeats	Without pre-enrichment		With pre-enrichment	
		Nb positive/ 3 repeats	<i>Mycoplasma</i> spp Ct average (95% CI)	Nb positive/ 3 repeats	<i>Mycoplasma</i> spp Ct average (95% CI)
<i>M. equirhinis</i>	1.00E+07	3	24.6 (24.1, 25.1)	/	/
	1.00E+06	3	27.1 (26.9, 27.3)	/	/
	1.00E+05	3	30.6 (30.3, 30.9)	/	/
	<b>1.00E+04</b>	<b>3</b>	<b>33.6 (30.9, 36.3)</b>	/	/
	1.00E+03	3	38.8 (38.3, 39.4)	/	/
	1.00E+02	3	>40	/	/
	1.00E+01	3	>40	/	/
	<b>1.00E+00</b>	<b>0</b>	>40	<b>3</b>	<b>18.2 (17.9, 18.6)</b>
	1.00E+04	3	30.4 (29.3, 31.5)	3	19.4 (19.2, 19.7)
	1.00E+03	3	35.1 (33, 37.3)	3	18.5 (18, 18.9)
<i>M. pulmonis</i>	<b>1.00E+02</b>	<b>3</b>	<b>35.0 (37.1, 38.8)</b>	<b>3</b>	<b>20.2 (19.7, 20.7)</b>
	1.00E+01	2	>40	1	23.33
	1.00E+00	0	>40	0	>40
	1.00E+04	3	24 (17.4, 30.5)	3*	15.2 (14.4, 16.1)
<i>M. felis</i>	1.00E+03	3	24.4 (24, 24.8)	3*	15.3 (14.5, 16.2)
	1.00E+02	3	27.8 (27.5, 28)	3*	14.9 (14.3, 15.6)
	<b>1.00E+01</b>	<b>3</b>	<b>31.9 (31.7, 32.2)</b>	<b>3*</b>	<b>15 (14.4, 15.6)</b>
	<b>1.00E+00</b>	<b>1</b>	<b>37.4 (35.8, 38.9)</b>	<b>3*</b>	<b>15.5 (14.8, 16.2)</b>

\*for *Mycoplasma* spp. and *M. felis*

**Data S4:** Detailed results for the validation of (A) LOD<sub>PCR</sub>, (B) linearity and amplification efficiency, and (C) analytical sensitivity of the method. Ct: Cycle threshold

**– CHAPITRE 2 –**

---

**ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE ET  
CARACTÉRISATION DU POUVOIR  
PATHOGÈNE DE *M. EQUIRHINIS* DANS  
LES AFFECTIONS RESPIRATOIRES  
ÉQUINES**

## CHAPITRE 2 : ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE ET CARACTÉRISATION DU POUVOIR PATHOGÈNE DE *M. EQUIRHINIS* DANS LES AFFECTIONS RESPIRATOIRES ÉQUINES

---

L'étude précédente a montré que *M. equirhinis* était l'espèce majoritaire du genre *Mycoplasma* détecté dans les prélèvements respiratoires équins en France, avec une prévalence de 14,1 %. Des prévalences équivalentes ont été démontrées au Royaume-Uni (12,3 %), en Turquie (16,2 %) et au Japon (13,6 %) malgré des méthodologies d'étude relativement différentes [Wood *et al.*, 2005 ; Mete and Özgür, 2017 ; Uchida-Fujii *et al.*, 2021]. On peut donc considérer que la présence de *M. equirhinis* dans les prélèvements cliniques n'est ni négligeable ni anodine. Pour autant, le rôle clinique de cette espèce n'est pas démontré à ce jour. La seconde étude, présentée ci-après, vise à préciser ce rôle à travers trois approches différentes : (i) préciser la prévalence en fonction d'un score clinique, (ii) explorer les variables associées à une augmentation de la prévalence et (iii) étudier les possibles co-détectations de *M. equirhinis* et d'autres agents potentiellement pathogènes.

La prévalence de l'espèce *M. equirhinis* a été déterminée cette fois-ci à partir de 1948 prélèvements respiratoires (LT et LBA), reçus pour analyse à LABÉO entre janvier 2020 et décembre 2022, à l'aide des méthodes validées et publiées dans le premier article du projet MYCOPAB [Martineau *et al.*, 2023]. Un score clinique cumulatif, constitué des principaux signes cliniques décrits lors d'infections respiratoires équines, a été conçu afin de discriminer les chevaux en fonction des observations des vétérinaires. Les données relatives à la détection de micro-organismes autres que *Mycoplasma spp.*, et aux examens cytologiques, ont été collectées à partir de la base de données de LABÉO.

Une prévalence de 13,7 % pour l'espèce *M. equirhinis* a été déterminée sur cette population d'étude élargie, très similaire à nos résultats précédents. Une différence significative de prévalence a été observée entre LT et LBA. Cette différence ayant été confirmée sur un sous-groupe de chevaux (n = 123) où les deux types de lavage ont été prélevés le même jour, les analyses ultérieures ont été effectuées en séparant les deux types de prélèvement.

La détermination de la prévalence en fonction du score clinique des individus suggère que *M. equirhinis* est un commensal ou un opportuniste du tractus respiratoire équin. L'espèce *M. equirhinis* n'a pas été détectée dans des LBA ayant un taux de neutrophiles inférieure à 5 % ; sa détection pourrait être liée à la présence d'inflammation dans les voies respiratoires profondes. Les analyses multivariées ont confirmé les résultats de notre première étude en indiquant une prévalence

accrue de *M. equirhinis*, i) chez les chevaux de course, dans les LT comme les LBA et ii) chez les chevaux vivant majoritairement en box, dans les LT uniquement.

De façon très intéressante, la prévalence de *M. equirhinis* a été montrée comme significativement plus élevée en cas de co-détection avec certaines autres bactéries (e.g. *S. zooepidemicus*), et virus (e.g. EHV-5). Ainsi, les échantillons cliniques positifs à *M. equirhinis* avaient une charge de *S. zooepidemicus* supérieure par rapport aux échantillons négatifs.

*M. equirhinis* semble être un pathogène opportuniste des voies respiratoires profondes, associé à une inflammation liée aux neutrophiles, et donc potentiellement à l'asthme équin. Cette hypothèse est appuyée par sa prévalence accrue chez les chevaux vivant majoritairement à l'intérieur, condition connue pour favoriser l'asthme. Cette affection respiratoire pourrait être le résultat de l'action conjointe de *M. equirhinis* et d'autres agents microbiens. Cette association entre agents microbiens, dans un contexte clinique, laisse à penser que *M. equirhinis* pourrait être un contributeur du complexe respiratoire équin (CRE), comme sont très souvent les mycoplasmes chez d'autres espèces animales [Mach *et al.*, 2021].

Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue « Veterinary Microbiology ».





# veterinary microbiology

An International Journal

**Publication**







## Epidemiology and pathogenicity of *M. equirhinis* in equine respiratory disorders

Matthieu Martineau<sup>a,b,c</sup>, Elena Kokabi<sup>a,b</sup>, Anis Taiebi<sup>a,b</sup>, Stéphanie Lefebvre<sup>c</sup>, Sophie Pradier<sup>d</sup>, Maryne Jaÿ<sup>c</sup>, Florence Tardy<sup>c,1,2,\*</sup>, Albertine Leon<sup>a,b,1,3,\*\*</sup>

<sup>a</sup> LABÉO, Research Department, Saint-Contest, 14000 Caen, France

<sup>b</sup> Univ of Caen Normandie, Univ Rouen Normandie, INSERM, DYNAMICURE UMR 1311, F-14000 Caen, France

<sup>c</sup> University of Lyon, Anses, VetAgro Sup, UMR Animal mycoplasmosis, 69007 Lyon, France

<sup>d</sup> Jolimont Veterinary Clinic, 31000 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Mycoplasma  
Horses  
Clinical scoring  
Respiratory tract

### ABSTRACT

Mycoplasmas are pathogens involved in respiratory disorders of various animal hosts. In horses, *Mycoplasma* (*M.*) *equirhinis* is the species most frequently detected in clinical respiratory specimens, with a prevalence of 12–16%, but its clinical implication in equine respiratory disorders remains unclear. Here we screened 1948 clinical specimens for the presence of *M. equirhinis*. The samples were both tracheal washes (TW) and bronchoalveolar lavages (BAL) collected by veterinarians in France in day-to-day work between 2020 and 2022. The samples were associated with a standardized form that served to collect key general and clinical information, such as horse age, breed, and living environment. *M. equirhinis* was detected using a combination of culture and post-enrichment PCR. Other diagnostic data included virology and bacteriology as well as neutrophil counts, when available. Prevalence of *M. equirhinis* was examined as a function of a clinical score based on four significant clinical signs (nasal discharge, cough, dyspnoea, and hyperthermia). Multivariate logistic regression analysis was run to identify risk factors for the presence of *M. equirhinis*, and comparative prevalence analysis was used to test for association with other bacteria and viruses. TW and BAL were analysed independently, as we found that TW samples were associated with a higher prevalence of *M. equirhinis*. As prevalence remained steady whatever the clinical score, *M. equirhinis* cannot be considered a primary pathogen. *M. equirhinis* was more frequently isolated in thoroughbreds and trotters and in horses living exclusively stabled compared to other horses or other living environments. *M. equirhinis* was never detected in BAL specimens with a 'normal' neutrophil count, i.e. 5%, suggesting it could be associated with an inflammatory response, similar to that observed in equine asthma. Prevalence of *M. equirhinis* was shown to increase in the presence of other bacteria such as *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zoo*) or viruses, and *S. zoo* load was higher in *M. equirhinis*-positive samples, suggesting a potential increase of clinical signs in the event of co-infection.

### 1. Introduction

The *Mycoplasma* genus encompasses more than 120 species that are found across various hosts. Some of these species are associated with major infections in humans as well as in livestock and domestic animals

(Brown et al., 2018). Mycoplasmas are significant agents in major respiratory infections such as children's pneumonia due to *M. pneumoniae* or contagious bovine pleuropneumonia caused by *M. mycoides* subsp. *mycoides* (Kudirkiene et al., 2021; Lesnoff et al., 2004). The first report of *Mycoplasma* spp. in the respiratory tract of horses dates back to 1975

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; M., *Mycoplasma*; TW, tracheal wash.

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author at: LABÉO, Research Department, Saint-Contest, 14000 Caen, France.

E-mail addresses: [Florence.tardy@anses.fr](mailto:Florence.tardy@anses.fr) (F. Tardy), [albertine.leon@laboratoire-labeo.fr](mailto:albertine.leon@laboratoire-labeo.fr) (A. Leon).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Present address of Florence TARDY: Anses, Laboratoire de Ploufragan – Mycoplasma, Bacteriology and Antibioresistance Unit, BP53, 31 rue des Fusillés, 22440 Ploufragan, France

<sup>3</sup> Permanent address of Albertine LEON: LABÉO, 1 route de Rosel, Saint-Contest, 14053 Caen CEDEX 04, France

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109926>

Received 26 July 2023; Received in revised form 16 October 2023; Accepted 20 November 2023

Available online 22 November 2023

0378-1135/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(Allam and Lemcke, 1975), but as mycoplasmas were isolated in both healthy and diseased animals, they did not attract further attention as a focus of diagnosis or research. Several old studies suggested that *M. felis* might be more systematically linked to pleuritis in horses (Ogilvie et al., 1983; Hoffman et al., 1992; Morley et al., 1996) but its prevalence in clinical samples was shown to be very low (0.6%, Martineau et al., 2023). In contrast, recently that *M. equirhinis* has been described as the most frequent *Mycoplasma* species identified in the equine respiratory tract, with a prevalence of 12.3% in the UK, 16.2% in Turkey, and 13.6% in Japan (Mete and Özgür, 2017; Uchida-Fujii et al., 2021; Wood et al., 2005). We recently validated an optimized methodology for the detection of mycoplasmas in equine clinical specimens based on both culture and post-enrichment PCR, and we thus established a prevalence of *M. equirhinis* of 14.1% in France (Martineau et al., 2023). The fact that these non-negligible prevalence values were similar across these four studies, despite different methodologies and different study populations (both in terms of size and quality) shows the need to better understand the role of *M. equirhinis* in equine respiratory disorders.

According to the revisited Henle-Koch postulates (Evans, 1976), the causal role of *M. equirhinis* in equine respiratory disorders is ambiguous, as the bacterium was isolated from both healthy and diseased animals (Allam and Lemcke, 1975) and it failed to reproduce the disease in Welsh ponies experimentally infected by nasal route (Hooker and Butler, 1977). Even if the experimental assay in ponies in the 1970s suffered from several drawbacks such as inoculation route and size of the lots, it would not be ethically acceptable today to re-run another challenge study. Over the years, there have been several studies comparing *M. equirhinis* prevalence in diseased versus healthy animals, but most of them were limited in size, with a maximum of 148 individuals tested (Mete and Özgür, 2017; Uchida-Fujii et al., 2021; Wood et al., 2005).

The present study was set up in an effort to better specify the causal role of *M. equirhinis* in equine respiratory disorders using three different approaches. First, we defined a clinical score taking into account several clinical signs routinely registered by veterinarians. A similar approach has already been developed to investigate the role of mycoplasmas in canine infectious respiratory disease (Maboni et al., 2019). Second, building on our previous study that suggested that the prevalence of *M. equirhinis* could vary with type of respiratory specimen and with breed of horse sampled (Martineau et al., 2023), we further explored several variables in an effort to discriminate methodological bias from risk factors for *M. equirhinis* detection. Third, we investigated whether *M. equirhinis* was associated with other microbes, as some equine respiratory diseases are known to stem from co-infections involving multiple agents, bacteria and/or viruses (Reuss and Giguère, 2015).

## 2. Material and methods

### 2.1. Study population and samples

A total of 1948 respiratory samples gathered from 1764 horses were included in the study. The samples were collected between the beginning of January 2020 and the end of December 2022. Most of the samples were collected via the routine diagnostic workflow at LABÉO (n = 1844), with the remainder (n = 104) collected from mares bred at the Jumenterie du Pin (Gouffern-en-Auge, France) that were sampled to increase the number of non- to mildly affected horses included in the study. The samples consisted of tracheal washes/aspirations (TW, n = 1409, 72%) and bronchoalveolar lavages (BAL, n = 539, 28%). Since the rationale for taking samples in the field as well as the nature of these samples (BAL versus TW) depend on the subjective evaluation of the veterinarians we did not sort a priori the samples included in the study in terms of suspicion of infection, inflammation or loss of performance. Samples collected on the same horse within a six-month period were considered as duplicates and only the first sample was taken into account, with one exception, i.e. TW and BAL sampled on a same horse on the same day (n = 123 horses) were both included in the analysis for

purposes of comparison.

### 2.2. Data collection

Data on horse age, breed, sex, use, living environment and region, and clinical signs, and data on sample type (TW vs BAL), time of sampling and shipping temperature were recovered from preformatted record sheets filled in by veterinarians. By default, the sheet recorded four age classes (<6 months,]6–18 months,]18 months– 5 years [, ≥5 years), three sex classes (male, gelding, or female), three living-environment classes (stable, outdoor, or mixed), and two sample shipping-temperature classes (ambient or refrigerated). The clinical signs recorded were spontaneous cough, coughing during TW, epistaxis, tracheal blood, tracheal mucus, dyspnoea, abnormal breath sounds, hyperthermia, and nasal discharge.

Data regarding the detection of microorganisms other than *Mycoplasma* spp. and cytological examinations was recovered from the LABÉO results database, which is filled in regularly as part of the diagnostic workflow in response to veterinarian requests for analyses on respiratory samples. In brief, bacteria were isolated and quantified on appropriate agar media and identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Léon et al. 2020), except for *Rhodococcus equi* for which a specific real-time PCR protocol was used (Rodríguez-Lázaro et al., 2006). If more than three bacterial species were detected (excluding *Mycoplasma* spp.), the sample was classified as polymicrobial and the strains present were not identified. Screening for equine respiratory viruses, whenever requested by veterinarians, was performed by real-time PCR (Doubli-Bounoua et al., 2016), and targeted the following viruses: equine herpes virus (EHV) – 1, 2, 4 and 5, equine arteritis virus (EAV), equine rhinitis virus (ERV) –A and –B, equine adenovirus (EAdV) – 1 and – 2, and equine influenza virus (EIV). Cytological analyses were performed by differential leukocyte count as previously described (Orard et al., 2016).

### 2.3. Detection and identification of *Mycoplasma* spp

Full details of the method used to detect and identify *Mycoplasma* spp. from equine TW and BAL samples can be found in Martineau et al. (2023). Briefly, two 200 µL samples were seeded into 1.8 mL of mycoplasma culture broth (INDICIA) and incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for *Mycoplasma* spp. enrichment during 3–7 days. One broth was used for DNA extraction and real-time PCR to detect *Mycoplasma* spp. and *M. felis*, and the other was used for daily monitoring of mycoplasma growth and further seeding onto agar plates to isolate colonies. Isolates and *Mycoplasma* spp.-positive DNA extracts were identified by endpoint PCRs (*M. equirhinis* or *M. pulmonis*), or if these two PCRs tested negative, by Sanger sequencing of their 16S rRNA.

### 2.4. Data analysis

The raw collected data was further formatted for purposes of analysis. Sex, age, and breed were reassembled into two categories each (male and female, age <5 years and ≥5 years, racehorses and others), as previously described (Martineau et al., 2023). Use of the horses was categorized into two modalities: athletes (e.g. for racing, dressage, training) and non-athletes (e.g. retired, club riding, breeding). The sampling period was split into two semesters. Shipping time of samples was stratified into four classes: [6–12 h],]12–24 h,]24–48 h, and > 48 h.

A cumulative clinical score was calculated for sampled horses with details on nasal discharge, cough, dyspnoea and hyperthermia, which are described as significant clinical signs for respiratory disorders (Couetil et al., 2020; Pusterla et al., 2022; Reuss and Giguère, 2015). These signs were weighted as follows: nasal discharge (scored as 0 if none, or 1 if present), cough (0 or 2), dyspnoea (0 or 3), and hyperthermia (0 or 4). Samples with neutrophil counts > 5% for BAL and >

20% for TW were considered abnormal (Rossi et al., 2018).

### 2.5. Statistical analysis

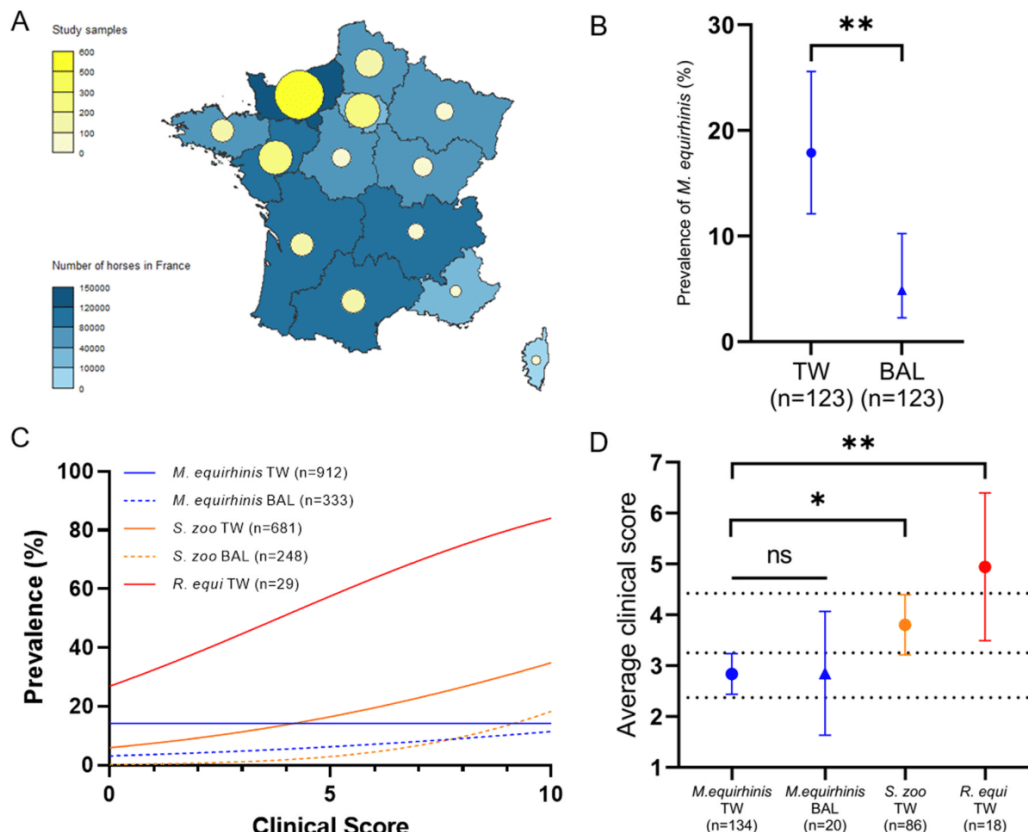
Statistical analyses were performed using RStudio (RStudio, Inc, Boston, MA). Graphed output was produced using GraphPad Prism 9.1.12 (GraphPad, San Diego, CA). A Chi-square test ( $n > 5$ ) or Fisher's exact test ( $n \leq 5$ ) was used to test the independence of a pair of categorical variables. Quantitative variables with a non-normal distribution (tested with Shapiro-Wilk) were tested using the non-parametric Mann-Whitney test. A  $P$ -value  $< 0.05$  was considered significant. A multivariate logistic regression model was built to assess the predictors for presence of *M. equirhinis*. The explanatory variables to be included in the final model were selected using the individual  $P$ -values of several simple logistic regression models. Only significant terms, i.e. individual  $P$ -value less than 0.15 in classical logistic regression (Sun et al., 1996), were retained for the multivariate model. This cut-off was chosen to avoid adding too many variables in the model, which would thus create a final multivariate model with too few individuals, as many horses had missing data. The reference modality was attributed to the majority population (sampling year/semester, population, breed, sex, age, use, living environment, specimen, and shipping temperature) or the best scenario (transport time, clinical score, and neutrophil count). If no *M. equirhinis* was detected in a modality, then Firth's penalised logistic regression was used (Firth, 1993). Odds ratios (OR) and their

corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated for each variable. We used a manual backward stepwise process to construct the final multivariate models, with significance set at of  $P < 0.05$ . Confounding factors and interactions were tested by observing the effect of removing variables on the coefficients of remaining variables. If the coefficient of a significant variable in the model changed by at least 25% following removal of a variable, the removed variable was considered a confounder. Variables suspected of interacting were tested for two-way interactions and, if found significant, were included in the final multivariate model ( $P < 0.05$ ). All the final multivariate models were tested for goodness of fit using the Hosmer–Lemeshow test (Hosmer and Lemeshow, 2000).

## 3. Results

### 3.1. Population analysis

The 1948 clinical samples collected from 1764 horses included in this study originated from different administrative regions of France (30–510 samples per region). The region with the most numerous samples was Normandy, which is also the most horse-populated region of France. However, number of samples per region did not always correlate with equine population per region (Fig. 1A). Note that three samples were collected in the French overseas territories. The overall prevalence of *Mycoplasma* spp. was 16.1% (ranging from 6.6% to 19.2%



**Fig. 1.** Geographic origin of collected samples and comparative prevalence of *M. equirhinis*. (A) Regional distribution of the equine population and samples collected for this study in mainland France. (B) Prevalence of *M. equirhinis* in TW and BAL collected on the same horse, on the same day ( $n = 123$ ). Error bars correspond to 95% confidence intervals. “\*\*”:  $P \leq 0.01$  after a Chi-square test. (C) Prevalence of *M. equirhinis*, *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* (*S. zoo*) and *Rhodococcus equi* (*R. equi*) according to the clinical score given to each horse, plotted as a cumulative Gaussian distribution; n, number of tested samples with a clinical score. (D) Average clinical score of horses in which at least one of the agents was detected (showing both TW and BAL samples for *M. equirhinis*). Error bars correspond to 95% confidence intervals. “ns”: not significant. “\*” and “\*\*”:  $P \leq 0.05$  and  $P \leq 0.01$ , respectively, after a Mann-Whitney test.



depending on the region), of which 85.3% were *M. equirhinis*. In the overall population, the prevalence of *M. equirhinis* was significantly different (Chi-square test,  $P < 0.0001$ ) between TW (16.0%) and BAL (7.6%). This difference was confirmed on a subset of horses ( $n = 123$ ) that were sampled at the same time by both TW (17.9%) and BAL (4.8%) (Fig. 1B,  $P = 0.0013$ ).

### 3.2. Clinical scoring

The cumulative Gaussian distribution of the prevalence of *M. equirhinis* as a function of clinical score was compared to that of a primary pathogen [*Rhodococcus equi* (*R. equi*)] of young foals and an opportunist pathogen [*Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* (*S. zoo*)] (Fig. 1C). For *R. equi*, as no BAL samples were positive, the prevalence curve only plots TW samples. *R. equi* prevalence increased linearly with clinical score, which is the expected pattern for a strict pathogen. The sub-population of clinical specimens, with a clinical score, tested for *R. equi* is small-sized ( $n = 29$  in Fig. 1C) and includes a majority of animals under the age of 18 months, for which *R. equi* can be considered as a pathogen. For *S. zoo* and *M. equirhinis*, prevalence in TW and prevalence in BAL were examined independently. For *S. zoo*, there was a less significant increase compared to *R. equi* in prevalence with clinical score, with TW and BAL curves running almost parallel. For *M. equirhinis*, prevalence was steady (TW) or almost steady (BAL) across the clinical scores, suggesting a non-pathogenic pattern. Mean clinical scores were significantly lower for samples containing *M. equirhinis* than samples containing *S. zoo* or *R. equi* (Fig. 1D). Once again, in the case of samples positive for *R. equi*, the small sub-population ( $n = 18$ ) observed corresponds mainly to young horses. These results suggest that *M. equirhinis* may be considered commensal or opportunist, but not a pathogen.

### 3.3. Statistical modelling

Given the significant difference in proportion of *M. equirhinis* between TW and BAL collected on the same horse at the same time point (Fig. 1B), we ran the risk factor analysis separately on the 1409 TW specimens and the 539 BAL specimens. Categories of predictors containing less than 10% of the population were reassembled, except when analysing the potential impact of origin of samples (LABÉO diagnostic workflow versus 'Jumenterie du Pin'). As the prevalence of *M. equirhinis* did not vary significantly with origin of samples or year of sampling (SD1), we chose to combine these subgroups in order to work on a single population. As the prevalence of *M. equirhinis* showed no change with clinical scores (Figure 1B), we classified these scores into five classes for TW and six classes for BAL (SD1).

In TW samples, age, breed, use, living environment, and semester of collection were significant explanatory variables in the univariate models ( $P < 0.15$ ) (Table 1) and were therefore included in the TW multivariate model (Table 2).

As *M. equirhinis* was not detected in normal-neutrophil-count BAL samples, we used a penalised regression to run an independent analysis on the 'neutrophil count' variable, which showed a significant difference between the two classes (Table 1). *M. equirhinis* was also not detected in samples that took more than 48 h to arrive at the lab for analysis. However, we found a similar prevalence between the two other time-in-transport modalities, showing no linearity between transport time and capacity of detection. Hence, age and breed were the only variables significant enough ( $P < 0.15$ ) to be included in the BAL multivariate model (Table 2).

Due to missing data for some horses, the two multivariate models had 649 TW samples and 439 BAL samples (Table 2). The final multivariate models showed that the significant risk factors for presence of *M. equirhinis* in TW were breed ( $P = 0.049$ ) and living environment

**Table 1**

Prevalence and univariate analysis of *M. equirhinis* detection by the sampled horse's demographic status. Only variables with  $P < 0.15$  for at least one of the sample types are shown. N = number of samples by modality, n = number of *M. equirhinis*-positive samples, % = prevalence of *M. equirhinis*, OR = odds-ratio, 95% CI = 95% confidence interval 95%,  $P = P$ -value. NA: not available; TW: tracheal wash. BAL: bronchoalveolar lavage.

	TW					BAL				
	N	n	%	OR (CI 95%)	P	N	n	%	OR (CI 95%)	P
All	1409	226	16.0%			539	41	7.6%		
Age										
NA	139					63				
≥ 5 years	897	130	14.5%	1.000		379	22	5.8%	1.000	
< 5 years	373	75	20.1%	<b>1.485 (1.081–2.028)</b>	<b>0.014</b>	97	15	15.5%	<b>2.968 (1.451–5.932)</b>	<b>0.002</b>
Breed										
NA	229					94				
Others	806	124	15.4%	1.000		327	18	5.5%	1.000	
Racehorses	374	75	20.1%	<b>1.380 (1.001–1.890)</b>	<b>0.047</b>	118	18	15.3%	<b>3.090 (1.541–6.201)</b>	<b>0.001</b>
Living environment										
NA	618					246				
Mixed	407	57	14.0%	1.000		174	11	6.3%	1.000	
Outdoor	202	18	8.9%	<b>0.601 (0.335–1.031)</b>	<b>0.074</b>	59	2	3.4%	0.512 (0.079–2.012)	0.404
Stable	182	40	22.0%	<b>1.730 (1.099–2.703)</b>	<b>0.017</b>	60	3	5.0%	0.780 (0.172–2.603)	0.710
Neutrophil (%)										
NA						106				
Normal	71	8	11.3%	1.000		51	0	0.0%	1.000	
Abnormal	604	103	17.1%	1.644 (0.809–3.810)	0.202	382	32	8.4%	<b>9.550 (1.313–1.216E+03)</b>	<b>0.019</b>
Semester										
Spring and Summer	826	116	14.0%	1.000		332	27	8.1%	1.000	
Autumn and Winter	583	110	18.9%	<b>1.423 (1.069–1.894)</b>	<b>0.015</b>	207	14	6.8%	0.819 (0.408–1.577)	0.560
Shipping time										
NA	17					42				
[6–12 h]	163	23	14.1%	1.000		73	7	10%	1.000	
[12–24 h]	772	131	17.0%	1.244 (0.784–2.052)	0.372	249	20	8%	0.792 (0.341–2.030)	0.609
[24–48 h]	305	46	15.1%	1.081 (0.635–1.883)	0.778	101	8	8%	0.806 (0.281–2.321)	0.683
> 48 h	152	23	15.1%	1.085 (0.579–2.035)	0.798	74	0	0%	<b>0.059 (0.0004–0.504)</b>	<b>5.23E-03</b>
Usage										
NA	470					196				
Non-Athlete	512	58	11.3%	1.000		165	7	4.2%	1.000	
Athlete	427	76	17.8%	<b>1.695 (1.174–2.459)</b>	<b>0.005</b>	178	14	7.9%	1.927 (0.780–5.200)	0.168

**Table 2**

Multivariate model for TW and BAL samples. EC = estimate coefficient, SE = standard error, OR = odds ratio, 95% CI = 95% confidence interval, P = P-value.

TW (n = 649)					
	EC	SE	OR	CI 95%	P
<i>Intercept</i>	-2.537	0.308	0.079	(0.041–0.138)	<b>2.000E-16</b>
<i>Breed</i>			1.000		
Others			1.000		
Racehorses	0.510	0.259	<b>1.666</b>	<b>(0.993–2.750)</b>	<b>0.049</b>
<i>Living environment</i>			1.000		
Mixed			1.000		
Outdoor	-0.479	0.344	0.620	(0.303–1.180)	0.164
Stable	0.727	0.260	<b>2.068</b>	<b>(1.240–3.440)</b>	<b>0.005</b>
BAL (n = 246)					
	EC	SE	OR	CI 95%	P
<i>Intercept</i>	-3.056	0.273	0.047	(4.140E-05–0.042)	<b>1.776E-15</b>
<i>Age</i>			1.000		
≥ 5 years			1.000		
< 5 years	0.580	0.475	1.786	(0.690–4.481)	0.222
<i>Breed</i>			1.000		
Others			1.000		
Racehorses	1.049	0.456	<b>2.855</b>	<b>(1.151–6.937)</b>	<b>0.021</b>

**SUPPLEMENTARY DATA:**

**SD1:** Prevalence of *M. equirhinis* infection stratified by type of sample (TW or BAL) and the sampled horse's demographic status.

**SD2:** Microorganisms found in TW and BAL samples and association with *M. equirhinis* in TW only. P-values were obtained after a Chi-square or Fisher's exact test according to number of samples analysed. NA: not available.

(P = 0.005 for in-stable), whereas only breed was found to be a significant risk factor in BAL (P = 0.021). Furthermore, the TW multivariate model obtained a good score on the Hosmer–Lemeshow test (P = 0.814), whereas the BAL model obtained a much poorer score (P = 0.431).

**3.4. Interaction between *M. equirhinis* and other agents**

In an effort to reveal any potential association between presence of other agents and presence of *M. equirhinis*, we analysed the presence of *M. equirhinis* as a function of presence of other agents found in TW samples only. Agents present in less than 10 TW were not included in the analysis, for statistical reasons. BAL specimens were ruled out because: 1) BAL is not the recommended respiratory specimen for direct detection

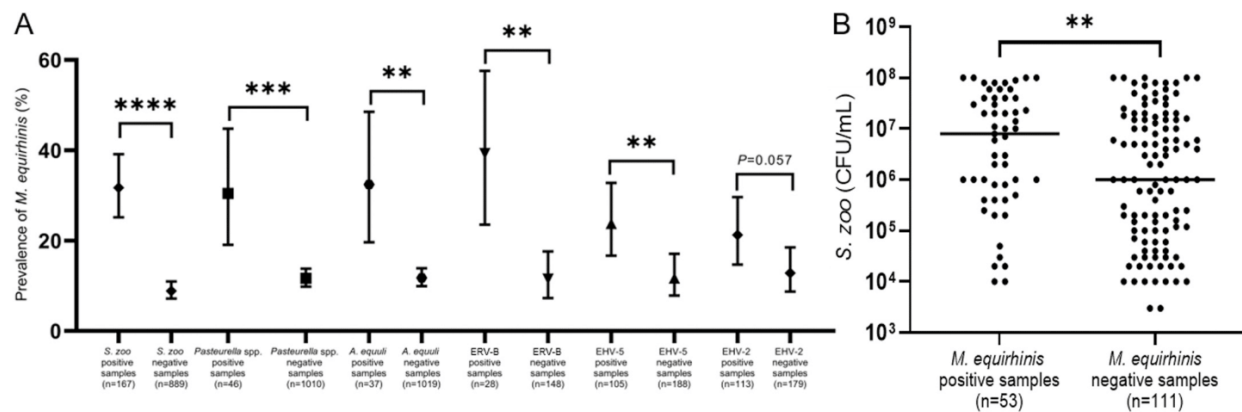
of bacteria, and was sampled less frequently (539 BAL versus 1409 TW) and 2) we had a consistently low rate of detection of other agents of whatever type (SD2). The prevalence of *M. equirhinis* was significantly higher when it was co-isolated with certain other bacteria, such as *S. zoo*, *Pasteurella* spp., or *Actinobacillus equuli*, and certain viruses such as EHV-5 and ERV-B (Fig. 2A), but not with other bacteria and viruses (SD2). Furthermore, by screening our dataset, we were able to show that *M. equirhinis*-positive clinical specimens tended to have a median one log higher *S. zoo* load compared to *M. equirhinis* negative samples, suggesting a positive association between these two bacteria (Fig. 2B).

**4. Discussion**

This study attempted to decipher the clinical role of *M. equirhinis* in equine respiratory disorders.

We first developed a clinical score based on the cumulative occurrence of four clinical signs (nasal discharge, cough, dyspnoea, and hyperthermia). Here we gave the highest weighting to hyperthermia, as an indicator of the infectious process, in contrast to previous studies focusing on inflammatory airway disease, which was recently renamed 'mild equine asthma' (Mete and Özgür, 2017; Wood et al., 2005). Because we had access to more than 1900 clinical specimens, we considered that the potential variability of scoring by several practitioners was smoothed out. However, we ruled out the signs that were too dependent on the veterinarian's subjective evaluation (i.e. presence of tracheal mucus, abnormal breath sounds, and underperformance). The fact that prevalence of *M. equirhinis* remained stable across clinical scores points strongly to a non-pathogenic bacteria, in comparison to other bacterial species with a known clinical role as opportunistic or primary pathogens, i.e. *S. zoo* and *R. equi* (Rodríguez-Lázaro et al., 2006; Waller, 2014). However, this result contradicts a previous study that hypothesised, based on a limited number of observations, that *M. equirhinis* may be implicated in coughs in thoroughbred horses (Uchida-Fujii et al., 2021).

The main limitation of our approach was that we did not design a specific study but instead benefited from available diagnostic laboratory data. First, we did not always have an exhaustive record of clinical signs per horse, which decreased the size of the 'usable' study population (from 1948 to 1245 clinical specimens), although the population was still very robust given the large size of our original database. Second, information on the onset of infection was missing at the time of sampling. Third, we did not include other exams, such as imaging of the deep airways, but those might not have been relevant for our study



**Fig. 2.** Association of *M. equirhinis* with other microbial agents. (A) Prevalence of *M. equirhinis* in TW samples in presence or absence of other specific agents, i.e. *Streptococcus equi* subsp. *zoopedemicus* (*S. zoo*), *Pasteurella* spp., *Actinobacillus equuli* (*A. equuli*), equine rhinitis virus-B (ERV-B) and equine herpes virus- 5 and - 2 (EHV-5 and -2). Error bars correspond to 95% confidence intervals. “\*”, “\* \*”, “\* \* \*” and “\* \* \* \*” refer to  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$ ,  $P \leq 0.001$  and  $P \leq 0.0001$ , respectively, after a Chi-square test. (B) Concentration of *S. zoopedemicus* (*S. zoo*) in TW in presence or absence of *M. equirhinis*. Bars correspond to median values. “\* \*”:  $P \leq 0.01$  after a Mann-Whitney test. n: number.

population.

For all these reasons, and to strengthen our hypothesis that *M. equirhinis* acts as a commensal or opportunist agent in the respiratory tract, we investigated further risk factors and co-infection patterns. The screened risk factors were chosen based on previous studies, e.g. period of the year (Uchida-Fujii et al., 2021) or the living environment that might lead to increased exposure to infectious agents due to limited ventilation (Golden et al., 2000).

TW and BAL were analysed separately, as the prevalence of *M. equirhinis* was significantly different in these two types of samples taken from the same animals. Thoroughbreds and trotters were more frequently positive for *M. equirhinis* in both TW and BAL, confirming the findings of our initial study that discussed possible reasons for this increased susceptibility in detail (Martineau et al., 2023). In addition, indoor housing was shown to be associated with a higher risk of detecting *M. equirhinis* in TW samples. Such an association has already been described for equine influenza virus (Gildea et al., 2011). In the absence of canonical virulence factors, the pathogenicity of mycoplasmas is known to come from their ability to escape and modulate the host immune response (Citti and Blanchard, 2013). Note, here, that *M. equirhinis* was only found in BAL specimens with abnormal neutrophil counts, and never in BAL specimens with normal counts. This might explain the poor predictive power (low Hosmer–Lemeshow score) of the multivariate logistic regression model for BAL, from which neutrophil proportion was excluded. Neutrophil imbalance in BAL is one of the parameters used to define asthmatic conditions in horses (Couetil et al., 2020). A previous study also showed that *Mycoplasma* spp. were detected in an asthmatic horse but never in healthy ones, although based on only a limited number of individuals (Manguin et al., 2020). *M. equirhinis* could therefore be associated to asthma, i.e. an inflammatory disorder, as already suggested (Wood et al., 2005), but not to infections (results reported here). This hypothesis is also consistent with the increased prevalence of *M. equirhinis* in horses living indoor in a stable, which is an environment known to promote asthma (Couetil et al., 2016). However, at this stage, we cannot say whether *M. equirhinis* is the cause of this increase in neutrophils, as observed with *M. bovis* or *M. pneumoniae* infection (Allen et al., 1992; Martin et al., 2001), or whether the increase in neutrophils is induced by other agents or environmental sources that go on to facilitate *M. equirhinis* colonisation.

Our co-detection analyses found a significantly higher prevalence of *M. equirhinis* in samples that tested positive for *S. zoo*, *Pasteurella* or *Actinobacillus equuli*. Such a positive association has already been demonstrated at the genus level for *Actinobacillus* (Wood et al., 2005). Furthermore, the concentration of *S. zoo* was significantly higher in samples where *M. equirhinis* was co-detected. Our data did not allow us to conclude on the clinical significance of co-detection of these two species (data not shown), but it did suggest a positive association between the two species. Research on refractory children's pneumonia due to *M. pneumoniae* found that co-detection of *Streptococcus pneumoniae* was frequent and resulted in an increased duration of symptoms in carrier children (Zhang et al., 2018). Further research is warranted to investigate whether co-infection by mycoplasma and streptococci in horses should be considered a cause of disease severity or duration.

TW and BAL samples are not optimal clinical specimens for detecting coinfection with viruses, and nasopharyngeal swabs are usually preferred for viral detection. Nevertheless, here, in TW, we found a higher prevalence of *M. equirhinis* when EHV-5 or ERV-B were also detected. EHV-5 that is very commonly recovered from horses and has a controversial clinical role (Back et al., 2015), whereas ERV-B is associated with coughing in standard bred racehorses at training (Doubli-Bounoua et al., 2016). Mycoplasmas are regularly co-present with other microbes in respiratory disorders of other animal hosts, such as cattle (Grissett et al., 2015), pigs (Saade et al., 2020) and dogs (Maboni et al., 2019), but it remains unclear whether these co-infections could result in worsening clinical conditions in horses. Microbiota studies could help determine the contribution of *M. equirhinis* in what could be

called the 'equine respiratory disease complex', in comparison to what is known in other species, as suggested by Mach et al. (Mach et al., 2021).

## 5. Conclusions

*M. equirhinis* is more often detected in TW than in BAL specimens, but its detection rate is constant whatever the clinical score, pointing to a non-primary infectious agent. *M. equirhinis* could nonetheless play a part in the equine respiratory disease complex, in association with *S. equi* subsp. *zooepidemicus* and ERV-B. Since the presence of *M. equirhinis* is associated with abnormal neutrophil concentrations in BAL, it may act through dysregulation of the host immune response, as is well known in other respiratory complexes. Quantifying the *M. equirhinis* load at the infection site could help define its opportunistic nature, and metagenomic data would offer a global picture of its contribution to the equine respiratory disease complex.

## Ethical animal research

CENOMEXA—the Normandy institutional animal care and use committee (CEEA-054) approved this study protocol under authorisation/agreement #APAFIS 2020041612126739 (#26697).

## Authorship

M. Martineau contributed to study design, laboratory analysis, data analysis and interpretation, and co-drafted the manuscript. S. Lefebvre, E. Kokabi and A. Taïbi contributed to laboratory analyses. S. Pradier contributed to sampling and the development of clinical scoring for horses. M. Jäy contributed to laboratory analyses and data analysis. F. Tardy and A. Léon contributed to study design and data interpretation, and co-drafted the manuscript. All authors read and approved the final submitted manuscript.

## Funding

This work received financial support from the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation, grant number CS-2020–2023–022-MYCO-PAB), the Fonds Eperon (grant number N15–2020), and the GIS (Groupement d'Intérêt Scientifique) CENTAURE (grant number GIS20-SEP-01).

## Declaration of Competing Interest

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper. No competing interests have been declared.

## Acknowledgements

The authors thank Adélie Colin, Florine Dieu, and Agnès Tricot at the Anses laboratory in Lyon for assisting with strain management. We also thank Coralie Lupo for her support on the statistical analyses, and the LABÉO cytology, bacteriology, and molecular biology diagnostic units for their assistance on analysis of the studied samples.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.vetmic.2023.109926.

## References

- Allam, N.M., Lemcke, R.M., 1975. Mycoplasmas isolated from the respiratory tract of horses. J. Hyg. Camb. 74, 29. <https://doi.org/10.1017/s0022172400046908>.



- Allen, J.W., Viel, L., Bateman, K.G., Rosendal, S., Shewen, P.E., 1992. Cytological findings in bronchoalveolar lavage fluid from feedlot calves: associations with pulmonary microbial flora. *Can. J. Vet. Res.* 56, 122–126.
- Back, H., Ullman, K., Treiberg Berndtsson, L., Riihimäki, M., Penell, J., Ståhl, K., Valarcher, J.-F., Pringle, J., 2015. Viral load of equine herpesviruses 2 and 5 in nasal swabs of actively racing Standardbred trotters: Temporal relationship of shedding to clinical findings and poor performance. *Vet. Microbiol.* 179, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.002>.
- Brown, D.R., May, M., Bradbury, J.M., Balish, M.F., 2018. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1st ed., Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608>.
- Citti, C., Blanchard, A., 2013. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol.* 21, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.003>.
- Couetil, L., Cardwell, J.M., Leguillette, R., Mazan, M., Richard, E., Bienze, D., Bullone, M., Gerber, V., Ivester, K., Lavoie, J.-P., Martin, J., Moran, G., Niedźwiedz, A., Pusterla, N., Swiderski, C., 2020. Equine asthma: Current understanding and future directions. *Front. Vet. Sci.* 7, 450. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00450>.
- Couëtill, L.L., Cardwell, J.M., Gerber, V., Lavoie, J.-P., Léguillette, R., Richard, E.A., 2016. Inflammatory airway disease of horses—Revised consensus statement. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 503–515. <https://doi.org/10.1111/jvim.13824>.
- Doubli-Bounoua, N., Richard, E.A., Léon, A., Pitel, P.-H., Pronost, S., Fortier, G., 2016. Multiple molecular detection of respiratory viruses and associated signs of airway inflammation in racehorses. *Virol. J.* 13, 197. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0657-5>.
- Evans, A.S., 1976. Causation and disease: The Henle-Koch postulates revisited. *Yale J. Biol. Med.* 49, 175–195.
- Firth, D., 1993. Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika* 80, 27–38. <https://doi.org/10.1093/biomet/80.1.27>.
- Gildea, S., Arkins, S., Cullinane, A., 2011. Management and environmental factors involved in equine influenza outbreaks in Ireland 2007–2010. *Equine Vet. J.* 43, 608–617. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00333.x>.
- Golden, V., Turner, L.W., Coleman, R.B., Gates, R.S., 2000. Equine response to environmental factors: a literature review and recommendations for design and environmental modification. ASAE.
- Grissett, G.P., White, B.J., Larson, R. I., 2015. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 770–780. <https://doi.org/10.1111/jvim.12597>.
- Hooker, J.M., Butler, M., 1977. The development of complement-fixing antibody in horses after infection with *Mycoplasma equirhinis*. *J. Comp. Pathol.* 87, 281–286. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(77\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0021-9975(77)90015-9).
- Hoffman, A., Baird, J.D., Kloeze, H.J., Rosendal, S., Bell, M., 1992. *Mycoplasma felis* pleuritis in two show-jumper horses. *Cornell Vet.* 82, 155–162.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000. *Applied logistic regression*. Wiley Series in Probability and Statistics, 2nd ed., Wiley, New York.
- Kudirkene, E., Aagaard, A.K., Schmidt, L.M.B., Pansri, P., Krogh, K.M., Olsen, J.E., 2021. Occurrence of major and minor pathogens in calves diagnosed with bovine respiratory disease. *Vet. Microbiol.* 259, 109135. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109135>.
- Léon, A., Castagnet, S., Maillard, K., Paillot, R., Giard, J.-C., 2020. Evolution of in vitro antimicrobial susceptibility of equine clinical isolates in France between 2016 and 2019. *Animals* 10, 812. <https://doi.org/10.3390/ani10050812>.
- Lesnoff, M., Laval, G., Bonnet, P., Abdicho, S., Workalemahu, A., Kifle, D., Peyraud, A., Lancelot, R., Thiaucourt, F., 2004. Within-herd spread of contagious bovine pleuropneumonia in Ethiopian highlands. *Prev. Vet. Med.* 64, 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.03.005>.
- Maboni, G., Seguel, M., Lorton, A., Berghaus, R., Sanchez, S., 2019. Canine infectious respiratory disease: New insights into the etiology and epidemiology of associated pathogens. *PLoS ONE* 14, e0215817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215817>.
- Mach, N., Baranowski, E., Nouvel, L.X., Citti, C., 2021. The airway pathobiome in complex respiratory diseases: a perspective in domestic animals. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 583600. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.583600>.
- Manguin, E., Pépin, E., Boivin, R., Leclere, M., 2020. Tracheal microbial populations in horses with moderate asthma. *J. Vet. Intern. Med.* 34, 986–995. <https://doi.org/10.1111/jvim.15707>.
- Martin, R.J., Chu, H.W., Honour, J.M., Harbeck, R.J., 2001. Airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness after *Mycoplasma pneumoniae* infection in a murine model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 577–582. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.5.4315>.
- Martineau, M., Castagnet, S., Kokabi, E., Tricot, A., Jaÿ, M., Léon, A., Tardy, F., 2023. Detection of *Mycoplasma* spp. in horses with respiratory disorders. *Equine Vet. J.* evj.13918. <https://doi.org/10.1111/evj.13918>.
- Mete, A., Özgür, N.Y., 2017. Investigation of the presence of *Mycoplasma* as an etiologic agent of inflammatory airway diseases in thoroughbred racehorses in Istanbul Province. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 365–371. <https://doi.org/10.3906/vet-1606-90>.
- Morley, P.S., Chirino-Trejo, M., Petrie, L., Krupka, L., Schwab, M., 1996. Pericarditis and pleuritis caused by *Mycoplasma felis* in a horse. *Equine Vet. J.* 28, 237–240. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1996.tb03779.x>.
- Ogilvie, T.H., Rosendal, S., Blackwell, T.E., Rostkowski, C.M., Julian, R.J., Ruhnke, L., 1983. *Mycoplasma felis* as a cause of pleuritis in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 1374–1376.
- Orard, M., Depecker, M., Hue, E., Pitel, P.-H., Couroucé-Malblanc, A., Richard, E.A., 2016. Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses. *Vet. J.* 207, 193–195. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.09.027>.
- Pusterla, N., James, K., Barnum, S., Bain, F., Barnett, D.C., Chappell, D., Gaughan, E., Craig, B., Schneider, C., Vaala, W., 2022. Frequency of detection and prevalence factors associated with common respiratory pathogens in equids with acute onset of fever and/or respiratory signs (2008–2021). *Pathogens* 11, 759. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070759>.
- Reuss, S.M., Giguère, S., 2015. Update on bacterial pneumonia and pleuropneumonia in the adult horse. *Vet. Clin. N. Am.* 31, 105–120. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.002>.
- Rodríguez-Lázaro, D., Lewis, D.A., Ocampo-Sosa, A.A., Fogarty, U., Makrai, L., Navas, J., Scortzi, M., Hernández, M., Vázquez-Boland, J.A., 2006. Internally controlled real-time PCR method for quantitative species-specific detection and *vapA* genotyping of *Rhodococcus equi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4256–4263. <https://doi.org/10.1128/AEM.02706-05>.
- Rossi, H., Virtala, A.-M., Raekallio, M., Rahkonen, E., Rajamäki, M.M., Mykkänen, A., 2018. Comparison of tracheal wash and bronchoalveolar lavage cytology in 154 horses with and without respiratory signs in a referral hospital over 2009–2015. *Front. Vet. Sci.* 5, 61. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00061>.
- Saade, G., Deblanc, C., Bougon, J., Marois-Créhan, C., Fablet, C., Auray, G., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., Gagnon, C.A., Zhu, J., Gottschalk, M., Summerfield, A., Simon, G., Bertho, N., Meurens, F., 2020. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Vet. Res.* 51, 80. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00807-8>.
- Sun, G.-W., Shook, T.L., Kay, G.L., 1996. Inappropriate use of bivariable analysis to screen risk factors for use in multivariable analysis. *J. Clin. Epidemiol.* 49, 907–916. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(96\)00025-X](https://doi.org/10.1016/0895-4356(96)00025-X).
- Uchida-Fujii, E., Kinoshita, Y., Niwa, H., Maeda, T., Nukada, T., Ueno, T., 2021. High prevalence of *Mycoplasma equirhinis* in thoroughbred horses with respiratory symptoms in autumn 2018. *J. Vet. Med. Sci.* 83, 1907–1912. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0163>.
- Waller, A.S., 2014. Equine respiratory disease: A causal role for *Streptococcus zooepidemicus*. *Vet. J.* 201, 3–4. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.013>.
- Wood, J.L.N., Newton, J.R., Chanter, N., Mumford, J.A., 2005. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J. Clin. Microbiol.* 43, 120–126. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.120-126.2005>.
- Zhang, X., Chen, Z., Gu, W., Ji, W., Wang, Y., Hao, C., He, Y., Huang, L., Wang, M., Shao, X., Yan, Y., 2018. Viral and bacterial co-infection in hospitalised children with refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Epidemiol. Infect.* 146, 1384–1388. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000778>.

## SUPPLEMENTARY DATA

### SD1: Prevalence of *M. equirhinis* infection stratified by type of sample (TW or BAL) and the sampled horse's demographic status.

	TW					BAL				
	N	n	%	OR (CI 95%)	P	N	n	%	OR (CI 95%)	P
All	1409	226	16.0%			539	41	7.6%		
Age										
NA	139					63				
≥5 years	897	130	14.5%	1.000		379	22	0.058047	1.000	
<5 years	373	75	20.1%	<b>1.485 (1.081 - 2.028)</b>	<b>0.014</b>	97	15	0.154639	<b>2.968 (1.451 - 5.932)</b>	<b>0.002</b>
Breed										
NA	229					94				
Others	806	124	15.4%	1.000		327	18	5.5%	1.000	
Racehorses	374	75	20.1%	<b>1.380 (1.001 - 1.890)</b>	<b>0.047</b>	118	18	15.3%	<b>3.090 (1.541 - 6.201)</b>	<b>0.001</b>
Clinical score										
NA	487					206				
0	170	25	14.7%	1.000		0	79	3	3.8%	1.000
[1 -2]	275	45	16.4%	1.186 (0.702 - 2.043)	0.529	1	37	4	10.8%	3.070 (0.643 - 16.320)
3	224	28	12.5%	0.829 (0.463 - 1.488)	0.525	2	73	5	6.8%	1.863 (0.440 - 9.354)
4 - 5	108	17	15.7%	1.083 (0.547 - 2.104)	0.814	3	67	2	3.0%	0.780 (0.100 - 4.840)
6 - 10	145	19	13.1%	0.875 (0.455 - 1.657)	0.683	4 - 5	39	4	10.3%	2.895 (0.607 - 15.359)
6 - 10						38	2	5.3%	1.407 (0.179 - 8.850)	0.788
Living environment										
NA	618					246				
Mixed	407	57	14.0%	1.000		174	11	6.3%	1.000	
Outdoor	202	18	8.9%	<b>0.601 (0.335 - 1.031)</b>	<b>0.074</b>	59	2	3.4%	0.512 (0.079 - 2.012)	0.404
Stable	182	40	22.0%	<b>1.730 (1.099 - 2.703)</b>	<b>0.017</b>	60	3	5.0%	0.780 (0.172 - 2.603)	0.710
Neutrophil (%)										
NA						106				
Normal	71	8	11.3%	1.000		51	0	0.0%	1.000	
Abnormal	604	103	17.1%	1.644 (0.809 - 3.810)	0.202	382	32	8.4%	<b>9.550 (1.313 - 1.216E+03)</b>	<b>0.019</b>
Origin of samples										
LABEO diagnostic workflow	1357	218	16.1%	1.000		487	38	7.8%	1.000	
"Jumenterie du Pin"	52	8	15.4%	0.950 (0.409 - 1.939)	0.896	52	3	5.8%	0.723 (0.170 - 2.096)	0.601
Semester										
Spring and Summer	826	116	14.0%	1.000		332	27	8.1%	1.000	
Autumn and Winter	583	110	18.9%	<b>1.423 (1.069 - 1.894)</b>	<b>0.015</b>	207	14	6.8%	0.819 (0.408 - 1.577)	0.560
Sex										
NA	128					61				
Male/gelding	712	115	16.2%	1.000		242	20	8.3%	1.000	
Female	569	98	17.2%	1.080 (0.803 - 1.450)	0.609	236	19	8.1%	0.972 (0.502 - 1.877)	0.932
Shipping temperature										
NA	1					0				
Ambient	981	163	16.6%	1.000		430	32	7%	1.000	
Refrigerated	427	62	14.5%	0.852 (0.617 - 1.165)	0.324	109	9	8%	1.119 (0.489 - 2.329)	0.774
Shipping time										
NA	17					42				
[6h - 12h]	163	23	14.1%	1.000		73	7	9.6%	1.000	
[12h - 24h]	772	131	17.0%	1.244 (0.784 - 2.052)	0.372	249	20	8.0%	0.792 (0.341 - 2.030)	0.609
[24h - 48h]	305	46	15.1%	1.081 (0.635 - 1.883)	0.778	101	8	7.9%	0.806 (0.281 - 2.321)	0.683
>48h	152	23	15.1%	1.085 (0.579 - 2.035)	0.798	74	0	0.0%	<b>0.059 (0.0004 - 0.504)</b>	<b>0.005</b>
Specimen										
Endoscope	1228	200	16.3%	1.000						
Trans-tracheal	181	26	14.4%	0.862 (0.543 - 1.320)	0.511					
Usage										
NA	470					196				
Non-Athlete	512	58	11.3%	1.000		165	7	4.2%	1.000	
Athlete	427	76	17.8%	<b>1.695 (1.174 - 2.459)</b>	<b>0.005</b>	178	14	7.9%	1.927 (0.780 - 5.200)	0.168
Year samplig										
2021	575	96	16.7%	1.000		248	20	8.1%	1.000	
2020	435	63	14.5%	0.845 (0.596 - 1.191)	0.339	165	10	6.1%	0.735 (0.322 - 1.580)	0.444
2022	399	67	16.8%	1.007 (0.713 - 1.415)	0.968	126	11	8.7%	1.090 (0.489 - 2.315)	0.825



**SD2: Microorganisms found in TW and BAL samples and association with *M. equirhinis* in TW only.**

		TW (n=1409)	BAL (n=539)
<b>Bacteria</b>	<i>Mycoplasma</i> spp.	263	50
	<i>M. equirhinis</i>	226	41
	<i>M. pulmonis</i>	7	0
	<i>M. felis</i>	5	0
	<i>M. lipophilum</i>	2	0
	<i>species not identified</i>	23	9
	<i>Rhodococcus equi</i>		
	NA	1325	536
	Positive	43	0
	Others Bacteria		
	NA	73	75
	Polymicrobials	280	43
	<i>Pseudomonas</i> spp.	186	31
	<i>S. zoo</i>	167	10
	<i>Pasteurella</i> spp.	46	5
	<i>Actinobacillus equuli</i>	37	6
	<i>Escherichia coli</i>	25	11
	<i>Staphylococcus</i> spp.	21	10
	<i>Serratia</i> spp.	20	2
	<i>Klebsiella</i> spp.	14	4
Enterobacter spp.	12	11	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	9	2	
<i>Prevotella</i> spp.	5	1	
<i>Bacteroides</i> spp.	4	0	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	0	
<i>Salmonella enterica</i>	0	0	
<b>Viruses</b>	EHV-1		
	NA	1144	442
	Positive	0	0
	EHV-2		
	NA	1117	447
	Positive	113	10
	EHV-4		
	NA	1075	436
	Positive	6	2
	EHV-5		
	NA	1116	447
	Positive	104	17
	ERV-A		
	NA	1304	508
	Positive	1	0
	ERV-B		
	NA	1233	500
	Positive	28	1
	EAdV-1		
	NA	1397	532
Positive	0	0	
EAdV-2			
NA	1408	537	
Positive	0	0	
EIV			
NA	1377	533	
Positive	0	0	
EAV			
NA	1397	539	
Positive	0	/	

Microbial agents	Detection status	<i>M. equirhinis</i> prevalence	P
<i>Rhodococcus equi</i>	+	9.3%	1
	-	9.8%	
<i>S. zoo</i>	+	31.7%	<0.0001
	-	8.9%	
<i>Actinobacillus equuli</i>	+	32.4%	0.0004
	-	11.8%	
<i>Pasteurella</i> spp.	+	30.4%	0.0002
	-	11.7%	
<i>Pseudomonas</i> spp.	+	14.5%	0.360
	-	12.1%	
<i>Klebsiella</i> spp.	+	0.0%	0.381
	-	12.6%	
<i>Staphylococcus</i> spp.	+	23.8%	0.113
	-	12.3%	
<i>Escherichia coli</i>	+	12.0%	1
	-	12.5%	
Enterobacter spp.	+	8.3%	1
	-	12.5%	
<i>Serratia</i> spp.	+	15.0%	0.730
	-	12.5%	
EHV-2	+	21.2%	0.057
	-	12.8%	
EHV-5	+	23.8%	0.007
	-	11.7%	
ERV-B	+	39.3%	0.0002
	-	11.5%	

" + " = positive; " - " = negative

P-values were obtained after a Chi-square or Fisher's exact test according to number of samples analysed. NA: not available.

**– CHAPITRE 3 –**

---

**PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES**

**GÉNOMIQUES DE L'ESPÈCE**

***MYCOPLASMA EQUIRHINIS***

## CHAPITRE 3 : PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES GÉNOMIQUES DE L'ESPÈCE *MYCOPLASMA EQUIRHINIS*

---

Les travaux présentés dans les deux précédents chapitres de ce manuscrit suggèrent très fortement le caractère opportuniste de *M. equirhinis* et donc l'absence de lien direct entre sa détection non quantitative, dans un peu moins de 15 % des prélèvements, et les signes cliniques observés. Ces travaux ont aussi permis de constituer, pour la première fois en France, une collection représentative de 138 souches de terrain de *M. equirhinis*. Cette espèce est peu étudiée à travers le monde et aujourd'hui, seuls trois génomes sont disponibles dans les bases de données publiques sous l'appellation *Metamyoplasma equirhinis* depuis l'acceptation par le NCBI (Site NCBI accès le 09/10/23) de la nouvelle nomenclature des bactéries du genre *Mycoplasma* [Gupta *et al.*, 2018]. Pour rappel, le premier génome, fragmenté en 67 contigs, provient de la souche type NCTC 10148. Le second, issu d'une souche japonaise nommée Myco-7, est complet et circularisé sans que ses commémoratifs soient disponibles. Le dernier génome provient de la souche M432-72. Il a été publié lors de la rédaction de ce manuscrit et n'est autre que le génome circularisé de la souche NCTC 10148. Dans ce troisième chapitre, nous avons étudié les caractéristiques génomiques de l'espèce *M. equirhinis* à partir de 22 souches de notre collection sélectionnées pour leur représentativité géographique à travers la France. L'objectif de ces analyses est d'explorer l'existence de profils de souches spécifiques au sein de l'espèce *M. equirhinis*, qui pourraient être liés à des cas cliniques particuliers et/ou endémiques de certaines régions.

Ces 22 souches ont été caractérisées par séquençage complet des génomes par la technologie Illumina et deux d'entre elles (F14026 et F13465) ont aussi été séquencées par la technologie Oxford Nanopore. Leurs deux génomes circularisés ont ensuite été comparés au génome de référence (Myco-7). Les données génomiques générées ont été soumises à une analyse visant à détecter la présence d'éléments génétiques mobiles, susceptibles d'une part d'induire des altérations dans la synténie entre les souches d'une espèce donnée, et d'autre part de faciliter le transfert horizontal de matériel génétique [Citti *et al.*, 2018 ; Ambroset *et al.*, 2022]. Les gènes associés à la virulence au sein du genre *Mycoplasma* ont été recherchés dans le but d'évaluer la variation potentielle de leur distribution au sein de l'espèce *M. equirhinis* [Boujemaa *et al.*, 2018]. La diversité génomique de l'espèce a été explorée par une approche de phylogénie du génome cœur issu des 22 souches et des deux génomes disponibles sur le NCBI. La diversité phénotypique a été évaluée en déterminant les profils de résistance à cinq molécules, représentant trois classes d'antibiotiques : oxytétracycline (tétracycline), enrofloxacin (fluoroquinolone), streptomycine, spectinomycine et gentamicine (aminosides). Ces molécules ont été choisies pour leur utilisation en médecine vétérinaire équine ou bovine

(spectinomycine) et leur potentielle capacité à atteindre des bactéries du genre *Mycoplasma*. Seize souches ont été testées par la méthode de dilution sur gélose, aujourd'hui recommandée pour ce genre bactérien [Gautier-Bouchardon, 2018 ; Jaÿ *et al.*, 2021].

Les génomes circularisés des souches F13465 et F14026 ont une forte homologie et synténie avec ceux des souches Myco-7 et M432-72. Des éléments génétiques mobiles, ICE, IS et prophage, de diverses origines, ont été identifiés dans un nombre limité de souches. Leur description montre une disposition de mobilité restreinte. L'arbre phylogénétique basé sur l'analyse du génome cœur montre une espèce extrêmement homogène. On peut tout de même distinguer deux groupes au sein de notre panel, peu distants et sans lien avec des caractéristiques cliniques des chevaux infectés. Malgré leur origine géographique différente et leur date d'isolement, les isolats français sont étroitement apparentés aux souches M432-72 (Angleterre, 1975) et Myco-7 (Japon, souche récente). En termes de virulence, *M. equirhinis* possède un panel de gènes majoritairement présent au sein du génome cœur et proche de celui de *M. hominis*, une espèce opportuniste des voies urogénitales chez l'Homme. Les CMI des isolats sont très homogènes, avec seulement quelques cas de plus d'une dilution de différence entre deux isolats pour un antibiotique, en particulier pour la gentamicine et l'enrofloxacin. Les CMI sont faibles pour l'oxytétracycline et l'enrofloxacin, et notamment plus élevées au sein des aminosides, pour la streptomycine par rapport à la spectinomycine et à la gentamicine.

Les origines des éléments génétiques, dont l'aspect vestigial serait à confirmer *in vitro*, montrent que cette espèce a été permissive au transfert horizontal de matériel génétique. Cependant, contrairement à d'autres espèces du même genre, telles que *M. bovis*, *M. equirhinis* semble présenter une homogénéité marquée. Il serait intéressant de dater les événements de transferts horizontaux afin de comprendre quand cette espèce a cessé d'évoluer par cette voie. De futurs travaux pourraient essayer de comprendre comment et pourquoi cette espèce est si stable, alors que nos travaux montrent qu'elle est en contact permanent avec différentes espèces bactériennes de nombreux genres au sein du CRE. Néanmoins, *M. equirhinis* possède des gènes associés à la virulence dont la présence dans le génome cœur confirme son caractère opportuniste. Par ailleurs, en plus de leur fonction dans la colonisation, ces gènes pourraient également se révéler bénéfiques pour d'autres agents pathogènes présents dans la flore respiratoire équine. Malgré tout, des tests fonctionnels sont obligatoires pour confirmer le rôle de ces gènes. Du point de vue phénotypique, la relative diversité des CMI obtenues confirme l'homogénéité et la stabilité de l'espèce *M. equirhinis*. Ces résultats inédits de caractérisation de l'espèce *M. equirhinis* ont été soumis pour publication dans le journal « Microbial Genomics » le 3 janvier 2024.





**Publication**

---

**MICROBIAL GENOMICS**

# Unravelling main genomic features of *Mycoplasma equirhinis*.

## Author names

Matthieu MARTINEAU<sup>1,2,3\*</sup>, Chloé AMBROSET<sup>3\*</sup>, Stéphanie LEFEBVRE<sup>3</sup>, Éléna KOKABI<sup>1,2</sup>, Albertine LÉON<sup>1,2</sup>, Florence TARDY<sup>3,4#</sup>.

## Affiliation(s)

<sup>1</sup> LABÉO, Research Department, Saint-Contest, 14000 Caen, France

<sup>2</sup> University of Caen Normandie, University Rouen Normandie, INSERM, DYNAMICURE UMR 1311, 14000 Caen, France

<sup>3</sup> University of Lyon, Anses, VetAgro Sup, UMR Animal Mycoplasmosis, 69007 Lyon, France.

<sup>4</sup> Anses, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory—Mycoplasma, Bacteriology and Antimicrobial Resistance Unit, 22440 Ploufragan; France, #current address, corresponding author

\* contributed equally to the paper

## Corresponding author and email address

*Florence.tardy@anses.fr*

## Keywords

*Mycoplasma, genome, mobile genetic elements, diversity, virulence*

## Repositories:

Accession numbers of genomic sequences are deposited at NCBI: JAXIHK000000000, JAXRUP000000000, JAXIHL000000000, JAXIHM000000000, JAXIHN000000000, JAXIHO000000000, JAXIHP000000000, JAXIHQ000000000, JAXIHR000000000, JAXIHS000000000, JAXIHT000000000, JAXIHU000000000, JAXIHV000000000, JAXIHW000000000, JAXRUR000000000, JAXIHX000000000, JAXIHY000000000, JAXIHZ000000000, JAXIIA000000000, JAXRUQ000000000, CP139735 and CP139734.

## Abstract

*Mycoplasma* spp. are wall-less bacteria with substantially reduced genomic content. Many *Mycoplasma* species are known to colonize the respiratory tract of both humans and livestock animals, where they act as primary pathogens or opportunists. In horses, the *M. equirhinis* species was described for the first time in 1975 but has been poorly studied since, despite regular reports of around 14% prevalence in equine respiratory disorders. The clinical role of this bacterium has remained uncertain, as it has been isolated from healthy animals and the disease cannot be reproduced experimentally. To address this gap, this study was a set up to learn more by completing the genomic characterization of *M. equirhinis*. Four circularized genomes, two of which were generated here, were compared in terms of synteny, gene content, and specific features associated with virulence or genome plasticity. An additional 20 scaffold-level genomes were used to analyze intra-species diversity through a pangenome phylogenetic approach. The *M. equirhinis* species showed consistent genomic homogeneity, pointing to potential clonality of isolates despite their varied geographical origins (UK, Japan and various places in France). The species was also poorly equipped in terms of mobile genetic elements, except for a prophage related to *M. arthritidis* and integrative conjugative elements related to *M. arginini*. The core genome of our isolates harbours the typical virulence-associated genes of mycoplasmas mainly involved in cytoadherence and immune escape. The virulence genes pattern of *M. equirhinis* is rather similar to that of the human opportunist *M. hominis*, which is a strong argument that *M. equirhinis* is not a primary pathogen.

## Impact statement

This study proposed the first in-depth genomic characterization of *M. equirhinis*, an opportunistic mycoplasma species frequently isolated from horses with respiratory disorders. It revealed several remarkable features of the species, such as the sequence similarity between strains and conserved synteny, as well as more classical features in mycoplasmas, such as the virulence-associated genes. This study has also provided the scientific community with new genomic data that can be included in future comparative genomics studies.

## Data summary

The authors confirm all supporting data, code and protocols have been provided within the article or through supplementary data files.



## Introduction

The *Mycoplasma* genus comprises major recognized bacterial pathogens for both human and veterinary health (1). *Mycoplasma*-related infections are closely scrutinized by health agencies like the US Centers for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/>), because they are sexually transmissible (*Mycoplasma (M.) genitalium*) and can cause a form of atypical pneumonia (*M. pneumoniae*) in humans. Furthermore, the World Organization for Animal Health (WOAH, <https://www.woah.org/>) has listed five highly contagious and/or economically damaging *Mycoplasma*-related diseases in its Terrestrial Animal Health Code (contagious bovine pleuropneumonia, contagious caprine pleuropneumonia, contagious agalactia, and avian mycoplasmosis due to *M. gallisepticum* or *M. synoviae*). *Mycoplasma* spp. in animals primarily colonize and infect mucosal areas of the respiratory and urogenital tract and the joints, while haemotrophic mycoplasmas infect red blood cells (2). However, concomitantly, other *Mycoplasma* species colonize the same physiological niches (oropharynx, respiratory and genital tracts) in both healthy and diseased individuals. These species are considered commensal, opportunistic, or of unknown status regarding their infectious potential. The *Mycoplasma* genus species already counts over 120 species, and the number continues to rise as the science community reports new species in various hosts, but most of the time these new species do not attract attention from clinicians.

From a bacteriology standpoint, *Mycoplasma* spp. cumulate several atypical characteristics. Their cells are small and pleomorphic, as they have no cell wall. Their genomes are small, at 580 to 1359 kbp and 568 to 1037 coding sequences (CDS), have a low G+C content (23%–40%), use UGA as a tryptophan codon instead of the universal stop, and have limited coding of complete metabolic pathways. Consequently, mycoplasma growth is fastidious—and even impossible for haemotrophic mycoplasmas—in acellular media, and can only be achieved in sterol-enriched complex media enriched in sterol. Finally, but crucially, *Mycoplasma* infection strategies do not rely on ‘classical’ virulence factors, with the exception of *M. pneumoniae* that secretes the CARDS (community-acquired respiratory distress syndrome toxin) exotoxin (3,4).

The first description of the *M. equirhinis* species dates back to 1975 when Allam and Lemcke isolated four strains from the nasopharynx of thoroughbred horses that were serologically different from known species at that time and were able to hydrolyse arginine and rapidly form “film and spots” on agar plates (5). As one of the four isolates came from a healthy horse, it immediately posed the question of whether *M. equirhinis* was a true pathogen. However, *M. equirhinis* failed to reproduce the disease in Welsh ponies experimentally infected by nasal route (6), and over the years, studies comparing the prevalence of *M. equirhinis* in diseased versus healthy animals failed to reach firm conclusions (7–9). In a recent study including more than 1900 clinical observations, we showed that

the prevalence of *M. equirhinis* remained steady whatever the clinical score of the sampled horse but increased in the presence of other virus or bacteria such as *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (9). We concluded that *M. equirhinis* was not a primary pathogen but could play a role in co-infections of the respiratory tract (9). However, the fact that *M. equirhinis* prevalence was still around 14% in respiratory samples collected in different countries and different study populations (7–11) prompted us to examine whether it was potentially opportunistic.

The present study was set up to learn more by completing the genomic characterization of the species. There is currently only scarce data on *M. equirhinis*, and there are only two genomes available in public databases under the denomination of *Metamycolasma equirhinis*, from the recent still-controversial proposal to revise the taxonomy of the *Mycoplasma* genus based on phylogeny (12). One is the genome of the type strain (NCTC 10148) originally isolated in 1975 by Allam and Lemcke in the UK (5), which is only available at contig level, i.e. 67 contigs but no circularized chromosome. However, while writing this article, another genome from an isolate named M432/72 was deposited on the NCBI website (GenBank: CP137845.1) and turns out to be the complete version of the genome from the NCTC 10148 isolate. The other genome is recent (early 2023) and circularized, but unfortunately the metadata associated with the corresponding isolate (Myco-7) is unavailable, although we can reasonably posit that the isolate is related to research by Uchida-Fujii in 2021 (8). Neither of these two genomes have yet been studied in detail.

Here we used comparative genomics data to characterize the species *M. equirhinis*. The circularized genomes of four isolates, i.e. Myco-7, M432/72 (NCTC10148) and two other genomes generated here, were compared in terms of synteny, gene content, and specific features associated with virulence or genome plasticity. We further sequenced an additional 20 scaffold-level genomes to analyze intra-species diversity through pangenome analysis and a phylogenetic approach. We also evaluated the phenotypical diversity of the species by antimicrobial susceptibility testing on 16 isolates.

## Methods

### Isolates, culture conditions and DNA extraction

For this work, we selected 22 *M. equirhinis* isolates originating from a previous study (9) (**Supplementary table 1**) that had been isolated from the lower respiratory tract of horses from different geographical origins in France and presenting different associated clinical signs. The 22 isolates were cloned in order to sequence their genomes, and 16 of them were further tested for antimicrobial susceptibility. For genome sequencing, a 48h-culture broth of each isolate was filtered using a 0.22- $\mu\text{m}$  filter and then seeded onto PPLO agar plates. The plates were then incubated for 2 to

4 days at 37°C (at 5% CO<sub>2</sub> ), and one clone per strain was picked at random with a micropipette tip, and further subcultured. Genomic DNA was extracted from 2 to 5 culture tubes of 2 mL each, 48-h cultures of the clones using a commercial kit from Lucigen (Epicentre). The quality (OD<sub>260/280</sub> ≥ 1.8 and OD<sub>260/230</sub> ≥ 2) and concentration of the extracted DNA (at 6 µg at 30–500 ng/µL per strain for Oxford Nanopore Technology (ONT) DNA sequencing and 100 ng at 5 ng/µL per strain for Illumina sequencing) were checked using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher) and a Qubit fluorimeter (DNAdS BR kit, Thermo Fisher), respectively.

#### Antimicrobial susceptibility testing (AST)

AST was conducted as previously described on a subset of 16 isolates (13,14). A strain of *Mycoplasma bovis* (F11042) with a known MIC profile and growth kinetics comparable to *M. equirhinis* isolates (data not shown) was included for quality control. Five drugs representing three classes of antibiotics commonly used by equine veterinarians to treat respiratory infections in horses were tested: oxytetracycline (tetracyclines class), enrofloxacin (fluoroquinolones class), streptomycin and gentamicin (aminoglycosides class), and another aminoglycoside (spectinomycin) that was added for purposes of comparison. All the tested antimicrobials were purchased from Sigma-Aldrich. The concentration ranges tested were chosen based on reported values for both wild-type and resistant bacteria colonizing the same niches, and were 0.25–16 µg/mL for oxytetracycline, 4–32 µg/mL for spectinomycin and streptomycin, 0.5–8 µg/mL for gentamicin, and 0.25–4 µg/mL for enrofloxacin.

#### Genome sequencing, assembly and annotation

The 22 strains were sequenced using Illumina technology (paired-end libraries, NovaSeq sequencers), and strains F13465 and F14026 were also ONT sequenced (MinION technology). Both Illumina and ONT sequencing were outsourced (**Supplementary Table 2**). Quality control of raw data (FASTQ files for both short and long reads), genome assemblies (draft genomes for short reads and circularized genomes for hybrid assemblies) and annotations were performed according to previously published protocols and parameters (15). Briefly, the raw data was trimmed for quality (cut-off set at Q25 and for Illumina reads and Q14 for ONT reads) and length (up to 50 pb for Illumina reads and 30,000 pb for ONT reads). Assembly was done using Spades 3.14.1 (16) for draft assemblies and Unicycler 0.4.8 (17) for hybrid assemblies. Annotation was done using Prokka 1.14.6 (18). For complete genomes, assembly statistics and genome completeness were computed using QUAST 5.0.2 (19) and Busco score; which was computed using Busco 4.1.4 (20). All these bioinformatics tools and pipelines were run using the IFB Core cluster resource (<https://www.france-bioinformatique.fr/cluster-ifb-core>).

### Comparative genomic analysis of circularised genomes

The genomes of strain Myco-7 (GCF\_030295865.1) and strain M432/72 (GenBank: CP137845.1) were included for comparison purposes together with the circularized genomes of strains F14026 and F13465. Pairwise comparison of average nucleotide identity (ANI) was performed using fastANI v1.3 (github.com) at the default parameter settings (21). The synteny of the four circularized genomes (with Myco-7 taken as reference) was compared using ProgressiveMauve (darlinglab.org) with the following parameters: 15 match seed weight and min LCB weight set to 10000 (22,23). Genes found in regions differing between two genomes were identified using BLASTp on a ref-seq protein database (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### PCR amplification for screening 16S rRNA copy numbers

Four PCR assays were designed and validated to check the copy numbers of the gene coding for 16S rRNA in the 22 isolates. One primer was located at the 5' terminal of the 16S rRNA gene and was designed using Primer3 (Geneious Prime; Biomatters, New Zealand) on a multiple alignment of the seven 16S copies of isolates F13465 and F14026 (named 16S primer). The four other primers were designed to target genes upstream or downstream the 16S copies, using the consensus sequence of F13465 and F14026 alignments for primers 1 to 3 and only the sequence of F14026 for primer 4.

The four PCR assays were run in a 25µL PCR volume with Premix Ex TAQ (Takara), i.e. 'Condition I' (Supplementary Table 3) on the 22 DNAs from the sequenced isolates. The PCR assay targeting the 4<sup>th</sup> copy was also conducted in a 25µL PCR volume with Go Taq (Promega), i.e. 'Condition II', on an enlarged set of 90 DNAs including the 22 that were sequenced here. The sizes of the amplicons were verified by capillary electrophoresis using a QIAxcel Advanced system (Qiagen).

### In silico analyses for detection of mobile genetic elements and potential virulence factors

These analyses were run in both circularized genomes and scaffold-level genomes generated here.

The search for potential virulence genes was first carried out using the generic VFanalyser software on the VFDB database (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>) (24). Then, a selection of mycoplasma-specific virulence-associated proteins were searched by BLASTp against a custom protein database encompassing all the sequenced genomes of *M. equirhinis* that was built using the Geneious environment (v2023.2.1). The query included i) mycoplasma immunoglobulin binding protein and the associated mycoplasma immunoglobulin protease (i.e. 'MIB-MIP system'), proteins potentially involved in cytoadherence and nucleases described in the very close species *M. hominis* (25–27), ii) variable surface proteins on the model of *M. bovis* (28,29), iii) proteins involved in the biosynthesis of

capsular polysaccharides in the *M. agalactiae* model (30); and iv) the CARDS toxins from *M. pneumoniae* (**Supplementary Table 4**). Only queries with  $\geq 60\%$  cover and  $\geq 40\%$  pairwise identity were considered significant, and are presented in the results section.

We investigated the presence of insertion sequence elements (IS) in the three circularized genomes using ISEScan (1.7.2.3) on the Galaxy Europe platform (usegalaxy.eu) at the default parameter settings (31). If relevant hits were found, the potential transposase protein was identified using the BLASTp function on the ISFinder database (isfinder.biotoul.fr) (32). Any IS transposases identified in the circularized genomes were further searched by tBLASTn in the other genomes.

For the detection of integrative and conjugative elements (ICE) detection, the four CDS corresponding to the ICE backbone (i.e. the two extremities CDS1 and CDS 22, as well as CDS5 and CDS17 that encode homologues of TraE and TraG, respectively, two transmembrane proteins with conserved ATPase domains involved in the conjugative machinery) of the two variant copies described in *M. hominis*, i.e. ICEHo-I and -II, the ICEs of *M. arginini* (33–35), were searched by BlastN against a custom nucleotide database encompassing all the sequenced genomes of *M. equirhina* built using the Geneious environment (**Supplementary Table 5**). The presence of the *M. arginini* ICE was further confirmed by searching DnaG. These two species were chosen based on the results of the Prokka annotation.

First we used the PHASTER web server (36,37) to explore the presence of a prophage sequence. The analysis was then refined by determining the percent identity of individual proteins shared with the MAV1 prophage from *M. arthritidis*, using Clustal Omega (1.2.2) run in Geneious. Phyre2 was further used to gain deeper insight into the putative function of certain proteins with no identity (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (38).

### Phylogenetic tree construction

The core genome of the population (i.e. the 22 strains sequenced in this study plus the two NCBI reference sequences) was calculated using the Panaroo pipeline 1.2.10 (39) on the IFB Core cluster (<https://www.france-bioinformatique.fr/cluster-ifb-core>). The resulting core-genome alignment was used to construct a maximum likelihood (ML) phylogeny in IQ-TREE v2. 0.3 (40). General time reversible nucleotide substitution model, gamma distribution, and proportion of invariable sites (GTR+G+I) were selected as the best-fit model parameters for our data by IQ-TREE. Statistical support for node of the ML phylogeny was assessed using ultrafast bootstrap approach of 1000 replicates. Visualisation of the core-genome phylogenetic tree was done with Figtree v1.4.4 and the tree was midpoint rooted.



**Table 1:** Summary of the main characteristics of the four circularized *M. equirhinis* genomes.

	<i>M. equirhinis</i> strains			
	F13465	F14026	M432/72	Myco-7
Isolation date	2020	2020	1972	NK
Genome size	691,532	738,996	706,186	719,195
G + C content (%)	28.1	28.2	28.0	28.1
ANI to Myco-7 (%)	98.82	98.81	98.89	/
Nr. of CDS	563	607	572	594
Nr. of tRNA	33	34	34	33
Nr. of rRNA (23S and 16S) set	3	4	3	3
Nr. of rRNA 5S	1	1	1	1
Nr. Of ICE	0	0	0	0
Nr. Of IS (remnant)	0	1	0	1

NK: Not Known ; ANI: Average Nucleotide Identity ; ICE: Integrative and Conjugative Element ; IS: Insertion Sequence.

## Results

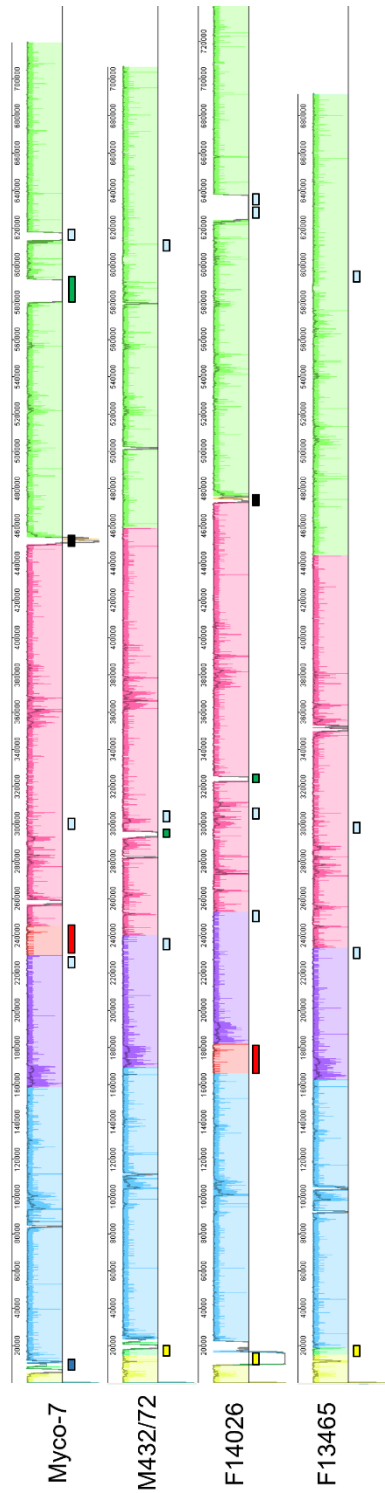
### Overall comparison of the three circularized genomes

All four genomes showed a low G + C content (28.1% or 28.2%) and a high ANI varying from 98.8% for F14026 to 98.9% for F13465 and M432/72 benchmarked against Myco-7 as reference (**Table 1**). The total number of predicted CDS varied from 563 for strain F13465 to 572 for M432/72, 594 for strain Myco-7 and 607 for strain F14026. These CDS numbers are coherent with the genome sizes, which were slightly bigger for strain F14026 (738,996 bp versus 691,532 for strain F13465 and 706,186 for strain M432/72). All four annotated genomes contained the four genes implicated in the arginine dihydrolase pathway, as already described in *M. hominis* species (25). These four were genes *arcA* encoding arginine deiminase, *arcB* encoding ornithine carbamoyltransferase, *arcC* encoding carbamate kinase, and a fourth gene encoding a dimethylarginine dimethylaminohydrolase. This confirms the ability of *M. equirhina* to hydrolyse arginine, as previously found *in vitro* (5).

Despite these homogeneous features, strain F14026 was different: it had four sets of 23S and 16S rRNA versus three for the two other strains (**Table 1**). PCR assays were run to rule out potential assembly errors. The number and size of the amplicons confirmed the presence of four rRNA 16S coding genes in isolate F14026 (**Supplementary Data 1**). Furthermore, strains F14026 and M432/72 had 34 (versus 33 for the two other strains) tRNA loci, showing a duplication of the Aspartic acid tRNA, in a remote DNA location.

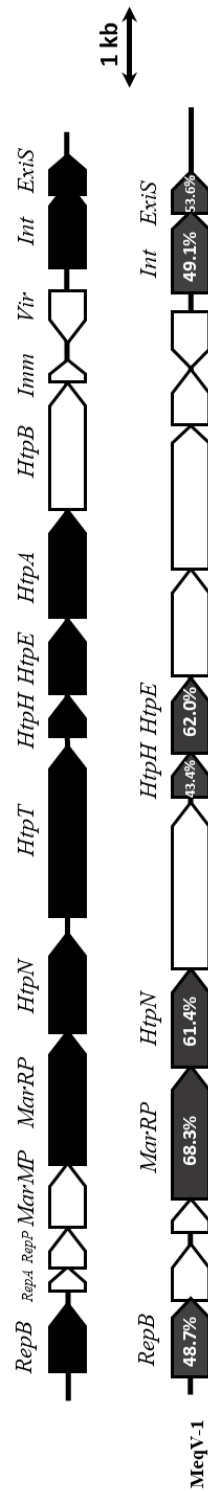
The four genomes were highly syntenic, with long locally collinear blocks (LCB) in the same order and orientation, suggesting few recombination events (**Figure 1**). The few genomic regions that differed between the four genomes corresponded to: i) a CRISPR-Cas9 element not found in Myco-7 that has a type 1 restriction-modification system at the corresponding location; ii) a prophage, vestigial IS, and hypothetical proteins not found in F13465; iii) the double copy of the 23S-16S set which was specific to F14026. The two copies of the 23S-16S rRNAs were located in the same LCB of F14026 and only separated by a block of five CDS and a truncated copy of the *nusG* gene. This organization suggests a duplication event of the rRNA set as the upstream and downstream region of the corresponding 16S-23S rRNA copy in isolate F13465, while the two copies in isolate F14026 were identical and corresponded to the five-CDS block on one side and the *nusG* gene on the other side. Interestingly, the 5S rRNA was a single copy in all four genomes, located at around 14 kb upstream of the third 16S-23S rRNA set. A conserved prophage was detected in both Myco-7 and F14026 isolates (**Figure 1**).





**Figure 1: Multiple genome alignment of F14026, F13465, M432/72 and Myco-7 *M. equirhinis* isolates.**

The Myco-7 genome was set as a reference. The alignment process generated a maximum of eight locally collinear blocks (LCB) representing homologous DNA regions shared between strains without sequence rearrangements. At the bottom of the Mauve alignment, elements highlighted by rectangle are as follows: CRISPR-Cas9 system in yellow, type 1 restriction system in dark blue, prophage in red, 16S-23S set in light blue, partial IS in black, hypotheticals proteins in green.



**Figure 2: Comparison of the MAV1 prophage (*M. arthritidis*, isolate 158L3-1) and the MeqV-1 prophage (*M. equirhinis*, isolate F14026).**

The two prophages share comparable overall ORF organization and orientation, but only seven proteins (in dark grey in the MeqV-1 prophage) share >40% aa similarity. No homologues were identified for the other proteins. In MAV1, the different genes were assigned a function, as follows (44): HtpN to HtpB, structural proteins of the MAV1 phage; RepB, replicative DNA helicase; RepA and P, replication initiators; MarMP, putative C5 methylase; MarRP, a transcriptional regulator; Int, the phage integrase; ExiS, excisionase; Vir, protein to exclude superinfecting phage; Imm, phage repressor.

### Detailed analysis of mobile genetic elements

The PHASTER analysis detected a 13.8-kb prophage (designated MEqV-1) in both the F14026 and Myco-7 genomes. This prophage is related to the *M. arthritidis* MAV-1 phage found in strain PG61 (NC\_001942.1). MEqV-1 comprised 14 ORFs in a similar orientation to the 15 ORFs in MAV-1 (**Figure 2**). Its sequence is conserved between the two *M. equirhinis* isolates (99.5% of nucleotide identity). It spans an entire LCB inserted in different places in the two genomes (**Figure 1**), suggesting independent insertion events. Of the 15 proteins from the MAV1 phage, only seven were found in F14026 with >40% amino acid identity (**Figure 2**). Of the *Rep* genes implicated in replication, we only found *RepB*, encoding a DNA helicase. Homologues of *RepA*, encoding a protein that binds DNA to initiate replication, and *RepP*, encoding a suspected replication initiator, were missing in the F14026 phage. Similarly, for the *Htp* genes involved in phage structure, only *HtpN*, H and E were conserved between the two phages. The integrase (Int) and excisionase (Exis) and the genes encoded by the transcriptional regulator MarRP were similar between MEqV-1 and MAV-1. No prophages were detected in the other scaffold-level genomes.

A gene encoding an IS transposase was detected in both F14026 and Myco-7 (but not in F13465 nor in M432/72). The two transposases are 627 aa long and have a pairwise aa identity of 98.7%. Their first BLASTp hit in ISFinder is an ISSeq4 transposase (IS1634 family) from *Streptococcus equi* of 573 aa with only 36% identity. In contrast, using the NCBI interface, the first BLASTp hit, with default parameters, is an IS1634-family transposase from *Acholeplasmatales bacterium* with 97% identity over 559 aa, and the first hit within the *Mycoplasma* genus is an IS1634-family transposase from *Mycoplasma cottewii*, a commensal species of the ear canal in goats, with 42% identity on 628 aa. The conserved genomic organization around the *M. equirhinis* transposases in both the F14026 and Myco-7 genomes suggests that it is no longer mobile anymore and could be considered vestigial (**Figure 1**). tBLASTn found one transposase similar to that of Myco-7 and F14026 in four of the draft genomes (isolates F13948, F14029, F14037 and F14358) with 100% query coverage and >99% identity.



The search for MICE elements of the *M. hominis* or *M. arginini* type in the circularized genomes only managed to find one copy of an ICE-Ho I-like CDS1 gene in F14026 and M432/72 (**Supplementary Table 5**). This CDS1-like gene was found on another 9 isolates in the scaffold-level genomes (**Supplementary Table 5**). Furthermore, isolate F13947 harboured homologues of the four-CDS backbone of the *M. hominis* ICE-Ho I, albeit in four different contigs. Three backbone genes similar to the MICE of *M. arginini* (NGR\_2017), i.e. CDS5, CDS17 and CDS22, and an additional *dnaG* gene characteristic of *M. arginini* MICE, were found on five draft genomes (F14022, F14029, F14346, F14358 and F14365). For four scaffold-level genomes, the ICE-related CDS were located on the same contig (**Supplementary Table 5**). Interestingly, the *M. equirhina* MICE (MICE-Eql) in these isolates possess a variable region (from 0 to 4807 bp) containing zero to four ORFs located between CDS19 and 22 (**Figure 3**).

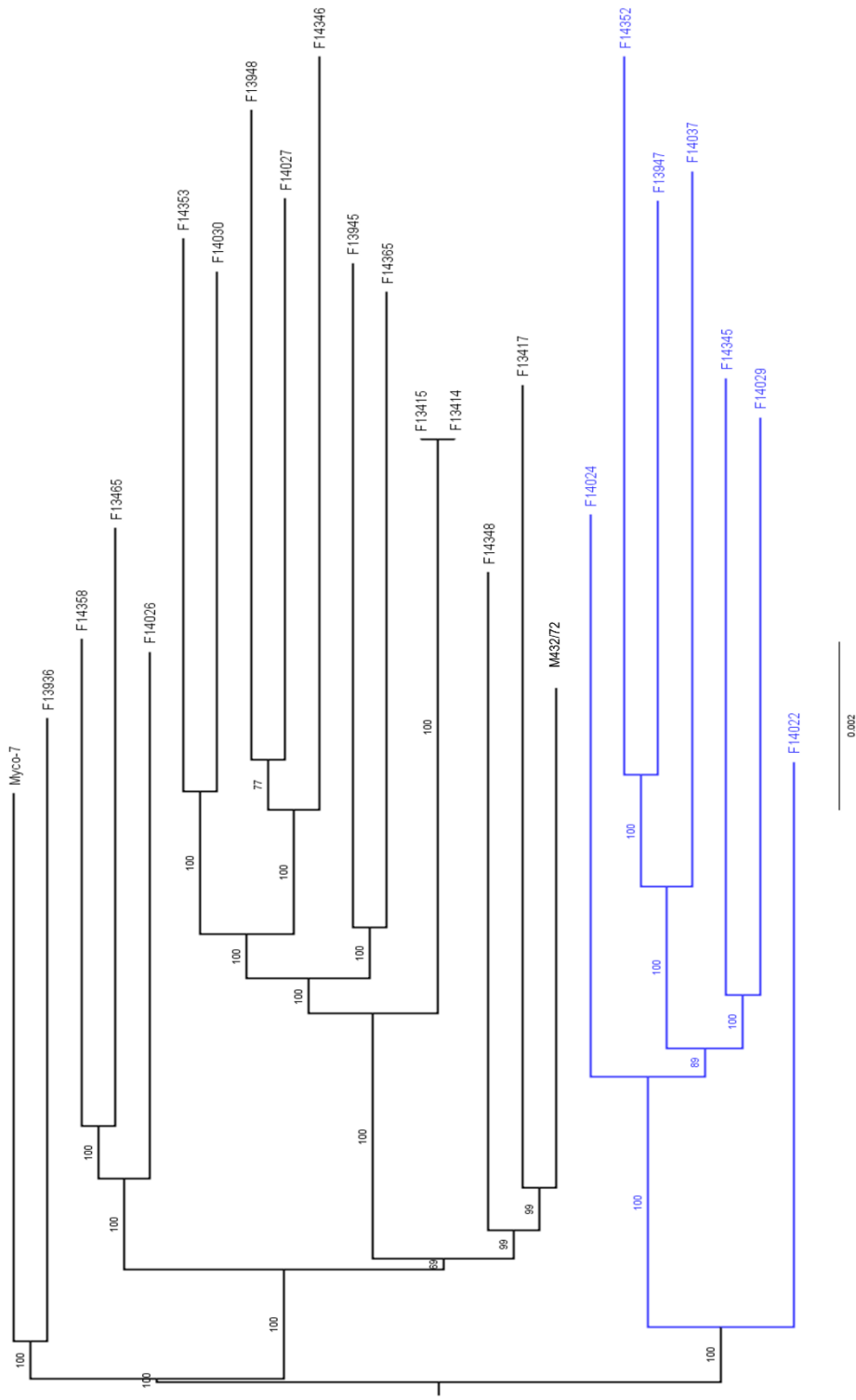
#### Search for virulence genes or genes implicated in host–pathogen interaction

The nonspecific screening on the four circularized genomes highlighted only two potential virulence-associated genes: *tuf* coding an elongation factor Tu, and *HlyA* coding a hemolysin. On top of its canonical role, the Tuf protein has also been shown to contribute to virulence through adhesion to host extracellular matrix components, dissemination, and evasion of the complement system (41). However, as it is one of the most abundant proteins in bacteria, its detection here does not mean it is effectively associated with virulence. In the circularized *M. equirhina* genomes, the HlyA homologue was a 244-aa protein from isolates F14026, F13465 and M432/72. The HlyA protein was 100% identical between F13465 and M432/72 and showed 99.2%-aa identity with F14026, whereas in Myco-7 the protein (corresponding gene JMP7\_3850) was truncated (207-aa). The first BlastP hit of the conserved HlyA protein is a TlyA-family RNA methyltransferase from *M. arthritidis* (query coverage: 100%, percent identity: 68%), while the first hit using Phyre2 is a putative haemolysin from *Streptococcus thermophilus* (<https://doi.org/10.2210/pdb3HP7/pdb>) with 99% query coverage despite only 35% identity for F14026, F13465 and M432/72 and 38% identity for Myco-7.

**Table 2: Virulence and cytoadherence protein found on F14026 and F13465 strains in comparison to *M. hominis* ATCC 23114 strain**

Function	Genes	Protein accession number	Protein homology in F14026		Protein homology in F13465		Found in the core genome
			Query cover (%)	ID%	Query cover (%)	ID%	
Nucleases	MHO_0730	CAX37207	97.8	41.3	97.8	41.0	NO
	MHO_0660	CAX37200	71.6	44.6	71.6	45.0	YES
MIB-MIP	MHO_3190	CAX37454	99.7	46.4	99.7	46.1	YES
	MHO_3200	CAX37455	99.4	45.9	99.4	45.9	YES
Proteins potentially involved in cytoadherence	<i>P60</i>	CAX37484	99.6	45.9	99.6	45.9	YES
	<i>P80</i>	CAX37485	99.4	55.2	99.4	55.0	YES
	<i>P120'</i>	CAX37515	100	49.6	100	49.6	YES
	<i>oppA</i>	CAX37285	99.4	42.9	99.4	42.5	YES

**Table 2** summarizes the virulence-associated proteins of *M. hominis* found in the two circularized genomes of *M. equirhina* (**Supplementary Table 4**). These virulence-associated proteins include the MHO\_0730 and MHO\_0660 nucleases that could play a role in escaping NETs or METs, and several other proteins involved in cytoadherence and one copy of MIB-MIP system. All the corresponding genes, as well as those encoding HlyA and Tuf, were found in the core genome, suggesting their wide distribution among isolates.



**Figure 4: Phylogenetic tree inferred from core-genome alignment of 24 *M. equirhinis* isolates.**

The phylogeny is midpoint rooted. Statistical support for branch were assessed using ultrafast bootstrap (1000 replicates). Two main clusters can be distinguished.

### **Diversity of the species**

The pangenome of the 24 *M. equirhinis* strains (22 French isolates in this study and two public sequences, namely Myco-7 and M432/72) comprised 508 core genes amounting to 582,641 nucleotides, and 278 accessory genes. A phylogenetic tree inferred from the core-genome alignment using the ML method counted 16,374 parsimony-informative sites, resulting in 12,581 distinct patterns. In the resulting mid-rooted tree with no outgroups (**Figure 4**), *M. equirhinis* isolates were split into two different branches with very strong bootstrap values (97 for both external branches). Despite their different geographic origins and dates of isolation, strains Myco-7 and M432/72 appeared to be closely related to French isolates. We were unable to identify a specific tree structure based on geographic origin, time of sampling, or horse characteristics. Two strains, i.e. F13414 and F13415, shared an identical core-genome composition despite originating from two remote regions (the Pays de la Loire in northwest France and Bourgogne-France-Comté in central-eastern France) and having no epidemiological links.

The MICs of the isolates were very homogeneous, with only a few cases of more than one dilution difference between two isolates for gentamicin and enrofloxacin (**Supplementary Table 1**). The MICs were low for oxytetracycline and enrofloxacin and within six-membered ring-structure aminocyclitols, and higher for streptomycin than for spectinomycin and gentamicin. We are unable to categorize our isolates on a susceptible–resistant gradient, as there are no available clinical breakpoints or ECOFFs for animal mycoplasmas. However, based on the interpretative criteria proposed by CASFM 2023 (<https://www.sfm-microbiologie.org/2023/06/15/casfm-veterinaire-2023>) for other bacterial genera colonizing the same niche, the isolates were mainly susceptible to enrofloxacin, oxytetracyclin and spectinomycin but resistant to streptomycin. The proportion of resistance to gentamicin was dependent on the genus used as benchmark reference (*Pasteurellaceae*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* spp.).



## Discussion

To our knowledge, this study is the first to propose an in-depth genomic characterization of *M. equirhinis*, an opportunistic species frequently isolated from horses with respiratory disorders (7). Two complete genome sequences from two *M. equirhinis* strains isolated in France were generated using a hybrid assembly approach, and then compared against the Myco-7 genome available in public databases. One outstanding feature is the overall high degree of sequence similarity between the three strains (>98.8% shared identity) and their conserved synteny. This contrasts with the picture for other mycoplasma species involved in bovine respiratory infections, such as *M. bovis* or *M. mycoides* subsp. *mycoides* (15,42), but is comparable to the picture for *M. pneumoniae* where there is over 99% identity between genomes (43). These results suggest clonality of the four isolates despite their different geographic origins. We identified only one large region (13.8 kbp) of genomic structural variation corresponding to the insertion of a prophage in both strain Myco-7 and strain F14026. This prophage is related to the prophage described in *M. arthritidis* (44). Another specific 11.3-kbp region was identified in strain Myco-7 but was not associated with any function (green box in [Figure 1](#)).

Another outstanding feature was the fact that one of the four genomes has four 16SrRNA copies whereas the other three have only three. This characteristic was unique in a panel of 90 PCR-screened strains and could correspond to a duplication event. An IS transposase related to the IS1634 family was detected in the genomes of Myco-7 and F14026 at roughly the same genomic location, suggesting a non-mobile vestigial IS that was consequently not associated with genome rearrangements.

The number of genomes analyzed was enlarged to 24 by including 20 additional scaffold-level genomes generated as part of this study. The 24 genomes share a core genome of 508 genes, representing 90%, 89%, 86% and 84% (F13465, M432/72, Myco-7 and F14026) of the four circularized genomes, respectively. Once again, this points to a high degree of between-genome similarity, with a reduced pool of accessory genes, in stark contrast to the picture in *M. hominis*, the closest phylogenetic neighbour, where the core genome represents only 55% of all genes (45). The homogeneity of the species was confirmed by inferring a phylogeny from the core-genome alignment. The resulting ML tree showed very short branches, and although the isolates were clustered into two subgroups, they were not particularly distant and did not relate to any specific clinical or geographic factors in the history of the isolates. To gain initial insight into the phenotypic diversity of the isolates, we performed AST assays that confirmed a homogeneous pattern of susceptibility across the 16 tested isolates. Nonetheless, the MICs for gentamicin were more variable, which may indicate a possible sub-selection of isolates in relation to antimicrobial use.

In this extended set of genomes, we also detected other MICE-type mobile genetic elements. A unique CDS, similar to the CDS1 of MICE-Ho I, was detected in 10 isolates, mainly in dissimilar gene contexts.

Furthermore a MICE similar to that of *M. arginini* (35) was identified in five strains, with a relatively significantly conserved gene backbone. While the *M. hominis*-like CDS1 can easily be considered a vestige from a common ancestor of the two (phylogenetically very close) species, the origin of the *M. arginini*-like MICE raises questions. Figure 3 shows some differences in CDS organization between the four MICE that suggest that these elements are under strong evolutionary pressure but could still be active, as their DDE transposase and the genes associated with the conjugative process are conserved. The IS transposase was detected in six genomes with identical adjacent genes, confirming loss of mobility and vertical inheritance of these elements. In the set of 24 isolates, the presence of the MEQV-1 prophage was limited to isolates F14026 and Myco-7, suggesting a low frequency of viral infections. The role of the detected CRISPR-Cas immune systems against this particular prophage invasion remains to be clarified (46).

All these mobile genetic elements are regularly identified within the *Mycoplasma* genus and are described as major contributors to genomic plasticity (47). In *M. equirhinis*, they were detected at low frequencies (25% of isolates harboured IS elements, 8% harboured prophages, and 25% harboured MICEs) compared to other species in the genus such as *M. bovis* and *M. hominis* (48,49). Even though these frequencies may be underestimated because most of the genomes were not circularized, this still stands as further evidence for low plasticity in *M. equirhinis* genomes.

Analysis of virulence genes revealed that *M. equirhinis* is equipped with cytoadherence and immune escape systems that are regularly reported in other species of the genus *Mycoplasma*. The repertoire of virulence-associated genes is very similar, albeit less extended, to that of *M. hominis*, confirming that *M. equirhinis*, like *M. hominis*, could be opportunistic. All these genes were found in the core genome of *M. equirhinis*, which again suggests homogeneous virulence. However, *in vitro* tests would be required to firmly conclude on the role of the associated proteins, especially in a context of co-infection. Indeed, any modulation of the immune response by *M. equirhinis* could be favourable to colonization by other pathogens such as *S. zooepidemicus*, with which there is a known positive association (9). If *M. equirhinis* shares a similarly opportunistic nature to *M. hominis* despite the different host species and body niches, then it would be important to set up diagnostic tools able to quantify *M. equirhinis* load at the site of infection, as already done for *M. hominis* (50).

### Conclusion

In-depth analysis of *M. equirhinis* genomes reveals a highly homogenous species, with only a few mobile genetic elements that potentially come from different origins but are not significantly associated to genome rearrangements. In terms of virulence potential, the core genome of the species harbours homologues of *M. hominis* genes that are mostly involved in cytoadherence or immune modulation. This genetic equipment is compatible with an opportunistic behaviour within its host.

Given this overall clonality of the *M. equirhinis* isolates, it would be of interest, from a clinical perspective, to i) develop tools to quantify the *M. equirhinis* load at the site of infection in order to confirm whether clinical signs are associated to high loads, and ii) to examine whether non-targeted antimicrobial use could drive the emergence of resistant variants.

## Author statements

### Author contributions

Matthieu MARTINEAU: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – Original draft.

Chloé AMBROSET: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – Original draft.

Stéphanie LEFEBVRE: Data curation, Formal analysis. Éléna KOKABI: Data curation, Formal analysis.

Albertine LÉON: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Visualization.

Florence TARDY: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Visualization, Writing – Original draft, Writing – Review and Editing.

### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Funding information

This work received financial support from the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation, grant number CS-2020-2023-022-MYCOPAB), the Fonds Eperon (grant number N15-2020), and the GIS (Groupement d'Intérêt Scientifique) CENTAURE (grant number GIS20-SEP-01).

### Ethical approval

No ethical approval required.

### Consent for publication

All authors consent to publication.

### Acknowledgements

We thank Sophie CASTAGNET and Agnès TRICOT for their help isolating and preserving the strains used in this study. We also thank Dr. Chervin HASSEL for his help with the genome deposition process.

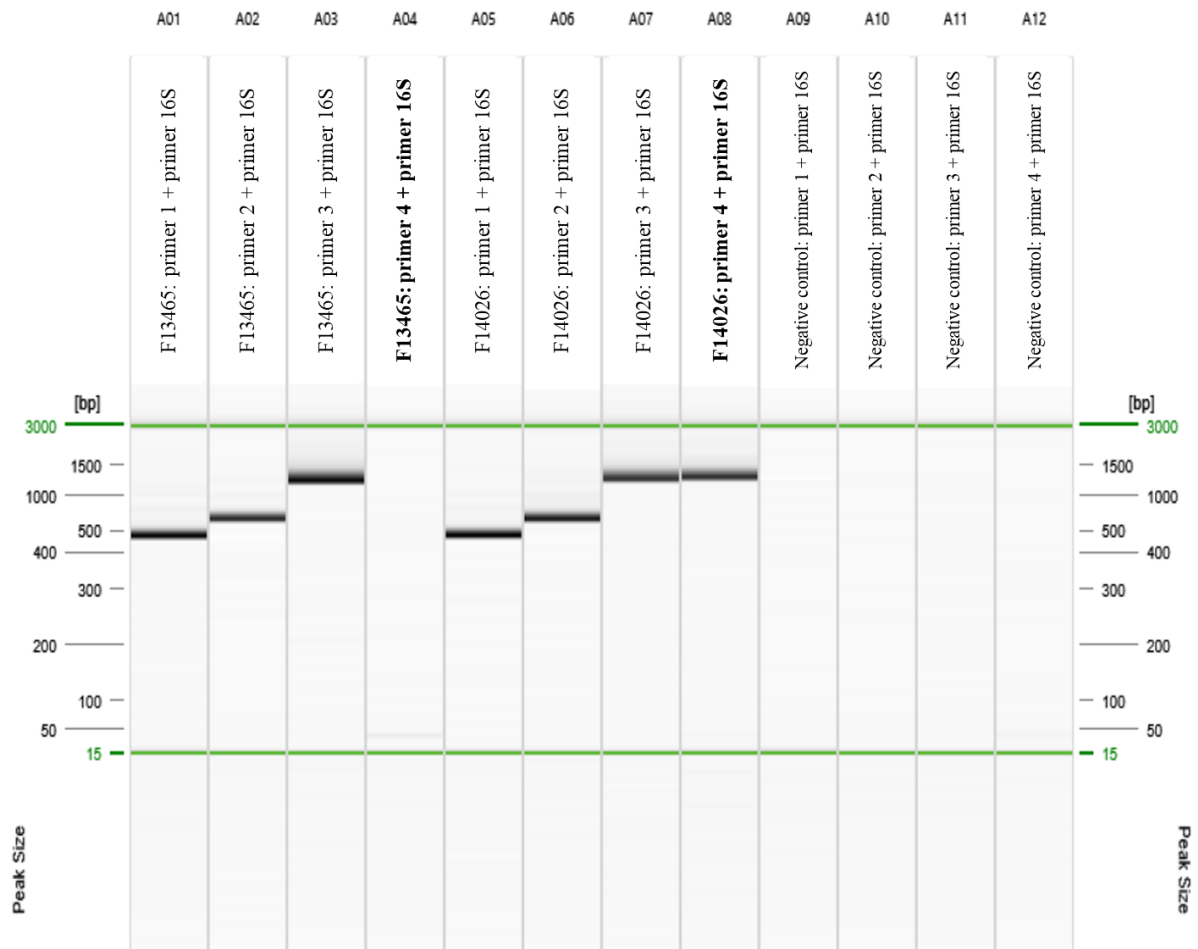
## References

1. Brown DR, May M, Bradbury JM, Balish MF. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [Internet]. 1st ed. Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, et al., Ed. Wiley; 2018. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608>
2. Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol.* 2004;33(1):2–13.
3. Kannan TR, Baseman JB. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 25;103(17):6724–9.
4. Yiwen C, Yueyue W, Lianmei Q, Cuiming Z, Xiaoxing Y. Infection strategies of mycoplasmas: Unraveling the panoply of virulence factors. *Virulence.* 2021;12(1):788–817.
5. Allam NM, Lemcke RM. Mycoplasmas isolated from the respiratory tract of horses. *J Hyg Camb.* 1975;74(3):29.
6. Hooker JM, Butler M. The development of complement-fixing antibody in horses after infection with *Mycoplasma equirhinis*. *J Comp Pathol.* 1977 Apr;87(2):281–6.
7. Wood JLN, Newton JR, Chanter N, Mumford JA. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):120–6.
8. Uchida-Fujii E, Kinoshita Y, Niwa H, Maeda T, Nukada T, Ueno T. High prevalence of *Mycoplasma equirhinis* in thoroughbred horses with respiratory symptoms in autumn 2018. *J Vet Med Sci.* 2021;83(12):1907–12.
9. Martineau M, Kokabi E, Taiebi A, Lefebvre S, Pradier S, Jaÿ M, et al. Epidemiology and pathogenicity of *M. equirhinis* in equine respiratory disorders. *Vet Microbiol.* 2023;287:109926.
10. Mete A, Özgür NY. Investigation of the presence of *Mycoplasma* as an etiologic agent of inflammatory airway diseases in thoroughbred racehorses in Istanbul Province. *Turkish J Vet Anim Sci.* 2017;(41):365–71.
11. Martineau M, Castagnet S, Kokabi E, Tricot A, Jaÿ M, Léon A, et al. Detection of *Mycoplasma* spp. in horses with respiratory disorders. *Equine Vet J.* 2023;55(5):747–54.
12. Gupta RS, Sawnani S, Adeolu M, Alnajar S, Oren A. Phylogenetic framework for the phylum Tenericutes based on genome sequence data: proposal for the creation of a new order *Mycoplasmoidales* ord. nov., containing two new families *Mycoplasmoidaceae* fam. nov. and *Metamycoplasmataceae* fam. nov. harbouring *Eperythrozoon*, *Ureaplasma* and five novel genera. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2018;111(9):1583–630.
13. Khalil D, Becker CAM, Tardy F. Monitoring the decrease in susceptibility to ribosomal RNAs targeting antimicrobials and its molecular basis in clinical *Mycoplasma bovis* isolates over time. *Microb Drug Resist.* 2017;23(6):799–811.
14. Jaÿ M, Poumarat F, Colin A, Tricot A, Tardy F. Addressing the antimicrobial resistance of ruminant Mycoplasmas using a clinical surveillance network. *Front Vet Sci.* 2021;8:667175.

15. Ambroset C, Peticca A, Tricot A, Tardy F. Genomic features of *Mycoplasma bovis* subtypes currently circulating in France. BMC Genomics. 2022;23(1):603.
16. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012;19(5):455–77.
17. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol. 2017;13(6):e1005595.
18. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014;30(14):2068–9.
19. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics. 2013;29(8):1072–5.
20. Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness. Methods Mol Biol. 2019;1962:227–45.
21. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nat Commun. 2018;9:5114.
22. Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res. 2004;14(7):1394–403.
23. Darling AE, Mau B, Perna NT. progressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. PLoS One. 2010;5(6):e11147.
24. Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Res. 2021;50(D1):D912–7.
25. Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Beven L, Charron A, Renaudin H, Barré A, et al. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. PLOS Genetics. 2009;5(10):e1000677.
26. Cacciotto C, Dessì D, Cubeddu T, Cocco AR, Pisano A, Tore G, et al. MHO\_0730 as a surface-exposed calcium-dependent nuclease of *Mycoplasma hominis* promoting neutrophil extracellular trap formation and escape. J Infect Dis. 2019;220(12):1999–2008.
27. Guiraud J, Le Roy C, Rideau F, Sirand-Pugnet P, Lartigue C, Bébéar C, et al. Improved transformation efficiency in *Mycoplasma hominis* enables disruption of the MIB–MIP system targeting human immunoglobulins. Microbiol Spectr. 2023;e01873-23.
28. Lysnyansky I, Sachse K, Rosenbusch R, Levisohn S, Yogev D. The *vsp* locus of *Mycoplasma bovis*: Gene organization and structural features. J Bacteriol. 1999;181(18):5734–41.
29. Xu QY, Pan Q, Wu Q, Xin JQ. *Mycoplasma bovis* adhesins and their target proteins. Front Immunol. 2022;13:1016641.
30. Gaurivaud P, Baranowski E, Pau-Roblot C, Sagné E, Citti C, Tardy F. *Mycoplasma agalactiae* secretion of  $\beta$ -(1→6)-glucan, a rare polysaccharide in prokaryotes, is governed by high-frequency phase variation. Appl Environ Microbiol. 2016;82(11):3370–83.

31. Xie Z, Tang H. ISEScan: automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes. *Bioinformatics*. 2017;33(21):3340–7.
32. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Database issue):D32–6.
33. Meygret A, Peuchant O, Dordet-Frisoni E, Sirand-Pugnet P, Citti C, Bébéar C, et al. High prevalence of integrative and conjugative elements encoding transcription activator-like effector repeats in *Mycoplasma hominis*. *Front Microbiol*. 2019;10:2385.
34. Henrich B, Hammerlage S, Scharf S, Haberhausen D, Fürnkranz U, Köhrer K, et al. Characterisation of mobile genetic elements in *Mycoplasma hominis* with the description of ICEHo-II, a variant mycoplasma integrative and conjugative element. *Mob DNA*. 2020;11:30.
35. Adeniji JA, Faleye TOC, Adewumi OM, Olayinka OA, Donbraye E, Oluremi B, et al. Draft genome sequence of *Mycoplasma arginini* strain NGR\_2017. *Genome Announc*. 2018;6(26):e00577-18.
36. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Web Server issue):W347-352.
37. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W16-21.
38. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 2015;10(6):845–58.
39. Tonkin-Hill G, MacAlasdair N, Ruis C, Weimann A, Horesh G, Lees JA, et al. Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biol*. 2020;21:180.
40. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol*. 2020;37(5):1530–4.
41. Harvey KL, Jarocki VM, Charles IG, Djordjevic SP. The diverse functional roles of elongation factor Tu (Ef-Tu) in microbial pathogenesis. *Front Microbiol*. 2019;10:2351.
42. Dupuy V, Manso-Silván L, Barbe V, Thebault P, Dordet-Frisoni E, Citti C, et al. Evolutionary history of contagious bovine pleuropneumonia using next generation sequencing of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* “small colony”. *PLoS One*. 2012;7(10):e46821.
43. Xiao L, Ptacek T, Osborne JD, Crabb DM, Simmons WL, Lefkowitz EJ, et al. Comparative genome analysis of *Mycoplasma pneumoniae*. *BMC Genomics*. 2015;16(1):610.
44. Voelker LL, Dybvig K. Characterization of the Lysogenic Bacteriophage MAV1 from *Mycoplasma arthritidis*. *J Bacteriol*. 1998 Nov;180(22):5928–31.
45. Jironkin A, Brown RJ, Underwood A, Chalker VJ, Spiller OB. Genomic determination of minimum multi-locus sequence typing schemas to represent the genomic phylogeny of *Mycoplasma hominis*. *BMC Genomics*. 2016;17(1):964.
46. Landsberger M, Gandon S, Meaden S, Rollie C, Chevallereau A, Chabas H, et al. Anti-CRISPR phages cooperate to overcome CRISPR-Cas immunity. *Cell*. 2018;174(4):908-916.e12.

47. Citti C, Baranowski E, Dordet-Frisoni E, Faucher M, Nouvel LX. Genomic islands in Mycoplasmas. *Genes*. 2020;11(8):836.
48. Citti C, Dordet-Frisoni E, Nouvel LX, Kuo CH, Baranowski E. Horizontal gene transfers in mycoplasmas (*Mollicutes*). *Curr Issues Mol Biol*. 2018;29:3–22.
49. Sirand-Pugnet P, Citti C, Barré A, Blanchard A. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res Microbiol*. 2007;158(10):754–66.
50. Férandon C, Peuchant O, Renaudin H, Bébéar C. Diversity of *Mycoplasma hominis* clinical isolates from Bordeaux, France, as assessed by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *BMC Microbiol*. 2013;13(1):120.



**SD1:** Enumeration of the number of genes encoding 16S rRNA in strains F13465 and F14026 visualised by migration of amplicons obtained by the four pairs of primers in QIAxcel. bp: base pair.



**ST1: Strains of the species *M. equirhinis* isolated in France, analysed during this study and results of antibiotic resistance tests.**

Identification number	Area/region of isolation	Isolate history		MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )				
		Year of isolation	Clinical signs	Oxytetracyclin	Streptomycin	Spectinomycin	Gentamicin	Enrofloxacin
F13414	Bourgogne-Franche-Comté	2020	Not known	$\leq 0.5$	$\geq 16$	$\leq 4$	$\leq 4$	$\leq 0.25$
F13415	Pays de la Loire	2020	Not known	$\leq 0.5$	$\geq 16$	$\leq 4$	2	$\leq 0.125$
<b>F13465</b>	<b>Hauts-de-France</b>	<b>2020</b>	<b>Dyspnoea, cough, nasal discharge, respiratory sound</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>
F13417	Île-de-France	2020	Dyspnoea, respiratory sound, cough during Tracheal Wash	$\leq 0.5$	$\geq 16$	$\leq 4$	$\leq 4$	$\leq 0.25$
F13936	Pays de la Loire	2021	Dyspnoea, cough, respiratory sound	nd	nd	nd	nd	nd
F13945	Corse	2021	Not known	$\leq 0.25$	$\geq 16$	$\leq 4$	$\leq 4$	$\leq 0.25$
F13947	Île-de-France	2021	Cough, nasal discharge, respiratory sound, hyperthermia	nd	nd	nd	nd	nd
F13948	Normandie	2021	Not known	$\leq 0.5$	$\geq 16$	$\leq 4$	2	$\leq 0.5$
F14022	Normandie	2020	Not known	$\leq 0.25$	$\geq 16$	$\leq 4$	2	$\leq 0.25$
F14024	Normandie	2020	Nasal discharge only	0.5	$\geq 16$	$\leq 4$	2	0.25
<b>F14026</b>	<b>Pays de la Loire</b>	<b>2020</b>	<b>Dyspnoea, hyperthermia</b>	<b><math>\leq 0.25</math></b>	<b><math>\geq 16</math></b>	<b><math>\leq 4</math></b>	<b><math>\leq 2</math></b>	<b><math>\leq 0.25</math></b>
F14027	Normandie	2020	Cough, respiratory sound	$\leq 0.5$	$\geq 16$	$\leq 4$	4	0.25
F14029	Pays de la Loire	2020	Cough, nasal discharge, respiratory sound, hyperthermia	nd	nd	nd	nd	nd
F14030	Île-de-France	2020	Dyspnoea, cough, respiratory sound	0.5	$\geq 16$	$\leq 4$	4	0.5
F14037	Normandie	2021	None	nd	nd	nd	nd	nd
F14345	Centre-Val de Loire	2021	Cough	$\leq 0.25$	$\geq 16$	$\leq 4$	$\leq 2$	$\leq 0.125$
F14346	Hauts-de-France	2021	Cough	0.5	$\geq 16$	$\leq 4$	$\leq 1$	$\leq 0.125$
F14348	Nouvelle-Aquitaine	2021	Not known	0.5	$\geq 16$	$\leq 4$	2	0.25
F14352	Pays de la Loire	2021	Nasal discharge only	nd	nd	nd	nd	nd
F14353	Auvergne-Rhône-Alpes	2021	Not known	0.5	$\geq 16$	$\leq 4$	4	0.25
F14358	Nouvelle-Aquitaine	2021	Not known	$\leq 0.25$	$\geq 16$	$\leq 4$	$\leq 2$	$\leq 0.125$
F14365	Bretagne	2021	Cough, nasal discharge, respiratory sound, hyperthermia	0.5	$\geq 16$	$\leq 4$	4	0.5

Strains in bold are those whose genomes have been circularised. MIC: Minimum Inhibitory Concentration ; nd : not determined.

**ST2: Sequencing and assembly of the circularised genomes of strains F13465 and F14026.**

<b>Isolate</b>	<b>F13465</b>	<b>F14026</b>	
<b>Illumina</b>	Reads length (bp)	2x150	2x150
	Reads numbers	1,115,773	994.716
	Coverage	233	208
	Source	iGenSeq platform*	iGenSeq platform*
	Platform	Novaseq	Novaseq
<b>ONT</b>	total read length (bp)	1,098,966,949	706,634,551
	Read number	56.319	40.940
	Coverage	1.528	982
	N50	27.719	28.478
	Source	PGTB**	PGTB**
<b>Assembly</b>	Minimum ONT read length (bp)	30.000	30.000
	Minimum quality base Q	14	14
	target coverage	100	100
	circularization	<b>yes</b>	<b>yes</b>
	No. of contigs	1	1
	Contig >=1000 pb	1	1
	Contig >=10000 pb	1	1
	Largest contig	691.532	738.996
	G+C%	28.1	28.2
Total length	691.532	738.996	
<b>Busco score</b> Complete and single-copie/complete and duplicated/fragmented/missing of (174)	174/0/0/0	172/2/0/0	

\* <https://institutducerveau-icm.org/fr/plateforme-igenseq/>

\*\* <https://pgtb.fr/>

**ST3: Primers and conditions for PCR amplification of 16S rRNA coding genes.**

Target	Primers		PCR cycle				
	Type	Sequence 5'-3'	Denaturation	Amplification cycle	Elongation	Condition	PCR product size (bp)
<b>16S rDNA 1st copy</b>	primer 16S	TATTCCTACTGCTGCCTCCC					517
	primer 1	AATAATAAATGAGGCGAGCAAGTGTTG					
<b>16S rDNA 2nd copy</b>	primer 16S	TATTCCTACTGCTGCCTCCC					664
	primer 2	AGTTGATGCTCCAAATAAATAAAGGTAATAAATTG		30 cycles 95°C for 10", 55°C for 30" and 72°C for 40"	72°C for 5'	I	
<b>16S rDNA 3rd copy</b>	primer 16S	TATTCCTACTGCTGCCTCCC	95°C for 10"				1324
	primer 3	ATTCGTTTTTAATCGTTATGGGTGATTTTG					
<b>16S rDNA 4th copy</b>	primer 16S	TATTCCTACTGCTGCCTCCC					1336
	primer 4	CTGTTTGTGCTTAATTGATTGTAAGTTGG					
<b>16S rDNA 4th copy</b>	primer 16S	TATTCCTACTGCTGCCTCCC		35 cycles 94°C for 30", 56°C for 30" and 72°C for 2'	72°C for 5'	II	1336
	primer 4	CTGTTTGTGCTTAATTGATTGTAAGTTGG	95°C for 2'				

Condition I: PCR volume: 25µL & Premix Ex Taq (Takara)

Condition II: PCR volume: 25µL & Go Taq (Promega)

Primer 5 is located at the 5' extremity of the 16SrRNA gene

**ST4: Virulence-associated genes researched in the genomes of *M. equirhinis*.**

System	Species	Gene /mnemonic	Accession number
<b>Nucleases</b>		MHO_0730	CAX37207
		MHO_0660	CAX37200
<b>MIB-MIP system</b>		MHO_3190	CAX37454
		MHO_3200	CAX37455
<b>Proteins potentially involved in cytoadherence</b>	<i>M. hominis</i>	<i>Imp1</i>	CAX37187
		MHO_0540	CAX37188
		<i>oppA</i>	CAX37285
		<i>Imp3</i>	CAX37298
		MHO_3070	CAX37442
		P75 related	CAX37445
		MHO_3110	CAX37446
		<i>Vaa</i>	CAX37482
		<i>P60</i>	CAX37484
		<i>P80</i>	CAX37485
		<i>P120</i>	CAX37501
		<i>P75</i>	CAX37507
		MHO_3730	CAX37508
		<i>P120'</i>	CAX37515
MHO_4280	CAX37563		
MHO_4920	CAX37627		
<b>Variable surface proteins</b>	<i>M. bovis</i>	<i>vspB</i>	AAD53523
		<i>vspE</i>	AAD53524
		<i>vspF</i>	AAD53525
		<i>vspG</i>	AAD53526
		<i>vspH</i>	AAD53527
		<i>vspI</i>	AAD53528
		<i>vspJ</i>	AAD53529
		<i>vspK</i>	AAD53530
		<i>vspL</i>	AAD53531
		<i>vspM</i>	AAD53532
		<i>vspN</i>	AAD53533
<i>vspO</i>	AAD53534		
<b>Biosynthesis of polysaccharides</b>	<i>M. agalactiae</i>	MAG4650	CAL59163.1
		MAG4580	CAL59156.1
		MAG4860	CAL59184.1
		MAG0570	CAL58754.1
		MAG3010	CAL58999.1
<b>CARDS toxin</b>	<i>M. pneumoniae</i>	EXC43_RS01830	ABE27146.1

MHO\_xxxx mnemonics refer to strain *M. hominis* ATCC 23114 ; MAGxxxx mnemonics refer to strain *M. agalactiae* PG2 ; mnemonic EXC43\_RS01830 refers to strain *M. pneumoniae* NCTC 10119. vsp: variable surface protein.

**STS: Results of the analysis of the backbone genes of the three MICE selected by BLASTn on the genomes of this study.**

CDS	ID number	F13414			F13415			F13947			F14022			F14026		
		contig name	Query coverage (%)	Identity (%)	contig name	Query coverage (%)	Identity (%)	contig name	Query coverage (%)	Identity (%)	contig name	Query coverage (%)	Identity (%)	contig name	Query coverage (%)	Identity (%)
CDS 1	M. hominis 4788 ICE-Ho I	3	95.83	69.6	3	95.8	70.1	2	95.8	69.9	3	89.4	69.6	/	95.8	69.9
	M. hominis ATCC 27545 ICE-Ho II															
	M. arginini NGR2017															
CDS 5	M. hominis 4788 ICE-Ho I				6	97.7	78.7				3	86.8	67.8			
	M. hominis 4788 ICE-Ho I															
	M. hominis ATCC 27545 ICE-Ho II				8	98.7	77.2				3	99.4	71.5			
CDS 17	M. hominis 4788 ICE-Ho I															
	M. hominis 4788 ICE-Ho I				7	99.3	76									
	M. hominis ATCC 27545 ICE-Ho II										3	100	65.7			
CDS 22	M. hominis 4788 ICE-Ho I															
	M. hominis ATCC 27545 ICE-Ho II															
	M. arginini NGR2017															

CDS	ID number	F14029			F14346			F14358			F14365			M432/72		
		contig	Query	Identity	contig	Query	Identity	contig	Query	Identity	contig	Query	Identity	contig name	Query	Identity
CDS 1	M. hominis 4788 ICE-Ho I	20	95.8	69.1	1	89.4	70	2	89.4	69.8	1	95.83	69.5	/	95.83	69.8
	M. hominis ATCC 27545 ICE-Ho II															
	M. arginini NGR2017															
CDS 5	M. hominis 4788 ICE-Ho I	41	45.9	66	1	86.8	67.4	2	86.8	67.6	1	86.8	67.4			
	M. hominis 4788 ICE-Ho I															
	M. hominis ATCC 27545 ICE-Ho II															
CDS 17	M. hominis 4788 ICE-Ho I															
	M. hominis ATCC 27545 ICE-Ho II	35 ; 61 ; 36	35.0 ; 20.3 ; 18.3	68.2 ; 70.5 ; 77.9	1	99.4	71.6	2	99.4	71.6	1	99.4	71.4			
	M. arginini NGR2017															
CDS 22	M. hominis 4788 ICE-Ho I															
	M. hominis ATCC 27545 ICE-Ho II															
	M. arginini NGR2017	45	69.5	67.3	1	90.6	66.2	2	100	65.9	1	100	66.2			

# **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---

## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

Le projet MYCOPAB a été initié, en 2020, dans le but de caractériser, en France, les espèces du genre *Mycoplasma* présentes dans le tractus respiratoire équin afin de déterminer leur implication clinique, cela suite à l'observation d'une prévalence par PCR de genre avoisinant les 15 % dans les échantillons reçus pour analyse à LABÉO entre 2014 et 2019. En effet, même si certaines études avaient déjà décrit la présence de ces bactéries dans les prélèvements respiratoires équins à travers le monde [Wood *et al.*, 2005 ; Mete and Özgür, 2017 ; Uchida-Fujii *et al.*, 2021], elles n'avaient pas abouti à déterminer leur rôle clinique, faute de standardisation des outils de détection, de différences marquées de prévalence entre les populations saines versus celles exprimant des signes cliniques et d'effectifs représentatifs.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous nous sommes attelés à proposer un outil de diagnostic standardisé et adapté pour la détection des bactéries du genre *Mycoplasma* dans des lavages respiratoires équins. Nous avons ainsi mis au point un protocole de culture et optimisé l'outil de détection par PCR temps-réel utilisé jusque-là. Les performances de cette PCR sont meilleures après un enrichissement du prélèvement initial en bouillon de culture *a minima* pendant quatre jours. Ce protocole d'analyse permet de détecter les espèces *M. equirhinis* et *M. felis* à moins de 1 CFU/mL et l'espèce *M. pulmonis* à 100 CFU/mL. La performance clinique de ces deux méthodes (culture et PCR), seules et combinées, a été évaluée sur un effectif de 616 échantillons (LT ou LBA) issus de chevaux suspectés de troubles respiratoires. Cent quatre prélèvements se sont avérés positifs au niveau du genre, soit une prévalence globale de 16,9 %, avec l'une des deux méthodes. Dans le détail, 98 échantillons étaient positifs par PCR, 47 par culture et 41 prélèvements positifs avec les deux méthodes. Un diagnostic mixte basé à la fois sur la culture et la PCR après enrichissement donne donc une meilleure sensibilité de détection des bactéries du genre *Mycoplasma* que chacune des deux méthodes prise individuellement, même si la sensibilité de la PCR reste supérieure à celle de la culture. Cette observation est confirmée dans une étude turque, où l'utilisation de la PCR seule a conduit à la détection de *Mycoplasma* spp. dans 59,5 % des prélèvements analysés alors que la culture n'a permis d'en détecter que 18 % [Mete and Özgür, 2017].

Dans notre étude, pour aller jusqu'à l'identification de l'espèce impliquée, l'ADN codant pour l'ARN 16S des échantillons positifs et des souches isolées a été séquencé par la technologie Sanger. En parallèle, des PCR spécifiques ciblant les espèces *M. equirhinis*, *M. pulmonis* ou *M. felis* ont été déployées. L'espèce *M. equirhinis* a été identifiée majoritairement dans 83 % de nos prélèvements positifs au genre *Mycoplasma*. Des pourcentages similaires de détection de *M. equirhinis* ont été

obtenus dans deux études anglaises (72 % et 70 %) et une japonaise (96 %) [Newton *et al.*, 2003 ; Cardwell *et al.*, 2013 ; Uchida-Fujii *et al.*, 2021]. Toutefois, lors de nos travaux, nous nous sommes attachés à caractériser en détail la sensibilité et la spécificité des méthodes utilisées afin d'écartier tout biais méthodologique ayant pu conduire à cette détection majoritaire de *M. equirhinis* [Martineau *et al.*, 2023].

Dans l'étude de Mete et Özgür, 67% des cas positifs par PCR n'ont pas pu être identifiés au niveau de l'espèce, probablement en raison d'un manque de sensibilité des méthodes d'identification [Mete and Özgür, 2017]. Dans notre étude, seulement 14 % des cas positifs en PCR n'ont pas pu être identifiés au niveau de l'espèce [Martineau *et al.*, 2023], la plupart du temps en raison de la présence simultanée de plusieurs espèces de mycoplasmes, brouillant la qualité du signal de séquençage Sanger. Ce pourcentage pourrait être réduit en associant d'autres PCR spécifiques d'espèces, comme c'est le cas pour l'identification des bactéries du genre *Mycoplasma* retrouvées chez les oiseaux migrateurs où le criblage simultané de quatre espèces par PCR spécifique est proposé [Sawicka-Durkalec *et al.*, 2022]. Dans notre cas, ces PCRs pourraient plus particulièrement cibler des espèces ubiquistes et sans conséquence clinique avérée telles que *M. arginini* [Moorthy and Spradbrow, 1976].

Notre étude a démontré que *M. equirhinis* est l'espèce mycoplasmique la plus régulièrement retrouvée au niveau de la sphère respiratoire profonde. Notre méthodologie pourrait être exploitée pour analyser d'autres types de prélèvement du cheval et notamment ceux issus de la sphère génitale où l'espèce *M. equirhinis* a d'ores et déjà été détectée [Spergser *et al.*, 2002]. Cela apporterait également une réponse quant au tropisme tissulaire exclusif ou non de *M. equirhinis*.

Dans la seconde partie de ce manuscrit et pour tenter de décrypter le rôle clinique de l'espèce *M. equirhinis*, le protocole mixte (culture et PCR) a été mené sur un effectif de 1948 échantillons reçus entre janvier 2020 et décembre 2022. *M. equirhinis* a été retrouvé dans 86 % des échantillons positifs pour le genre *Mycoplasma* par culture ou PCR, ce qui représente une prévalence de 13,7 %, confirmant nos premiers résultats.

Trois autres espèces, *M. lipophilum* (n = 2 ; 0,6 %), *M. felis* (n = 5 ; 1,6 %) et *M. pulmonis* (n = 7 ; 2 %) ont aussi été mises en évidence. Notre étude est la première à détecter *M. lipophilum* dans des prélèvements respiratoires équins. En effet, cette espèce est majoritairement identifiée dans la cavité buccale de l'homme et sa détection dans nos prélèvements résulte potentiellement d'une contamination par un opérateur [Brown *et al.*, 2018]. *M. lipophilum* a aussi été identifié chez le chat [Hartmann *et al.*, 2010]. Cet animal, souvent présent dans les écuries, pourrait être le vecteur de transmission de la souche au cheval.



L'espèce *M. felis* est un pathogène du chat, comme son nom l'indique, responsable d'infection respiratoire et de conjonctivite chez son hôte [Le Boedec *et al.*, 2017]. Chez le cheval, *M. felis* a été associé à des cas de pleuropneumonies, pour lesquels il était le seul microorganisme détecté dans les liquides pleuraux [Ogilvie *et al.*, 1983 ; Hoffman *et al.*, 1992]. Comme notre étude s'est concentrée sur les lavages respiratoires équin, nous n'avons pas pu observer cette association *M. felis* / plèvre. Toutefois, la mise en place de la recherche de *M. felis* spécifiquement dans le liquide pleural des chevaux atteints de pleuropneumonies, par les outils optimisés dans notre première étude, pourrait confirmer/infirmier cette relation espèce-maladie en France. Le rôle de *M. felis* dans les autres affections respiratoires chez le cheval reste encore incertain. Wood et collaborateurs ont associé *M. felis* à la présence d'une inflammation trachéale marquée, de mucus dans la trachée, et de toux chez 22 chevaux dans un centre d'entraînement en Angleterre. Cependant, cette étude avait majoritairement utilisé une détection indirecte, sérologique, et certains chevaux ne présentaient pas de signes cliniques [Wood *et al.*, 1997]. En 2003, l'étude de Newton et collaborateurs, toujours en Angleterre, avait montré une association significative entre la détection de *M. felis* par culture et la présence de signes cliniques respiratoires, en obtenant une prévalence de 8 % dans les cas cliniques et 1 % dans les cas contrôlés [Newton *et al.*, 2003]. Dans notre étude, une prévalence très faible (1.6 %) de cette espèce a été obtenue, en accord avec celle retrouvée en Turquie par PCR (1,8 %) et au Japon (1 %) par méthode culturale [Mete and Özgür, 2017 ; Uchida-Fujii *et al.*, 2021]. Le trop faible nombre de cas positifs dans notre étude et celles précédemment citées ne permet pas de corréler la présence de *M. felis* à des signes cliniques.

L'espèce *M. pulmonis* est un pathogène des voies respiratoires chez la souris et le rat [Davidson *et al.*, 1988]. L'espèce *M. pulmonis* a déjà été détectée dans les cavités nasales de chevaux [Allam and Lemcke, 1975] et pourrait être alors le résultat d'une transmission par ces rongeurs, régulièrement retrouvés dans les écuries. Notre étude est la première à détecter *M. pulmonis* dans les voies respiratoires profondes équin. Dans deux études anglaises [Newton *et al.*, 2003 ; Cardwell *et al.*, 2013], une espèce du genre *Mycoplasma* a été détectée (respectivement avec une prévalence de 5,4 % et 1,4 %), décrite comme capable de fermenter le glucose et n'étant ni *M. felis*, ni *M. equirhinis* par les méthodes d'identification employées par les auteurs. Rétrospectivement, vu que *M. pulmonis* est capable de fermenter le glucose [Brown *et al.*, 2018], ces cas pourraient donc être attribués à l'espèce *M. pulmonis* et ainsi suggérer que cette espèce peut coloniser le tractus respiratoire profond à partir d'une transmission « environnementale » par les rongeurs, comme dans notre étude. Cependant, dans notre cas, le nombre limité de cas positifs associé à une sensibilité cent fois moindre de notre PCR pour *M. pulmonis* (100 UFC/mL, contre 1 UFC/mL pour *M. equirhinis*) ne permet pas de conclure quant à l'impact clinique de cette potentielle colonisation des voies respiratoires inférieures.

Nous nous sommes donc rapidement concentrés par la suite sur l'espèce majoritaire, *M. equirhinis*, avec pour objectifs de déterminer les conditions dans lesquelles cette espèce est retrouvée afin de mettre en évidence de potentiel biais de détection et sinon de tenter d'évaluer son rôle clinique.

La première analyse globale de nos prélèvements a montré que l'espèce *M. equirhinis* était retrouvée sur tout le territoire national et plus souvent détectée dans les LT que dans les LBA [Martineau *et al.*, 2023]. Ce dernier résultat a été validé dans notre seconde étude sur un échantillonnage de 123 chevaux soumis simultanément à des prélèvements de LT et LBA. Ce taux de détection supérieur dans les LT peut s'expliquer par le fait que chez le cheval, la trachée est une partie du tractus respiratoire où s'accumule le mucus, décrit comme une matrice produite par le système immunitaire en réponse à la présence d'éléments exogènes et capable de retenir les bactéries. Cependant, les chevaux inclus dans notre étude, ne présentaient pas tous du mucus dans leur trachée (d'après les remontées des vétérinaires cliniciens), il pourrait donc être légitime de proposer un tropisme préférentiel de *M. equirhinis* pour la trachée plutôt que les bronches. En effet, si la porte d'entrée de *M. equirhinis* dans les voies respiratoires est certainement les nasaux [Allam and Lemcke, 1975], il serait intéressant d'étudier l'efficacité de la colonisation des voies profondes (trachées et bronches) en comparant les taux de positivité en différents points du tractus (supérieur et inférieur). Ceci nous permettrait de conclure sur le tropisme préférentiel de *M. equirhinis*. On peut imaginer que *M. equirhinis* pourrait, comme cela a été montré pour *M. bovis*, être un commensal des voies respiratoires supérieures et passer, à la faveur d'un stress, dans les voies respiratoires profondes et y causer des lésions [Perez-Casal, 2020]. Pour tenir compte de la différence de détection et d'un rôle potentiellement différencié de *M. equirhinis* dans les LT ou les LBA, nous avons par la suite examiné nos résultats de façon indépendante sur ces deux types de prélèvements.

Pour préciser le rôle de *M. equirhinis*, un score clinique cumulatif et pondéré, basé sur les quatre principaux signes cliniques relatifs à un désordre respiratoire chez le cheval que sont la toux, le jetage, la dyspnée et l'hyperthermie [Reuss and Giguère, 2015 ; Pusterla *et al.*, 2022], a été conçu pour distinguer les chevaux de la population d'étude selon une même gradation des signes cliniques observés par différents praticiens. L'utilisation de ce score clinique établi à partir seulement de quatre signes cliniques est bien entendu discutable, car il ne prend pas en compte l'entièreté du tableau clinique rapporté par le vétérinaire. Toutefois, il nous fallait trouver un moyen harmonisé, en accord avec notre problématique clinique, d'exploiter les données collectées sur 1764 chevaux et par environ 400 vétérinaires sur trois années, tout en lissant leur différence subjective d'évaluation. Avec les critères d'analyse retenus, le score clinique n'a pu être calculé que pour 1245 cas parmi les 1948 inclus initialement. En effet, sur plus de 700 cas, un ou plusieurs des quatre critères retenus n'avai(en)t pas

été renseigné(s). Cette observation montre l'intérêt de rappeler aux vétérinaires que bien que contraignant, un remplissage exhaustif des fiches commémoratives peut être un atout pour la recherche équine.

Avant d'être utilisé vis-à-vis de *M. equirhinis*, ce score clinique a d'abord été validé sur les bactéries dont le statut pathogène primaire (*R. equi* chez les jeunes poulains) ou opportuniste (*S. zooepidemicus*) est reconnu [Waller, 2014 ; Bordin *et al.*, 2022]. Avec un taux de détection quasi constant quel que soit le score clinique, l'espèce *M. equirhinis* se comporte comme un commensal (LT) voire comme un pathogène opportuniste (LT et LBA).

Notre score clinique a été défini pour tenir compte des signes cliniques les plus fréquemment rapportés dans les affections respiratoires équines dans leur ensemble. Parmi ces signes, l'hyperthermie a reçu un score supérieur dans la mesure où elle était la seule à signifier une infection par un agent pathogène contrairement à la toux ou à la dyspnée, deux signes retrouvés aussi bien dans des infections que dans d'autres syndromes respiratoires, comme l'asthme [Reuss and Giguère, 2015 ; Couetil *et al.*, 2020]. Plusieurs études ont montré que des agents microbiens étaient identifiés dans des cas d'asthme sans pour autant qu'ils en soient les agents étiologiques, l'asthme n'étant pas un syndrome infectieux [Chapman *et al.*, 2000 ; Dauvillier *et al.*, 2019 ; Houtsma *et al.*, 2015]. L'asthme est, par ailleurs, de plus en plus, considéré aujourd'hui, comme potentiellement associé à des modifications du microbiote bactérien respiratoire chez le cheval [Bond *et al.* 2017]. Ainsi la frontière entre infections et affections chez le cheval n'est pas évidente et notre score clinique quoique construit pour explorer davantage les infections (et donc rechercher le pouvoir pathogène de *M. equirhinis*) reflète également d'autres syndromes non-infectieux. Il est par ailleurs accepté que le caractère délétère des mycoplasmes vis-à-vis de leur hôte tient davantage à une réaction immunitaire exacerbée et inappropriée de l'hôte qu'à une réelle pathogénicité du mycoplasme [Casadevall and Pirofski, 1999]. Ainsi, on peut faire l'hypothèse d'une potentielle association de *M. equirhinis* à de l'asthme équin comme cela avait déjà été suspecté lors d'une étude longitudinale en Angleterre portant sur des chevaux de courses [Wood *et al.*, 2005]. L'étude d'Uchida-Fujii et collaborateurs, ayant associé *M. equirhinis* à de nombreux cas de toux chez des chevaux de courses dans un centre d'entraînement [Uchida-Fujii *et al.*, 2021], ne contredit en rien cette hypothèse puisque la toux est un des signes principaux de l'asthme. Aussi pour aller au-delà de ce score clinique, nous avons recherché de potentiels facteurs de risque et biais associés à la détection de *M. equirhinis* parmi les données pertinentes concernant les chevaux (e.g. : race, âge, lieux de vie) et celles issues des prélèvements associés (e.g. : taux de neutrophiles, autres agents pathogènes détectés). Toutes les variables ont été catégorisées pour faciliter l'étude statistique, soit en accord avec la littérature (e.g. taux de

neutrophile), soit pour conserver un nombre minimum de prélèvements par catégorie tout en gardant une cohérence biologique.

Les chevaux analysés dans notre étude sont de races variées et non exclusivement de races de course (trotteur et pur-sang), comme cela avait été le cas dans les études déjà publiées [Wood *et al.*, 2005 ; Cardwell *et al.*, 2013 ; Mete and Özgür, 2017 ; Uchida-Fujii *et al.*, 2021]. Afin de savoir si cette population (chevaux de race de courses) est plus à risque pour la détection de *M. equirhinis*, le paramètre "race" a été catégorisé en "chevaux de course" et "autres races". L'association entre les différentes variables (dont la race) et le paramètre "présence de *M. equirhinis*" a été analysée en utilisant un modèle de régression logistique multivariée par type de prélèvement (LT ou LBA). Elle a montré que dans les LT, la présence de *M. equirhinis* était significativement associée à la race du cheval (OR = 1,7) et à son lieu de vie (OR = 2,1). Pour les LBA, une association significative a été calculée entre la présence de *M. equirhinis* et les chevaux de course (OR = 2.8). Notre étude est tout de même la première à démontrer la présence de *M. equirhinis* chez les chevaux de races autres que celles de course avec des prévalences certes moindres (LT ; 15,4 % et LBA ; 5,5 % versus 20,1 % et 15,3 %) mais non négligeables. Les résultats d'association concernant les chevaux de races de courses sont cependant à interpréter avec prudence. En effet, ces chevaux sont aujourd'hui les plus surveillés cliniquement en raison de leur valeur économique et de l'importance que revêt leur condition physique lors de compétitions. De plus, lors d'événements compétitifs, ces chevaux sont regroupés et donc en contact avec d'autres individus susceptibles de les contaminer. Cette hypothèse coïncide également avec la plus forte détection de *M. equirhinis* dans les LT provenant de chevaux vivant en box, c'est-à-dire un environnement peu ventilé où plusieurs individus sont réunis. Cela a été le cas lors de l'épizootie de EHV-1, à Valence, en 2021, où la proximité trop étroite des individus couplée à des mesures d'hygiène nettement améliorables ont provoqué une large propagation du virus [Couroucé *et al.*, 2023]. En outre, la vie en box peut engendrer une forte concentration en poussière dans l'environnement de l'animal, pouvant entraîner une réaction inflammatoire chez le cheval [Couetil *et al.*, 2016], qui pourrait être favorable à l'implantation de *M. equirhinis*. En effet, dans les LBA, *M. equirhinis* a été exclusivement détecté dans les prélèvements présentant un taux de neutrophiles « anormalement élevé ». Enfin, en course, les chevaux sont amenés à mettre leur système respiratoire à rude épreuve en inspirant des quantités importantes d'oxygène en même temps que d'autres micro-organismes et en un temps réduit [Mazan, 2022].

L'ensemble de ces éléments converge vers un statut de pathogène opportuniste de *M. equirhinis*, comme actuellement décrit dans le manuel de Bergey [Brown *et al.*, 2018], ou vers son implication dans l'asthme, deux hypothèses régulièrement avancées mais non démontrées scientifiquement jusque-là.

Les outils de détection tels que mis au point dans la première partie de ce travail de recherche restent qualitatifs, en raison de la nécessaire étape de pré-enrichissement en bouillon de culture des prélèvements initiaux. Pour aller plus loin dans la caractérisation du rôle d'opportuniste de *M. equirhinis*, il serait judicieux d'envisager une quantification de sa charge bactérienne dans le prélèvement initial, comme cela est réalisé pour les autres bactéries opportunistes du tractus respiratoire équin par méthode culturale [Léon *et al.*, 2020]. C'est une démarche que nous avons pu initier dans le cadre de cette thèse. Le gène *rpoB* a été retenu comme cible en raison de sa stabilité intra-espèce [Adékambi *et al.*, 2009]. Les amorces et la sonde ont donc été conçues et validées *in silico* sur les séquences consensus obtenus des 22 souches séquencées (Chapitre 3 de ce mémoire) et des données disponibles sur la base de données NCBI. Elles ont été testées *in vitro* sur des extraits d'acides nucléiques de souches pures, et montrent une excellente spécificité, sans permettre l'amplification d'espèces proches génétiquement de *M. equirhinis* (e.g : *M. canadense*, *M. hominis*) ni d'espèces de la même niche physiologique (e.g : *M. pulmonis*, *M. felis*). La limite de quantification de cette qPCR a été calculée à 8 copies/ $\mu$ L. Actuellement, l'extraction d'ADN à partir des prélèvements initiaux est en cours d'optimisation, car des échantillons, connus positifs à *M. equirhinis* après enrichissement, ne sont pas détectés. Ces constatations illustrent clairement le défi technologique lié à la détection de *M. equirhinis* dans les prélèvements initiaux, comme nous l'avons déjà noté dans notre première étude, avec une sensibilité de 10 000 CFU/mL directement à partir de l'échantillon [Martineau *et al.*, 2023]. Mete et Özgür ont également rencontré des difficultés à détecter cette espèce par PCR en obtenant un meilleur taux de détection par culture bactérienne [Mete and Özgür, 2017]. Notre développement devra donc être poursuivi pour déterminer à terme une "charge bactérienne seuil" au-dessus de laquelle *M. equirhinis* serait impliqué, sans doute, dans les signes cliniques observés. Très récemment, Kinoshita et collaborateurs ont publié les premiers résultats d'une PCR quantitative à même de quantifier l'espèce *M. equirhinis* à partir de lavages trachéaux [Kinoshita *et al.*, 2023]. Il nous faudra bien sûr tenir compte de ces derniers développements.

Afin d'explorer l'association entre la détection *M. equirhinis* et d'autres micro-organismes d'intérêt identifiés dans les lavages respiratoires chez le cheval, nos résultats relatifs à la détection qualitative de *M. equirhinis* ont été confrontés à ceux obtenus pour les autres microorganismes dans le cadre du diagnostic de routine réalisé à LABÉO. Nous avons observé une prévalence augmentée de l'espèce *M. equirhinis* en présence d'agents infectieux tels que *S. zooepidemicus*, *Actinobacillus equuli* et EHV-5. Notre étude est la première à montrer une association positive entre *M. equirhinis* et *S. zooepidemicus* d'une part, et entre *M. equirhinis* et EHV-5 d'autre part. La détection conjointe de *M. equirhinis* et *Actinobacillus* spp. avait, quant à elle, déjà été observée dans l'étude de Wood et collaborateurs [Wood *et al.*, 2005].

L'apparition de certaines affections respiratoires chez le cheval comme l'asthme ou la pneumonie peuvent être associés à la présence de plusieurs micro-organismes [Reuss and Giguère, 2015 ; Bond *et al.*, 2023]. Il est donc supposé que, comme pour les espèces *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* ou *M. cynos*, le rôle de *M. equirhinis* soit lié à d'autres micro-organismes au sein d'un complexe respiratoire, ici, équin (CRE) [Mitchell *et al.*, 2017 ; Saade *et al.*, 2020 ; Bell *et al.*, 2021 ; Mach *et al.*, 2021]. Le rôle clinique de *M. equirhinis* n'est donc sûrement pas lié uniquement à la réponse immunitaire de l'hôte, mais aussi à des interactions avec certains micro-organismes de la flore respiratoire, en promouvant par exemple leur colonisation et en contraignant le système immunitaire à faire face à un ensemble de menaces simultanées. Pour explorer cette hypothèse, une analyse du microbiote respiratoire équin telle que celle décrite par Bond et collaborateurs [Bond *et al.*, 2017] serait à envisager, mais en utilisant les outils de séquençage de dernière génération. En effet, Bond et collaborateurs ont travaillé avec la technologie "short-read" Illumina ciblant les régions V3 et V4 du 16S (« métabarcoding ») et ont montré, par une approche globale, les variations de genre et famille bactérienne au sein du microbiote respiratoire dans un contexte d'asthme modéré. Cependant, cette analyse n'a permis ni de descendre au niveau de précision des espèces bactériennes retrouvées, ni de conclure sur l'étiologie des signes cliniques observés. L'utilisation des technologies de séquençage haut débit de dernière génération (ex : Oxford Nanopore / long-read), voire une approche de métagénomique shotgun, permet d'envisager des analyses plus précises du microbiote respiratoire du cheval, des espèces microbiennes mises en évidence et de leurs interactions, au regard des résultats présentés dans ce manuscrit [Mostafa *et al.*, 2020].

Également, l'analyse de la formation de biofilm par *M. equirhinis* pourrait être une piste d'investigation prometteuse au regard de l'implication de ce mode de vie communautaire dans les infections chroniques, telles qu'observées par exemple chez *M. hyopneumoniae* au sein du complexe respiratoire porcin [Tassew *et al.*, 2017]. Des expériences, réalisées à l'aide de technologies innovantes (Bioflux, Impédancemétrie, microscopie 3D) à LABÉO, ont déjà permis de caractériser les biofilms formés par les espèces *Pseudomonas aeruginosa* [Pottier, 2023], *S. equi* et *S. zooepidemicus* [Léon *et al.*, 2023]. Ces méthodes pourraient être appliquées pour caractériser les biofilms produits par *M. equirhinis* voire par les associations de *M. equirhinis* avec *S. zooepidemicus*, EHV-5 et *Actinobacillus equuli*.

Après avoir démontré le caractère opportuniste de *M. equirhinis*, nous avons, dans une troisième partie, approfondi l'étude de cette espèce à travers des analyses de génomique comparative.

La diversité génomique a été analysée après séquençage complet des génomes de 22 souches de *M. equirhinis*, parmi 136 isolées entre 2020 et 2022. Les génomes de deux d'entre elles (F14026 et

F13465) ont également été circularisés par séquençage hybride (short-read et long-read). Ces génomes circularisés ont été comparés aux deux seuls autres disponibles dans les banques de données, le génome de la souche Myco-7 issue d'un cheval déclaré malade (sans plus de renseignement) au Japon et celui de la souche M432/72 (NCTC 10148). Les quatre génomes se sont avérés très homogènes aussi bien en termes d'identité nucléotidique que de synténie. L'analyse de la diversité et la recherche d'éléments génétiques mobiles ainsi que de gènes associés à la virulence ont été effectuées *in silico* à partir des données génomiques générées dans ce projet de recherche et de ceux disponibles sur la base de données NCBI (Myco-7 et M432/72).

Pour les IS, seule une transposase a été identifiée chez six souches de *M. equirhinis*. Sa position identique dans les génomes présuppose que l'IS n'est plus mobile et qu'il est le produit d'un transfert vertical. Cinq souches de notre panel arborent un MICE relativement proche de celui découvert chez l'espèce *M. arginini*, questionnant l'origine de cet élément [Adeniji *et al.*, 2018]. Il est nécessaire de réaliser de futures expériences de conjugaison *in vitro* entre une souche de *M. equirhinis* porteuse d'un MICE et une souche qui en est dépourvue afin d'observer l'apparition potentielle de transconjugants. Ces expériences serviront à démontrer la fonctionnalité du MICE identifié chez *M. equirhinis*, sur le modèle de ce qui a été fait chez *M. agalactiae* [Dordet-Frisoni *et al.*, 2013].

Nous avons également identifié un prophage dans le génome de la souche Myco-7 déjà disponible et dans celui de la souche F14026 nouvellement séquencée. Sa caractérisation montre qu'il est proche de celui de l'espèce *M. arthritidis* (MAV1) par sa taille, l'orientation de ses gènes et sa relative proximité génétique. La faible prévalence de ce prophage dans notre panel questionne sur une infection probablement ancienne et une capacité de protection aujourd'hui acquise par *M. equirhinis*. L'analyse des systèmes CRISPR-Cas 9, « le système immunitaire bactérien », identifiés dans les génomes circularisés des souches françaises pourrait permettre de conclure sur cette potentielle résistance à l'infection [Ipoutcha *et al.*, 2009].

Tous ces éléments génétiques mobiles sont régulièrement identifiés au sein des bactéries du genre *Mycoplasma* et contribuent à leur plasticité génomique [Citti *et al.*, 2020]. Chez *M. equirhinis*, ces éléments ont été moins souvent identifiés que dans certaines espèces telles que *M. bovis* ou *M. hominis* [Sirand-Pugnet *et al.*, 2007 ; Citti *et al.*, 2018]. En étudiant majoritairement des génomes non-circularisés, la proportion de ces éléments génétiques mobiles a pu être sous-estimée. Quoi qu'il en soit, ce faible taux de détection est en accord avec la faible plasticité des génomes de *M. equirhinis*.

La diversité des souches de *M. equirhinis* a pu être étudiée par analyse du génome cœur des génomes séquencés dans ce projet, et de ceux disponibles sur la base de données NCBI. Ces analyses montrent une espèce homogène, avec la présence de deux sous-groupes peu éloignés, dont aucun n'a

pu être associé à des signes cliniques respiratoires plus marqués. Une autre preuve de l'homogénéité de *M. equirhinis* réside dans la proximité génomique obtenue entre les souches françaises et étrangères.

Une analyse des gènes associés à la virulence de *M. equirhinis* a été réalisée par comparaison de ceux décrits dans la base de données VFDB, regroupant les gènes de virulence de multiples espèces bactériennes dont certaines du genre *Mycoplasma*, et ceux d'espèces d'intérêts (e.g. *M. bovis*, *M. hominis*) non représentés dans la première banque [Pereyre *et al.*, 2013 ; Cacciotto *et al.*, 2019 ; Liu *et al.*, 2021]. *M. equirhinis* possède un panel de gènes associés à la cyto-adhérence et à l'échappement du système immunitaire assez similaire à l'espèce *M. hominis*, son plus proche voisin phylogénétique au sein du « cluster » hominis ou du nouveau genre *Metamycoplasma* [Gupta *et al.*, 2018]. De plus, *M. hominis* est un pathogène opportuniste des voies urogénitales chez l'Homme [Freundt, 1983]. Ces gènes, exclusivement retrouvés dans le génome cœur, ne permettent pas de séparer nos souches par leur virulence potentielle, mais ajoute un élément en faveur du rôle d'opportuniste de *M. equirhinis*, dont les possibilités de colonisation et de modulation du système immunitaire semblent intrinsèques et conservées. L'action de certaines protéines codées par ces gènes, si elles sont avérées par des tests fonctionnels, pourrait être favorable à la colonisation d'autres microorganismes du CRE (e.g. : *S. zooepidemicus*), par exemple la dégradation des NETs (Neutrophil Extracellular Traps) ou METs (Macrophage Extracellular Traps) par les nucléases, et expliquer les associations que nous avons pu observer. L'homogénéité de l'espèce *M. equirhinis* et la présence de potentiels gènes associés à sa virulence confirment l'intérêt du développement d'un outil de diagnostic spécifique quantitatif, capable de mesurer sa charge dans les prélèvements respiratoires équin, pour permettre un nouveau regard sur son implication clinique [Kinoshita *et al.*, 2023].

La diversité phénotypique de notre panel restreint n'a pas été évaluée par des tests biochimiques, car d'une part les bactéries du genre *Mycoplasma* possèdent trop peu de voies de synthèse pour permettre une caractérisation fine [Pollack *et al.*, 1983], et d'autre part, nos résultats génomiques démontrent une forte homogénéité de nos souches que ces tests biochimiques n'auraient sûrement pas pu différencier.

La diversité phénotypique a donc été évaluée en déterminant le profil de résistance, à cinq molécules, de trois classes d'antibiotiques d'intérêts en médecine vétérinaire [Léon *et al.*, 2020], sur 16 souches parmi les 22 séquencées. Cette analyse a confirmé l'homogénéité de nos souches avec des différences de CMI minimales, obtenus par méthode de dilution en gélose. Malgré tout, une variation est observée pour les CMI de la gentamicine montrant une potentielle adaptation progressive de *M. equirhinis* à cette molécule. L'étude de la résistance aux antibiotiques est devenue une étape



importante de la caractérisation de bactérie du genre *Mycoplasma* au vu de la problématique que représentent des espèces devenues multirésistantes comme *M. bovis* chez les bovins ou *M. genitalium*, agent sexuellement transmissible chez l'homme [Gautier-Bouchardon, 2018 ; Jensen *et al.*, 2016].

En l'absence de seuils cliniques pour les bactéries du genre *Mycoplasma* en médecine vétérinaire, les CMI obtenus ont été comparées aux seuils cliniques proposés, en 2023, par le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM), pour la famille des *Pasteurellaceae* comme il est actuellement d'usage pour *Mycoplasma bovis* vu qu'elle partage la même niche (tractus respiratoire) [Jaÿ *et al.*, 2021]. Les *Pasteurellaceae* étant également détectées dans les prélèvements respiratoires équins [Wood *et al.*, 1993 ; Payette *et al.*, 2021], la même démarche a été utilisée. En cas de suspicion d'une infection respiratoire chez le cheval due à des mycoplasmes, les vétérinaires traitent le plus souvent à l'aide de molécules de la classe des tétracyclines [Poulain, 2017]. Les CMI obtenus pour l'oxytétracycline, aux seuils des *Pasteurellaceae*, indiquent que *M. equirhinis* serait sensible à cette classe d'antibiotique, ce qui conforte l'utilisation de ces molécules sur le terrain. Cependant, certaines souches en comparaison des *Pasteurellaceae* dépassent le seuil clinique de sensibilité intermédiaire pour la gentamicine. L'isolement de quelques souches par an et l'analyse de leur profil d'antibiorésistance pourraient permettre d'observer une acquisition de résistance à la gentamicine pour *M. equirhinis*.

# CONCLUSIONS

---

## CONCLUSIONS

---

Le projet MYCOPAB a permis de valider des outils de détection sensibles et spécifiques pour les bactéries du genre *Mycoplasma* à partir de prélèvements respiratoires équins. Des outils d'identification à l'espèce nous ont également conduit, pour la première fois en France, à montrer la présence majoritaire de l'espèce *M. equirhina*. Nous avons pu confirmer le statut opportuniste de cette espèce à travers l'établissement d'un score clinique. Les génomes des différents isolats se sont avérés très homogènes, suggérant leur clonalité malgré une « colonisation » par des éléments génétiques mobiles variable d'un isolat à l'autre. L'équipement en gènes de virulence de *M. equirhina*, comparable à celui d'un pathogène opportuniste de l'Homme, *M. hominis*, confirme le fait que *M. equirhina* n'est pas un pathogène primaire. L'importance clinique de cette espèce réside, sans doute, dans son association à d'autres agents microbiens, au sein d'un complexe respiratoire équin, équivalent à ce qui a été décrit chez le porc ou les bovins [Saade *et al.*, 2020 ; Bell *et al.*, 2021]. L'analyse du microbiote respiratoire équin permettra de conclure sur la nature des interactions entre *M. equirhina* et les autres agents de ce complexe. La recherche de *M. equirhina*, à l'aide d'outil quantitatif, doit être incluse dans le diagnostic différentiel des affections respiratoires du cheval, pour la plupart multifactoriel.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Adeniji, J.A., Faleye, T.O.C., Adewumi, O.M., Olayinka, O.A., Donbraye, E., Oluremi, B., George, U.E., Arowolo, O.A., Omoruyi, E.C., Ifeorah, M.I., Akande, A., 2018. Draft genome sequence of *Mycoplasma arginini* strain NGR\_2017. *Genome Announc.* 6, e00577-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00577-18>
- Ainsworth, D.M., Hackett, R.P., 2004. Chapter 7 - Disorders of the respiratory system, in: *Equine Internal Medicine*. pp. 289–353. <https://doi.org/10.1016/B0-72-169777-1/50009-3>
- Allam, N.M., Lemcke, R.M., 1975. Mycoplasmas isolated from the respiratory tract of horses. *J. Hyg. Camb.* 74, 29. <https://doi.org/10.1017/s0022172400046908>
- Allen, J.W., Viel, L., Bateman, K.G., Rosendal, S., Shewen, P.E., 1992. Cytological findings in bronchoalveolar lavage fluid from feedlot calves: associations with pulmonary microbial flora. *Can. J. Vet. Res.* 56, 122–126. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1263519/>
- Amat, J.P., Vergne, T., Tapprest, J., Ferry, B., Hans, A., Hendrikx, P., Dufour, B., Leblond, A., 2016. Estimating the incidence of equine viral arteritis and the sensitivity of its surveillance in the French breeding stock. *Vet. Microbiol.* 192, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.06.010>
- Ambroset, C., Peticca, A., Tricot, A., Tardy, F., 2022. Genomic features of *Mycoplasma bovis* subtypes currently circulating in France. *BMC Genomics* 23, 603. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08818-9>
- Andersson, A.-M., Aspán, A., Wisselink, H.J., Smid, B., Ridley, A., Pelkonen, S., Autio, T., Lauritsen, K.T., Kensø, J., Gaurivaud, P., Tardy, F., 2019. A European inter-laboratory trial to evaluate the performance of three serological methods for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle using latent class analysis. *BMC Vet. Res.* 15, 369. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2117-0>
- Antal, T., Szabó, I., Antal, V., Vajda, G., Polner, A., Totth, B., Szollár, I., Stipkovits, L., 1988. Respiratory disease of horses associated with *Mycoplasma* infection. *J. Vet. Med.* 35, 264–270. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1988.tb00496.x>
- Anyika, K.C., Okaiyeto, S.O., Sackey, A.K.B., Kwanashie, C.N., Luka, P.D., Ankeli, P.I., 2021. Isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in cattle from south-east Nigeria. *Open Vet. J.* 11, 174–179. <https://doi.org/10.4314/ovj.v11i1.25>
- Arahal, D.R., Busse, H.-J., Bull, C.T., Christensen, H., Chuvochina, M., Dedysh, S.N., Fournier, P.-E., Konstantinidis, K.T., Parker, C.T., Rossello-Mora, R., Ventosa, A., Göker, M., 2022. Judicial Opinions 112–122. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 72, 005481. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005481>
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., Wishart, D.S., 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 44, W16-21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
- Ataseven, V.S., Oğuzoğlu, T.Ç., Başaran-Karapınar, Z., Bilge-Dağalp, S., 2012. First genetic characterization of equine adenovirus type 1 (EAdV-1) in Turkey. *Res. Vet. Sci.* 92, 324–326. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.03.001>
- Baby, V., Ambroset, C., Gaurivaud, P., Falquet, L., Boury, C., Guichoux, E., Jores, J., Lartigue, C., Tardy, F., Sirand-Pugnet, P., 2023. Comparative genomics of *Mycoplasma feriruminatoris*, a fast-growing pathogen of wild *Caprinae*. <https://doi.org/10.1101/2023.03.21.533155>

- Back, H., Ullman, K., Treiberg Berndtsson, L., Riihimäki, M., Penell, J., Ståhl, K., Valarcher, J.-F., Pringle, J., 2015. Viral load of equine herpesviruses 2 and 5 in nasal swabs of actively racing Standardbred trotters: Temporal relationship of shedding to clinical findings and poor performance. *Vet. Microbiol.* 179, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.002>
- Balasuriya, U.B.R., 2014. Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North Am.* 30, 543–560. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.011>
- Balish, M., Bertaccini, A., Blanchard, A., Brown, D., Browning, G., Chalker, V., Frey, J., Gasparich, G., Hoelzle, L., Knight, T., Knox, C., Kuo, C.-H., Manso-Silván, L., May, M., Pollack, J.D., Ramírez, A.S., Spergser, J., Taylor-Robinson, D., Volokhov, D., Zhao, Y., 2019. Recommended rejection of the names *Malacoplasma* gen. nov., *Mesomycoplasma* gen. nov., *Metamycoplasma* gen. nov., *Metamycoplasmataceae* fam. nov., *Mycoplasmoidaceae* fam. nov., *Mycoplasmoidales* ord. nov., *Mycoplasmoides* gen. nov., *Mycoplasmaopsis* gen. nov. [Gupta, Sawnani, Adeolu, Alnajjar and Oren 2018] and all proposed species comb. nov. placed therein. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 3650–3653. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003632>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bashiruddin, J.B., Frey, J., Konigsson, M.H., Johansson, K.-E., Hotzel, H., Diller, R., de Santis, P., Botelho, A., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J., Thiaucourt, F., Sachse, K., 2005. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial. *Vet. J.* 169, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.01.018>
- Baudler, L., Scheufen, S., Ziegler, L., Möller Palau-Ribes, F., Ewers, C., Lierz, M., 2019. Identification and differentiation of avian *Mycoplasma* species using MALDI-TOF MS. *J. Vet. Diagn. Invest.* 31, 620–624. <https://doi.org/10.1177/1040638719856932>
- Beier, L.S., Siqueira, F.M., Schrank, I.S., 2018. Evaluation of growth and gene expression of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* in defined medium. *Mol. Biol. Rep.* 45, 2469–2479. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4413-3>
- Bell, R.L., Turkington, H.L., Cosby, S.L., 2021. The bacterial and viral agents of BRDC: immune evasion and vaccine developments. *Vaccines* 9, 337. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040337>
- Bernardino, P., James, K., Barnum, S., Corbin, R., Wademan, C., Pusterla, N., 2021. What have we learned from 7 years of equine rhinitis B virus qPCR testing in nasal secretions from horses with respiratory signs. *Vet. Rec.* 188, e26. <https://doi.org/10.1002/vetr.26>
- Birks, E.K., Durando, M.M., McBride, S., 2003. Exercise-induced pulmonary hemorrhage. *Vet. Clin. North Am.* 19, 87–100. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(02\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(02)00068-8)
- Bjornsdottir, S., Harris, S.R., Svansson, V., Gunnarsson, E., Sigurardottir, O.G., Gammeljord, K., Steward, K.F., Newton, J.R., Robinson, C., Charbonneau, A.R.L., Parkhill, J., Holden, M.T.G., Waller, A.S., 2017. Genomic dissection of an icelandic epidemic of respiratory disease in horses and associated zoonotic cases. *mBio* 8, e00826-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00826-17>
- Blott, S., Cunningham, H., Malkowski, L., Brown, A., Rauch, C., 2019. A mechanogenetic model of exercise-induced pulmonary haemorrhage in the thoroughbred horse. *Genes* 10, 880. <https://doi.org/10.3390/genes10110880>
- Boujemaa, S., Ben Allaya, A., Mlik, B., Mardassi, H., Ben Abdelmoumen Mardassi, B., 2018. Phylogenetics of *Mycoplasma hominis* clinical strains associated with gynecological infections or infertility as disclosed by an expanded multilocus sequence typing scheme. *Sci. Rep.* 8, 14854. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33260-x>

- Bokma, J., Pardon, B., Van Driessche, L., Gille, L., Deprez, P., Haesebrouck, F., Boyen, F., 2019. Optimizing identification of *Mycoplasma bovis* by MALDI-TOF MS. Res. Vet. Sci. 125, 185–188. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.06.010>
- Bokma, J., Van Driessche, L., Deprez, P., Haesebrouck, F., Vahl, M., Weesendorp, E., Deurenberg, R.H., Pardon, B., Boyen, F., 2020. Rapid identification of *Mycoplasma bovis* strains from bovine bronchoalveolar lavage fluid with matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry after enrichment procedure. J. Clin. Microbiol. 58, 10.1128/jcm.00004-20. <https://doi.org/10.1128/jcm.00004-20>
- Bond, S.L., Timsit, E., Workentine, M., Alexander, T., Léguillette, R., 2017. Upper and lower respiratory tract microbiota in horses: bacterial communities associated with health and mild asthma (inflammatory airway disease) and effects of dexamethasone. BMC Microbiol. 17, 184. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1092-5>
- Bond, S.L., Workentine, M., Hundt, J., Of 2019, U.C., Gilkerson, J.R., Léguillette, R., 2020. Effects of nebulized dexamethasone on the respiratory microbiota and mycobacteria and relative equine herpesvirus-1, 2, 4, 5 in an equine model of asthma. J. Vet. Intern. Med. 34, 307–321. <https://doi.org/10.1111/jvim.15671>
- Boudreaux, M.K., Koehler, J., Habecker, P.L., Piero, F.D., 2015. Evaluation of the genes encoding CD39/NTPDase-1 and CD39L1/NTPDase-2 in horses with and without abnormal hemorrhage and in horses with pathologic evidence of exercise-induced pulmonary hemorrhage. Vet. Clin. Pathol. 44, 617–625. <https://doi.org/10.1111/vcp.12303>
- Bordin, A.I., Huber, L., Sanz, M.G., Cohen, N.D., 2022. *Rhodococcus equi* foal pneumonia: Update on epidemiology, immunity, treatment and prevention. Equine Vet. J. 54, 481–494. <https://doi.org/10.1111/evj.13567>
- Boyle, A.G., Timoney, J.F., Newton, J.R., Hines, M.T., Waller, A.S., Buchanan, B.R., 2018. *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles-revised consensus statement. J. Vet. Intern. Med. 32, 633–647. <https://doi.org/10.1111/jvim.15043>
- Breton, M., Tardy, F., Dordet-Frisoni, E., Sagne, E., Mick, V., Renaudin, J., Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Blanchard, A., 2012. Distribution and diversity of mycoplasma plasmids: lessons from cryptic genetic elements. BMC Microbiol. 12, 257. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-257>
- Bridré, J., Donatien, A., 1923. Le microbe de l'agalaxie contagieuse et sa culture *in vitro*. Compt. rend. Acad. Sci. 841–843. <https://doi.org/gallica.bnf.fr> / Bibliothèque nationale de France
- Brown, D.R., May, M., Bradbury, J.M., Balish, M.F., 2018. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1st ed. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608>
- Buchenau, I., Poumarat, F., Grand, D.L., Linkner, H., Rosengarten, R., Hewicker-Trautwein, M., 2010. Expression of *Mycoplasma bovis* variable surface membrane proteins in the respiratory tract of calves after experimental infection with a clonal variant of *Mycoplasma bovis* type strain PG45. Res. Vet. Sci. 89, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.03.014>
- Bueno, I., Pearce, P., Dunowska, M., 2020. Frequency of latent equine herpesvirus type-1 infection among a sample of horses in the central North Island of New Zealand. NZVJ 68, 23–30. <https://doi.org/10.1080/00480169.2019.1653238>
- Bürki, S., Frey, J., Pilo, P., 2015. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. Vet. Microbiol. 179, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.024>
- 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5693871/>

- Cacciotto, C., Dessì, D., Cubeddu, T., Cocco, A.R., Pisano, A., Tore, G., Fiori, P.L., Rappelli, P., Pittau, M., Alberti, A., 2019. MHO\_0730 as a surface-exposed calcium-dependent nuclease of *Mycoplasma hominis* promoting neutrophil extracellular trap formation and escape. *J. Infect. Dis.* 220, 1999–2008. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz406>
- Calcutt, M.J., Foecking, M.F., 2015. An excision-competent and exogenous mosaic transposon harbors the *tetM* gene in multiple mycoplasma hominis lineages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6665–6666. <https://doi.org/10.1128/AAC.01382-15>
- Cardwell, J.M., Smith, K.C., Wood, J.L.N., Newton, J.R., 2013. A longitudinal study of respiratory infections in British National Hunt racehorses. *Vet. Rec.* 172, 637–637. <https://doi.org/10.1136/vr.101520>
- Carnet, F., 2023. Amélioration des protocoles vaccinaux contre la grippe équine et la rhinopneumonie : apport de l'iPPVO en tant qu'adjuvant dans le modèle équin – nouvelle approche de la mesure des anticorps neutralisants [These de doctorat]. CAEN-Normandie, Caen, France. <https://www.theses.fr/2023NORMC413>
- Carvalho, F.M., Fonseca, M.M., Batistuzzo De Medeiros, S., Scortecchi, K.C., Blaha, C.A.G., Agnez-Lima, L.F., 2005. DNA repair in reduced genome: The *Mycoplasma* model. *Gene* 360, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.06.012>
- Carvalho, F.R., Uzal, F.A., Diab, S.S., Hill, A.E., Arthur, R.M., 2017. Retrospective study of fatal pneumonia in racehorses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29, 450–456. <https://doi.org/10.1177/1040638717717290>
- Cavanagh, H.M.A., Mahony, T.J., Vanniasinkam, T., 2012. Genetic characterization of equine adenovirus type 1. *Vet. Microbiol.* 155, 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.014>
- Casadevall, A., Pirofski, L., 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 67, 3703–3713. <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.3703-3713.1999>
- Chamberland, C., 1884. A filter permitting to obtain physiologically pure water. *Compt. rend. Acad. Sci.* 247–248. Source gallica.bnf.fr / Bibliothèque nationale de France. <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/cb343481087/date.langFR?resetFilAriane=true>
- Chanock, R.M., Hayflick, L., Barile, M.F., 1962. Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PLO. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 41–49. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.1.41>
- Chapman, R.S., Green, C., Main, J.P.M., Taylor, P.M., Cunningham, F.M., Cook, A.J.C., Marr, C.M., 2000. Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. *Vet. Rec.* 146, 91–95. <https://doi.org/10.1136/vr.146.4.91>
- Chauhan, K., Aly, S.S., Lehenbauer, T.W., Tonooka, K.H., Glenn, K., Rossitto, P., Marco, M.L., 2021. Development of a multiplex qPCR assay for the simultaneous detection of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma* species, and *Acholeplasma laidlawii* in milk. *PeerJ* 9, e11881. <https://doi.org/10.7717/peerj.11881>
- Christley, R.M., Hodgson, D.R., Rose, R.J., Wood, J.L.N., Reid, S.W.J., Whitear, K.G., Hodgson, J.L., 2001. A case-control study of respiratory disease in Thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet. J.* 33, 256–264. <https://doi.org/10.2746/042516401776249796>
- Chu, H.P., Horne, R.W., 1967. Electron microscopy of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma mycoides* using the negative staining technique and their comparison with *myxovirus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 143, 190–203. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1967.tb27658.x>



- Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B., Bork, P., 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* 311, 1283–1287. <https://doi.org/10.1126/science.1123061>
- Citti, C., Baranowski, E., Dordet-Frisoni, E., Faucher, M., Nouvel, L.-X., 2020. Genomic Islands in *Mycoplasmas*. *Genes (Basel)* 11, 836. <https://doi.org/10.3390/genes11080836>
- Citti, C., Dordet-Frisoni, E., Nouvel, L.X., Kuo, C.H., Baranowski, E., 2018. Horizontal gene transfers in mycoplasmas (*Mollicutes*). *Curr. Issues Mol. Biol.* 29, 3–22. <https://doi.org/10.21775/cimb.029.003>
- Citti, C., Blanchard, A., 2013. *Mycoplasmas* and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol.* 21, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.003>
- Cornelissen, J.B.W.J., de Bree, F.M., van der Wal, F.J., Kooi, E.A., Koene, M.G.J., Bossers, A., Smid, B., Antonis, A.F., Wisselink, H.J., 2017. *Mycoplasma* detection by triplex real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from bovine respiratory disease complex cases. *BMC Vet. Res.* 13, 97. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1023-6>
- Couetil, L., Cardwell, J.M., Leguillette, R., Mazan, M., Richard, E., Bienzle, D., Bullone, M., Gerber, V., Ivester, K., Lavoie, J.-P., Martin, J., Moran, G., Niedźwiedź, A., Pusterla, N., Swiderski, C., 2020. Equine asthma: Current understanding and future directions. *Front. vet. sci.* 7, 450. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00450>
- Couetil, L., Ivester, K., Barnum, S., Pusterla, N., 2021. Equine respiratory viruses, airway inflammation and performance in thoroughbred racehorses. *Vet. Microbiol.* 257, 109070. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109070>
- Couetil, L.L., Cardwell, J.M., Gerber, V., Lavoie, J. -P., Léguillette, R., Richard, E.A., 2016. Inflammatory airway disease of horses - Revised consensus statement. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 503–515. <https://doi.org/10.1111/jvim.13824>
- Couetil, L.L., Thompson, C.A., 2020. Airway diagnostics. *Vet. Clin. North Am.* 36, 87–103. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.12.006>
- Couroucé, A., Normand, C., Tessier, C., Pomares, R., Thévenot, J., Marcillaud-Pitel, C., Legrand, L., Pitel, P.-H., Pronost, S., Lupo, C., 2023. Equine herpesvirus-1 outbreak during a show-jumping competition: a clinical and epidemiological study. *JEVS* 128, 104869. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104869>
- Darling, A.E., Mau, B., Perna, N.T., 2010. progressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* 5, e11147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
- Darling, A.C.E., Mau, B., Blattner, F.R., Perna, N.T., 2004. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* 14, 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- Dauvillier, J., ter Woort, F., van Erck-Westergren, E., 2019. Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *J. Vet. Intern. Med.* 33, 968–975. <https://doi.org/10.1111/jvim.15397>
- Davidson, M.K., Lindsey, J.R., Parker, R.F., Tully, J.G., Cassell, G.H., 1988. Differences in virulence for mice among strains of *Mycoplasma pulmonis*. *Infect. Immun.* 56, 2156–2162. <https://doi.org/10.1128/iai.56.8.2156-2162.1988>
- DeBey, M.C., Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* 62, 5312–5318. <https://doi.org/10.1128%2Fiai.62.12.5312-5318.1994>

- Denys, M., Léon, A., Robert, C., Saulnier, N., Josson-Schramme, A., Legrand, L., Wimel, L., Maddens, S., Pronost, S., 2020. Biosafety evaluation of equine umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells by systematic pathogen screening in peripheral maternal blood and paired UC-MSCs. *Biopreserv. Biobank* 18, 73–81. <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0071>
- Diaz, M.H., Cross, K.E., Benitez, A.J., Hicks, L.A., Kutty, P., Bramley, A.M., Chappell, J.D., Hymas, W., Patel, A., Qi, C., Williams, D.J., Arnold, S.R., Ampofo, K., Self, W.H., Grijalva, C.G., Anderson, E.J., McCullers, J.A., Pavia, A.T., Wunderink, R.G., Edwards, K.M., Jain, S., Winchell, J.M., 2016. Identification of bacterial and viral codetections with *Mycoplasma pneumoniae* using the taqman array card in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *OFID* 3, ofw071. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw071>
- Dieckmann, S.M., Hoelzle, K., Dieckmann, M.P., Straube, I., Hofmann-Lehmann, R., Hoelzle, L.E., 2012. Occurrence of hemotrophic mycoplasmas in horses with correlation to hematological findings. *Vet. Microbiol.* 160, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.016>
- Dienes, L., 1940. Cultivation of pleuropneumonia-like organisms from female genital organs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 44, 468–469. <https://doi.org/10.3181/00379727-44-11495>
- Dienes, L., Weinberger, H.J., 1951. The L-Forms of Bacteria. *Bacteriol. Rev.* 15, 245–288.
- Dlugosz, E.M., Chappell, M.A., Meek, T.H., Szafrńska, P., Zub, K., Konarzewski, M., Jones, J.H., Bicudo, E., Nespolo, R.F., Careau, V., Garland, T., 2013. Phylogenetic analysis of mammalian maximal oxygen consumption during exercise. *J. Exp. Biol.* jeb.088914. <https://doi.org/10.1242/jeb.088914>
- Doig, P.A., 1981. Bovine Genital Mycoplasmosis. *Can. Vet. J.* 22, 339–343. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7337908>
- Dordet Frisoni, E., Marena, M.S., Sagné, E., Nouvel, L.X., Guérillot, R., Glaser, P., Blanchard, A., Tardy, F., Sirand-Pugnet, P., Baranowski, E., Citti, C., 2013. ICEA of *Mycoplasma agalactiae*: a new family of self-transmissible integrative elements that confers conjugative properties to the recipient strain. *Mol. Microbiol.* 89, 1226–1239. <https://doi.org/10.1111/mmi.12341>
- Doubli-Bounoua, N., Richard, E.A., Léon, A., Pitel, P.-H., Pronost, S., Fortier, G., 2016. Multiple molecular detection of respiratory viruses and associated signs of airway inflammation in racehorses. *Virol. J.* 13, 197. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0657-5>
- Drapeau, C., 2022. Les chiffres sur les activités équestres. IFCE. <https://equipedia.ifce.fr/economie-et-filiere/economie/chiffres-cles-de-la-filiere/les-chiffres-sur-les-activites-equestres>
- Dubrovsky, S.A., Eenennaam, A.L.V., Aly, S.S., Karle, B.M., Rossitto, P.V., Overton, M.W., Lehenbauer, T.W., Fadel, J.G., 2020. Prewaning cost of bovine respiratory disease (BRD) and cost-benefit of implementation of preventative measures in calves on California dairies: The BRD 10K study. *J. Dairy Sci.* 103, 1583–1597. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15501>
- Dujardin-Beaumetz, É., 1900. Le Microbe de la péripneumonie et sa culture, étude bactériologique d'un microorganisme à la limite de la visibilité [Thèse de médecine]. Paris, France. <https://books.google.fr/books?id=fgx4QwAACAAJ>
- Dupuy, V., Manso-Silván, L., Barbe, V., Thebault, P., Dordet-Frisoni, E., Citti, C., Poumarat, F., Blanchard, A., Breton, M., Sirand-Pugnet, P., Thiaucourt, F., 2012. Evolutionary history of contagious bovine pleuropneumonia using next generation sequencing of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* “small colony.” *PLoS One* 7, e46821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046821>
- Edward, D.G.Ff., Freundt, E.A., Chanock, R.M., Fabricant, J., Hayflick, L., Lemcke, R.M., Razin, S., Somerson, N.L., Wittler, R.G., 1967. Recommendations on nomenclature of the order mycoplasmatales. *Science* 155, 1694–1696. <https://doi.org/10.1126/science.155.3770.1694>

- Edward, D.G. ff., Freundt, E.A., 1956. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. *J. gen. Microbiol.* 14, 197–207. <https://doi.org/10.1099/00221287-14-1-197>
- Engel, D.L., Kenny, G.E., 1970. *Mycoplasma salivarium* in human gingival sulci. *J. Periodontal Res.* 5, 163–171. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1970.tb00711.x>
- Estell, K.E., Young, A., Kozikowski, T., Swain, E.A., Byrne, B.A., Reilly, C.M., Kass, P.H., Aleman, M., 2016. Pneumonia caused by *Klebsiella* spp. in 46 horses. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 314–321. <https://doi.org/10.1111/jvim.13653>
- Evans, A.S., 1976. Causation and disease: The Henle-Koch postulates revisited. *Yale J. Biol. Med.* 49, 175–195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2595276/>
- Fano, C., 2021. Les hémorragies pulmonaires induites par l'exercice chez le cheval : étude bibliographique et éléments de pathologie comparée [Thèse vétérinaire]. Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjsu4Kz2ZuCAxV5cKQEHf\\_uAmcQFnoECA4QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww2.vetagro-sup.fr%2Fbib%2Ffondoc%2Fth\\_sout%2Fdl.php%3Ffile%3D2021lyon098.pdf&usg=AOvVaw3ytXclgXpk7Q9o8N8LFtXs&opi=89978449](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjsu4Kz2ZuCAxV5cKQEHf_uAmcQFnoECA4QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww2.vetagro-sup.fr%2Fbib%2Ffondoc%2Fth_sout%2Fdl.php%3Ffile%3D2021lyon098.pdf&usg=AOvVaw3ytXclgXpk7Q9o8N8LFtXs&opi=89978449)
- Faucher, M., Nouvel, L.-X., Dordet-Frisoni, E., Sagné, E., Baranowski, E., Hygonenq, M.-C., Marena, M.-S., Tardy, F., Citti, C., 2019. Mycoplasmas under experimental antimicrobial selection: The unpredicted contribution of horizontal chromosomal transfer. *PLoS Genet.* 15, e1007910. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007910>
- Feng, M., Schaff, A.C., Balish, M.F., 2020. *Mycoplasma pneumoniae* biofilms grown *in vitro*: traits associated with persistence and cytotoxicity. *Microbiology* 166, 629–640. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000928>
- Férandon, C., Peuchant, O., Renaudin, H., Bébéar, C., 2013. Diversity of *Mycoplasma hominis* clinical isolates from Bordeaux, France, as assessed by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *BMC Microbiol.* 13, 120. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-120>
- Fernandez, M., Manzanilla, E.G., Lloret, A., León, M., Thibault, J.-C., 2017. Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, *Chlamydomydia felis* and *Mycoplasma felis* DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis. *J. Feline Med. Surg.* 19, 461–469. <https://doi.org/10.1177/1098612X16634387>
- Firth, D., 1993. Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika* 80, 27–38. <https://doi.org/10.1093/biomet/80.1.27>
- Flandrois, J.-P., Perrière, G., Gouy, M., 2015. leBIBIQBPP: a set of databases and a webtool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. *BMC Bioinform.* 16, 251. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0692-z>
- Fortier, G., Richard, E., Hue, E., Fortier, C., Pronost, S., Pottier, D., Lemaitre, L., Lekeux, P., Borchers, K., Thiry, E., 2013. Long-lasting airway inflammation associated with equid herpesvirus-2 in experimentally challenged horses. *Vet. J.* 197, 492–495. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.12.027>
- Fougerolle, S., Legrand, L., Lecouturier, F., Sailleau, C., Paillot, R., Hans, A., Pronost, S., 2017. Genetic evolution of equine influenza virus strains (H3N8) isolated in France from 1967 to 2015 and the implications of several potential pathogenic factors. *Virology* 505, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.02.003>

- Freundt, E.A., 1955. The classification of the pleuropneumonia group of organisms (Borrelomycetales). Intl. Bull. Bact. Nomen. Tax. 5, 67–78. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19562201203>
- Frey, M.L., Hanson, R.P., Anderson, D.P., 1968. A medium for the isolation of avian mycoplasmas. Am. J. Vet. Res. 29, 2163–2171. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5693465/>
- Friis, N.F., 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. Nord. Vet. Med. 27, 337–339. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1098011/>
- Friis, N.F., 1971. A selective medium for *Mycoplasma suis pneumoniae*. Acta Vet. Scand. 12, 454–456. <https://doi.org/10.1186/BF03547746>
- Fustec, C., Fafin, B., Diligeon, B., 2020. Observatoire de la filière équine normande - 2019. <https://chevaux-normandie.com/le-cheval-en-normandie/la-filiere-equine-normande/>
- Galvin, P., Gildea, S., Arkins, S., Walsh, C., Cullinane, A., 2013. The evaluation of a nucleoprotein ELISA for the detection of equine influenza antibodies and the differentiation of infected from vaccinated horses (DIVA). Influenza Other Respir. Viruses 7, 73–80. <https://doi.org/10.1111/irv.12195>
- García-Galán, A., Baranowski, E., Hygonenq, M.-C., Walch, M., Croville, G., Citti, C., De la Fe, C., Nouvel, L.-X., 2022. Genome mosaicism in field strains of *Mycoplasma bovis* as footprints of in-host horizontal chromosomal transfer. Appl. Environ. Microbiol. 88, e01661-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01661-21>
- Gaurivaud, P., Baranowski, E., Pau-Roblot, C., Sagné, E., Citti, C., Tardy, F., 2016. *Mycoplasma agalactiae* secretion of  $\beta$ -(1→6)-glucan, a rare polysaccharide in prokaryotes, is governed by high-frequency phase variation. Appl Environ Microbiol 82, 3370–3383. <https://doi.org/10.1128/AEM.00274-16>
- Gaurivaud, P., Lakhdar, L., Le Grand, D., Poumarat, F., Tardy, F., 2014. Comparison of *in vivo* and *in vitro* properties of capsulated and noncapsulated variants of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strain Afadé: a potential new insight into the biology of contagious bovine pleuropneumonia. FEMS Microbiol. Lett. 359, 42–49. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12579>
- Gautier-Bouchardon, A.V., 2018. Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. Microbiol. Spectr. ARBA-0030-2018, 425–446. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Gibson, B., Eyre-Walker, A., 2019. Investigating evolutionary rate variation in bacteria. J. Mol. Evol. 87, 317–326. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09912-5>
- Giguère, S., Prescott, J.F., 1997. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. Vet. Microbiol. 56, 313–334. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00099-0)
- Gildea, S., Arkins, S., Cullinane, A., 2011. Management and environmental factors involved in equine influenza outbreaks in Ireland 2007-2010. Equine Vet. J. 43, 608–617. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00333.x>
- Gilkerson, J.R., Bailey, K.E., Diaz-Méndez, A., Hartley, C.A., 2015. Update on viral diseases of the equine respiratory tract. Vet. Clin. N. Am. 31, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.007>
- Golden, V., Turner, L.W., Coleman, R.B., Gates, R.S., 2000. Equine response to environmental factors: a literature review and recommendations for design and environmental modification. ASAE. [https://www.researchgate.net/publication/285997714 Equine Response to Environmental](https://www.researchgate.net/publication/285997714_Equine_Response_to_Environmental)

[Factors A Literature Review and Recommendations for Design and Environmental Modification](#)

- Gourlay, R.N., Houghton, S.B., 1985. Experimental pneumonia in conventionally reared and gnotobiotic calves by dual infection with *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella haemolytica*. Res. Vet. Sci. 38, 377–382. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31813-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31813-7)
- Grissett, G.P., White, B.J., Larson, R. I., 2015. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. J. Vet. Intern. Med. 29, 770–780. <https://doi.org/10.1111/jvim.12597>
- Guiraud, J., Le Roy, C., Rideau, F., Sirand-Pugnet, P., Lartigue, C., Bébéar, C., Arfi, Y., Pereyre, S., 2023. Improved transformation efficiency in *Mycoplasma hominis* enables disruption of the MIB–MIP system targeting human immunoglobulins. Microbiol. Spectr. e01873-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01873-23>
- Gupta, R.S., Sawnani, S., Adeolu, M., Alnajar, S., Oren, A., 2018. Phylogenetic framework for the phylum Tenericutes based on genome sequence data: proposal for the creation of a new order *Mycoplasmoidales* ord. nov., containing two new families *Mycoplasmoidaceae* fam. nov. and *Metamycoplasmataceae* fam. nov. harbouring *Eperythrozoon*, *Ureaplasma* and five novel genera. Antonie van Leeuwenhoek 111, 1583–1630. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1047-3>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29, 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Haesebrouck, F., Devriese, L.A., van Rijssen, B., Cox, E., 1991. Incidence and significance of isolation of *Mycoplasma felis* from conjunctival swabs of cats. Vet. Microbiol. 26, 95–101. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90045-H](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90045-H)
- Hakim, M.S., Annisa, L., Jariah, R.O.A., Vink, C., 2021. The mechanisms underlying antigenic variation and maintenance of genomic integrity in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. Arch. Microbiol. 203, 413–429. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02041-4>
- Hannan, P.C.T., 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet. Res. 31, 373–395. <https://doi.org/10.1051/vetres:2000100>
- Hartley, C.A., Dynon, K.J., Mekuria, Z.H., El-Hage, C.M., Holloway, S.A., Gilkerson, J.R., 2013. Equine gammaherpesviruses: perfect parasites? Vet. Microbiol., Special Issue: Equine Infectious Diseases 167, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.05.031>
- Hartmann, A.D., Hawley, J., Werckenthin, C., Lappin, M.R., Hartmann, K., 2010. Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. J. Feline Med. Surg. 12, 775–782. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.06.001>
- Harvey, K.L., Jarocki, V.M., Charles, I.G., Djordjevic, S.P., 2019. The diverse functional roles of elongation factor Tu (Ef-Tu) in microbial pathogenesis. Front. Microbiol. 10, 2351. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02351>
- Heitmann, J., Kirchhoff, H., Petzoldt, K., Sonnenschein, B., 1979. Isolation of achleplasmas and mycoplasmas from aborted horse fetuses. Vet. Rec. 104, 350. <https://doi.org/10.1136/vr.104.15.350-a>
- Heller, M., Schwarz, R., Noe, G., Jores, J., Fischer, A., Schubert, E., Sachse, K., 2015. First human case of severe septicaemia associated with *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* infection. JMM. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.000101>



- Henrich, B., Hammerlage, S., Scharf, S., Haberhausen, D., Fürnkranz, U., Köhrer, K., Peitzmann, L., Fiori, P.L., Spergser, J., Pfeffer, K., Dilthey, A.T., 2020. Characterisation of mobile genetic elements in *Mycoplasma hominis* with the description of ICEHo-II, a variant mycoplasma integrative and conjugative element. *Mob. DNA* 11, 30. <https://doi.org/10.1186/s13100-020-00225-9>
- Hewson, J., Arroyo, L.G., 2015. Respiratory disease diagnostic approaches in the horse. *Vet. Clin. North Am.* 31, 307–336. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2015.04.008>
- Hinchcliff, K. w., Couetil, L. I., Knight, P. k., Morley, P. s., Robinson, N. e., Sweeney, C. r., van Erck, E., 2015. Exercise induced pulmonary hemorrhage in horses: american college of veterinary internal medicine consensus statement. *JVIM* 29, 743–758. <https://doi.org/10.1111/jvim.12593>
- Hoffman, A., Baird, J.D., Kloeze, H.J., Rosendal, S., Bell, M., 1992. *Mycoplasma felis* pleuritis in two show-jumper horses. *Cornell Vet.* 82, 155–162.
- Hooker, J.M., Butler, M., 1977. The development of complement-fixing antibody in horses after infection with *Mycoplasma equirhinis*. *J. Comp. Pathol.* 87, 281–286. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(77\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0021-9975(77)90015-9)
- Horsington, J., Lynch, S.E., Gilkerson, J.R., Studdert, M.J., Hartley, C.A., 2013. Equine picornaviruses: well known but poorly understood. *Vet. Microbiol.* 167, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.05.012>
- Houtsma, A., Bedenice, D., Pusterla, N., Pugliese, B., Mapes, S., Hoffman, A.M., Paxson, J., Rozanski, E., Mukherjee, J., Wigley, M., Mazan, M.R., 2015. Association between inflammatory airway disease of horses and exposure to respiratory viruses: a case control study. *Multidiscip. Respir. Med.* 10, 33. <https://doi.org/10.1186/s40248-015-0030-3>
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000. Applied logistic regression, 2nd ed, Wiley series in probability and statistics. Wiley, New York. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471722146>
- Hu, J., Ye, Y., Chen, X., Xiong, L., Xie, W., Liu, P., 2023. Insight into the pathogenic mechanism of *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr. Microbiol.* 80, 14. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03103-0>
- Inamine, J.M., Ho, K.C., Loechel, S., Hu, P.C., 1990. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Bacteriol.* 172, 504–506. <https://doi.org/10.1128/jb.172.1.504-506.1990>
- Ipoutcha, T., Tsarmpopoulos, I., Talenton, V., Gaspin, C., Moisan, A., Walker, C.A., Brownlie, J., Blanchard, A., Thebault, P., Sirand-Pugnet, P., 2019. Multiple origins and specific evolution of CRISPR/cas9 systems in minimal bacteria (Mollicutes). *Front Microbiol* 10, 2701. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02701>
- Jain, C., Rodriguez-R, L.M., Phillippy, A.M., Konstantinidis, K.T., Aluru, S., 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* 9, 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Jaÿ, M., Poumarat, F., Colin, A., Tricot, A., Tardy, F., 2021. Addressing the antimicrobial resistance of ruminant Mycoplasmas using a clinical surveillance network. *Front. Vet. Sci.* 8, 667175. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.667175>
- Jeffcott, L.B., Rosedale, P.D., Freestone, J., Frank, C.J., Towers-Clark, P.F., 1982. An assessment of wastage in Thoroughbred racing from conception to 4 years of age. *Equine Vet. J.* 14, 185–198. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1982.tb02389.x>

- Jensen, J. s., Cusini, M., Gomberg, M., Moi, H., 2016. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. JEADV 30, 1650–1656. <https://doi.org/10.1111/jdv.13849>
- Jironkin, A., Brown, R.J., Underwood, A., Chalker, V.J., Spiller, O.B., 2016. Genomic determination of minimum multi-locus sequence typing schemas to represent the genomic phylogeny of *Mycoplasma hominis*. BMC Genomics 17, 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3284-z>
- Johansson, K.-E., Heldtander, M.U.K., Pettersson, B., 1998. Characterization of Mycoplasmas by PCR and Sequence Analysis with Universal 16S rDNA Primers, in: Miles, R., Nicholas, R. (Eds.), *Mycoplasma Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 145–165. <https://doi.org/10.1385/0-89603-525-5:145>
- Jores, J., Fischer, A., Sirand-Pugnet, P., Thomann, A., Liebler-Tenorio, E.M., Schnee, C., Santana-Cruz, I., Heller, M., Frey, J., 2013. *Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov., a fast-growing *Mycoplasma* species isolated from wild *Caprinae*. Syst. Appl. Microbiol. 36, 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.07.005>
- Jurkovic, D.A., Hughes, M.R., Balish, M.F., 2013. Analysis of energy sources for *Mycoplasma penetrans* gliding motility. FEMS Microbiol. Lett. 338, 39–45. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12026>
- Kannan, T.R., Baseman, J.B., 2006. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 6724–6729. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510644103>
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat. Protoc. 10, 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kent, B.N., Foecking, M.F., Calcutt, M.J., 2012. Development of a novel plasmid as a shuttle vector for heterologous gene expression in *Mycoplasma yeatsii*. J. Microbiol. Methods 91, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.07.018>
- Khalil, D., Becker, C.A.M., Tardy, F., 2017. Monitoring the decrease in susceptibility to ribosomal RNAs targeting antimicrobials and its molecular basis in clinical *Mycoplasma bovis* isolates over time. Microb. Drug Resist. 23, 799–811. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0268>
- Kinoshita, Y., Niwa, H., Katayama, Y., 2015. Use of loop-mediated isothermal amplification to detect six groups of pathogens causing secondary lower respiratory bacterial infections in horses. Microbiol. Immunol. 365–370. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12257>
- Kinoshita, Y., Niwa, H., Uchida-Fujii, E., Nukada, T., 2020. Complete genome sequence of *Mycoplasma felis* strain myco-2, isolated from an equine tracheal wash sample in japan. Microbiol. Resour. Announc. 9, MRA.00057-20, e00057-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00057-20>
- Kinoshita, Y., Niwa, H., Uchida-Fujii, E., Ueno, T., 2023. A real-time PCR assay for the quantification of *Mycoplasma equirhinis* in tracheal wash samples from Thoroughbred horses. J. Vet. Diagn. Invest. 10406387231207631. <https://doi.org/10.1177/10406387231207631>
- Kirchhoff, H., Ammar, A.M., Heitmann, J., Dubenkropp, H., Schmidt, R., 1982. Serological investigation of horse sera for antibodies against mycoplasmas and acholeplasmas. Vet. Microbiol. 7, 147–156. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(82\)90026-8](https://doi.org/10.1016/0378-1135(82)90026-8)
- Kirchhoff, H., Deegen, E., Zeller, R., Floer, W., 1972. Isolation of *Mycoplasma* from the air sac and pharynx of horses with acute respiratory tract diseases. DTW 79, 465–468. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4565147/>
- Kirchhoff, H., Heitmann, J., Bisping, W., 1980. Mycoplasmas isolated from the genital tract of mares. Zentralbl. Bakteriol. A. 246, 228–235. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6999784/>

- Knox, A., Zerna, G., Beddoe, T., 2023. Current and future advances in the detection and surveillance of biosecurity-relevant equine bacterial diseases using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Animals* 13, 2663. <https://doi.org/10.3390/ani13162663>
- Kudirkiene, E., Aagaard, A.K., Schmidt, L.M.B., Pansri, P., Krogh, K.M., Olsen, J.E., 2021. Occurrence of major and minor pathogens in calves diagnosed with bovine respiratory disease. *Vet. Microbiol.* 259, 109135. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109135>
- Landsberger, M., Gandon, S., Meaden, S., Rollie, C., Chevallereau, A., Chabas, H., Buckling, A., Westra, E.R., van Houte, S., 2018. Anti-CRISPR phages cooperate to overcome CRISPR-Cas immunity. *Cell* 174, 908-916.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.058>
- Laus, F., Attili, A.R., Cerquetella, M., Spaterna, A., Tesei, B., Cuteri, V., 2009. Endoscopic findings, microbiological and cytological evaluation of tracheal aspirates in a population of Standardbred horses with poor performances. *Vet. Med.* 54, 444-450. <https://doi.org/10.17221/3/2009-VETMED>
- Le Boedec, K., 2017. A systematic review and meta-analysis of the association between *Mycoplasma* spp and upper and lower respiratory tract disease in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 250, 397-407. <https://doi.org/10.2460/javma.250.4.397>
- Leal Zimmer, F.M.A., Paes, J.A., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2020. Pathogenicity & virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Virulence* 11, 1600-1622. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1842659>
- Leal-Martín, J., Muñoz-Muñoz, M., Keadle, S.K., Amaro-Gahete, F., Alegre, L.M., Mañas, A., Ara, I., 2022. Resting oxygen uptake value of one metabolic equivalent of task in older adults: a systematic review and descriptive analysis. *Sports Med.* 52, 331-348. <https://doi.org/10.1007/s40279-021-01539-1>
- Lee, S.-K., Choi, J., Yoon, J., Jung, J., Park, Joon-Young, Park, J., Kim, Y., Park, Ji-Young, Park, D., 2022. Molecular detection of equine adenovirus 1 in nasal swabs from horses in the republic of korea. *Vet. Sci.* 9, 187. <https://doi.org/10.3390/vetsci9040187>
- Lemcke, R.M., Ernø, H., Gupta, U., 1981. The relationship of two equine mycoplasmas to *Mycoplasma mycoides*. *J. Hyg. Camb.* 87, 93-100. <https://doi.org/10.1017/S0022172400069278>
- Lemcke, R.M., Poland, J., 1980. *Mycoplasma fastidiosum*: a new species from horses. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 151-162. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-151>
- Lemonnier, L.C., Couroucé, A., Cessans, M., Petit, L., Cardwell, J.M., Barbazanges, P., Toquet, M.-P., Richard, E.A., 2023. Detection of fungi in the airways of horses according to the sample site: a methodological study. *Vet. Res. Commun.* <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10213-y>
- Léon, A., Castagnet, S., Maillard, K., Paillot, R., Giard, J.-C., 2020. Evolution of *in vitro* antimicrobial susceptibility of equine clinical isolates in France between 2016 and 2019. *Animals* 10, 812. <https://doi.org/10.3390/ani10050812>
- Léon, A., Castagnet, S., Kokabi, E., Pottier, M., 2023. New methods to characterize bacterial biofilm, the example of *Streptococcus equi*, in: International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Lyon, France. <https://normandie-univ.hal.science/hal-04148707>
- Lesnoff, M., Laval, G., Bonnet, P., Abdicho, S., Workalemahu, A., Kifle, D., Peyraud, A., Lancelot, R., Thiaucourt, F., 2004. Within-herd spread of contagious bovine pleuropneumonia in Ethiopian highlands. *Prev. Vet. Med.* 64, 27-40. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.03.005>
- Levisohn, S., Kleven, S.H., 2000. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Rev. Sci. Tech. OIE* 19, 425-442. <http://dx.doi.org/10.20506/rst.19.2.1232>



- Lim, J.Y., Yoon, J.W., Hovde, C.J., 2010. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 5–14. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20134227>
- Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., Yang, J., 2021. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 50, D912–D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
- Long, A., Nolen-Walston, R., 2020. Equine inflammatory markers in the twenty-first century. *Vet. Clin. North Am.* 36, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.12.005>
- Lord, J., Carter, C., Smith, J., Locke, S., Phillips, E., Odoi, A., 2022. Antimicrobial resistance among *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* and *Rhodococcus equi* isolated from equine specimens submitted to a diagnostic laboratory in Kentucky, USA. *PeerJ* 10, e13682. <https://doi.org/10.7717/peerj.13682>
- Lysnyansky, I., Calcutt, M.J., Ben-Barak, I., Ron, Y., Levisohn, S., Methé, B.A., Yogev, D., 2009. Molecular characterization of newly identified IS3, IS4 and IS30 insertion sequence-like elements in *Mycoplasma bovis* and their possible roles in genome plasticity. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 172–182. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01562.x>
- Lysnyansky, I., Ron, Y., Sachse, K., Yogev, D., 2001. Intrachromosomal recombination within the *vsp* locus of *Mycoplasma bovis* generates a chimeric variable surface lipoprotein antigen. *Infect. Immun.* 69, 3703–3712. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3703-3712.2001>
- Ma, G., Azab, W., Osterrieder, N., 2013. Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) - Masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Vet. Microbiol., Special Issue: Equine Infectious Diseases* 167, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.018>
- Maboni, G., Seguel, M., Lorton, A., Berghaus, R., Sanchez, S., 2019. Canine infectious respiratory disease: new insights into the etiology and epidemiology of associated pathogens. *PLoS ONE* 14, e0215817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215817>
- Mach, N., Baranowski, E., Nouvel, L.X., Citti, C., 2021. The airway pathobiome in complex respiratory diseases: a perspective in domestic animals. *Front. cell. infect. microbiol.* 11, 583600. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.583600>
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., de Kruif, A., 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet. Q.* 18, 104–109. <https://doi.org/10.1080/01652176.1996.9694628>
- Mahillon, J., Chandler, M., 1998. Insertion Sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 725–774. <https://doi.org/10.1128/membr.62.3.725-774.1998>
- Mair, T.S., Lane, J.G., 1989. Pneumonia, lung abscesses and pleuritis in adult horses: a review of 51 cases. *Equine Vet. J.* 21, 175–180. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1989.tb02135.x>
- Maksimović, Z., Rifatbegović, M., Loria, G.R., Nicholas, R.A.J., 2022. *Mycoplasma ovipneumoniae*: a most variable pathogen. *Pathogens* 11, 1477. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121477>
- Manguin, E., Pépin, E., Boivin, R., Leclere, M., 2020. Tracheal microbial populations in horses with moderate asthma. *J. Vet. Intern. Med.* 34, 986–995. <https://doi.org/10.1111/jvim.15707>
- Maniloff, J., 1988. *Mycoplasma* viruses. *Crit. Rev. Microbiol.* 15, 339–389. <https://doi.org/10.3109/10408418809104462>
- Maniloff, J., Morowitz, H.J., 1972. Cell biology of the *Mycoplasmas*. *Bacteriol. Rev.* 36, 263–290. <https://doi.org/10.1128%2Fbr.36.3.263-290.1972>
- Manso-Silván, L., Vilei, E.M., Sachse, K., Djordjevic, S.P., Thiaucourt, F., Frey, J., 2009. *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma*

- mycoides* subsp. *capri*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 1353–1358. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.005546-0>
- Martin, R.J., Kraft, M., Chu, H.W., Berns, E.A., Cassell, G.H., 2001. A link between chronic asthma and chronic infection. J. Allergy Clin. Immunol. 107, 595–601. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.113563>
- Maunsell, F.P., Woolums, A.R., Francoz, D., Rosenbusch, R.F., Step, D.L., Wilson, D.J., Janzen, E.D., 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. J. Vet. Intern. Med. 25, 772–783. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0750.x>
- Martineau, M., Kokabi, E., Taiebi, A., Lefebvre, S., Pradier, S., Jaÿ, M., Tardy, F., Leon, A., 2023. Epidemiology and pathogenicity of *M. equirhinis* in equine respiratory disorders. Vet. Microbiol. 287, 109926. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109926>
- Martineau, M., Castagnet, S., Kokabi, E., Tricot, A., Jaÿ, M., Léon, A., Tardy, F., 2023. Detection of *Mycoplasma* spp. in horses with respiratory disorders. Equine Vet. J. 55, 747–754. <https://doi.org/10.1111/evj.13918>
- Mazan, M., 2022. Equine exercise physiology - challenges to the respiratory system. Anim. Front. 12, 15–24. <https://doi.org/10.1093/af/vfac035>
- McAuliffe, L., Ellis, R.J., Miles, K., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J., 2006. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. Microbiology 152, 913–922. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28604-0>
- McLellan, H., 2017. A phenotypic and genotypic investigation of *Mycoplasma felis* [MSc(R)]. Glasgow, Écosse. <https://theses.gla.ac.uk/8013/>
- McLinden, L.A., Freeman, S.L., Daly, J., Blanchard, A., Kemp-Symonds, J.G., Waller, A., 2023. Advances in the understanding, detection and management of equine strangles. Equine Vet. Educ. <https://doi.org/10.1111/eve.13845>
- Medina, J.L., Coalson, J.J., Brooks, E.G., Winter, V.T., Chaparro, A., Principe, M.F.R., Kannan, T.R., Baseman, J.B., Dube, P.H., 2012. *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 46, 815–822. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0135OC>
- Messick, J.B., 2004. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. Vet. Clin. Pathol. 33, 2–13. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2004.tb00342.x>
- Mete, A., Özgür, N.Y., 2017. Investigation of the presence of *Mycoplasma* as an etiologic agent of inflammatory airway diseases in thoroughbred racehorses in Istanbul Province. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 365–371. <https://doi.org/10.3906/vet-1606-90>
- Meygret, A., Peuchant, O., Dordet-Frisoni, E., Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Bébéar, C., Béven, L., Pereyre, S., 2019. High prevalence of integrative and conjugative elements encoding transcription activator-like effector repeats in *Mycoplasma hominis*. Front. Microbiol. 10, 2385. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02385>
- Miles, K., McAuliffe, L., Persson, A., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J., 2005. Insertion sequence profiling of UK *Mycoplasma bovis* field isolates. Veterinary Microbiology 107, 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.02.003>
- Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., von Haeseler, A., Lanfear, R., 2020. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. Mol. Biol. Evol. 37, 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>

- Miyata, M., Hamaguchi, T., 2016. Prospects for the gliding mechanism of *Mycoplasma mobile*. *Curr. Opin. Microbiol.* 29, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.08.010>
- Moorthy, A.R., Spradbrow, P.B., 1976. Isolation of mycoplasmas from the respiratory tract of horses in Australia. *Vet. Rec.* 98, 235–237. <https://doi.org/10.1136/vr.98.12.235>
- Moorthy, A.R.S., Spradbrow, P.B., Eisler, M.E.D., 1977. Isolation of mycoplasmas from the genital tract of horses. *Aust. Vet. J.* 53, 167–169. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1977.tb00158.x>
- Morley, P.S., Chirino-Trejo, M., Petrie, L., Krupka, L., Schwab, M., 1996. Pericarditis and pleuritis caused by *Mycoplasma felis* in a horse. *Equine Vet. J.* 28, 237–240. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1996.tb03779.x>
- Mostafa, H.H., Fissel, J.A., Fanelli, B., Bergman, Y., Gniazdowski, V., Dadlani, M., Carroll, K.C., Colwell, R.R., Simner, P.J., 2020. Metagenomic next-generation sequencing of nasopharyngeal specimens collected from confirmed and suspect covid-19 patients. *mBio* 11, e01969-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01969-20>
- Nakane, D., Murata, K., Kenri, T., Shibayama, K., Nishizaka, T., 2021. Molecular ruler of the attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae*. *PLoS Pathog.* 17, e1009621. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009621>
- Nehra, K., Rana, R., Viswas, K.N., Arun, T.R., Singh, V.P., Singh, A.P., Prabhu, S.N., 2015. Isolation and molecular identification of *Mycoplasma equigenitalium* from equine genital tracts in northern India. *Iran. J. Vet. Res.* 16, 176. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4827683/>
- Neimark, H., Hoff, B., Ganter, M., 2004. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 365–371. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02858-0>
- Neimark, H., Johansson, K.-E., Rikihisa, Y., Tully, J.G., 2002. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 683–683. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-683>
- Neimark, H., Johansson, K.E., Rikihisa, Y., Tully, J.G., 2001. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of “*Candidatus Mycoplasma haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” and “*Candidatus Mycoplasma wenyonii*”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 891–899. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-891>
- Newton, J.R., Wood, J.L.N., Chanter, N., 2003. A case control study of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK Thoroughbred racehorses. *Prev. Vet. Med.* 60, 107–132. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00085-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00085-0)
- Nicholas, R.A.J., 2011. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. *Vet. Rec.* 168, 459–462. <https://doi.org/10.1136/vr.d2468>
- Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D., Stipkovits, L.P., 2002. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. *Vaccine* 20, 3569. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00340-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00340-7)
- Niu, J., Wang, D., Yan, M., Chang, Z., Xu, Y., Sizhu, S., Li, Z., Hu, S., Bi, D., 2021. Isolation, identification and biological characteristics of *Mycoplasma bovis* in yaks. *Microb. Pathog.* 150, 104691. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104691>
- Nocard, E., Roux, É., 1898. The microbe of pleuro-pneumonia. *J. Comp. Med. Vet. Arch.* 19, 535–542. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9342573/>

- Nowak, J., 1929. Morphologie, nature et cycle évolutif du microbe de la péripneumonie des bovidés. *Annales de l'Institut Pasteur* 10, 1330–1352. Source gallica.bnf.fr / Bibliothèque nationale de France. <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/cb343481087/date.langFR?resetFilAriane=true>
- Ogilvie, T.H., Rosendal, S., Blackwell, T.E., Rostkowski, C.M., Julian, R.J., Ruhnke, L., 1983. *Mycoplasma felis* as a cause of pleuritis in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 1374–1376. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6874502/>
- Oke, S., 2010. The equine respiratory system. *The Horse* 24958. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwj2Nfhp62CAxUyfKQEHeeEDTMQFnoECBgQAQ&url=https%3A%2F%2Fcmmapublic.ihmc.us%2Frid%3D1MDN4DV8D-V95YT6-23J4%2Fthe-equine-respiratory-system.pdf&usg=AOvVaw1ltLtrBaaZiCkLDgm83CC5&opi=89978449>
- Oladunni, F.S., Oseni, S.O., Martinez-Sobrido, L., Chambers, T.M., 2021. Equine influenza virus and vaccines. *Viruses* 13, 1657. <https://doi.org/10.3390/v13081657>
- Orard, M., Depecker, M., Hue, E., Pitel, P.-H., Couroucé-Malblanc, A., Richard, E.A., 2016. Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses. *Vet. J.* 207, 193–195. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.09.027>
- Osawa, S., Muto, A., Ohama, T., Andachi, Y., Tanaka, R., Yamao, F., 1990. Prokaryotic genetic code. *Experientia* 46, 1097–1106. <https://doi.org/10.1007/BF01936919>
- Pálfi, V., Belák, S., Molnár, T., 1978. Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals, showing respiratory symptoms. *Zbl. Vet. Med.* 25, 165–167. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1978.tb00737.x>
- Parker, A.M., Sheehy, P.A., Hazelton, M.S., Bosward, K.L., House, J.K., 2018. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 1241–1252. <https://doi.org/10.1111/jvim.15135>
- Payette, F., Charlebois, A., Fairbrother, J.-H., Beauchamp, G., Leclere, M., 2021. *Nicoletella semolina* in the airways of healthy horses and horses with severe asthma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 35, 1612–1619. <https://doi.org/10.1111/jvim.16140>
- Pereyre, S., Tardy, F., 2021. Integrating the human and animal sides of mycoplasmas resistance to antimicrobials. *Antibiotics* 10, 1216. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101216>
- Pereyre, S., Tardy, F., Renaudin, H., Cauvin, E., Del Prá Netto Machado, L., Tricot, A., Benoit, F., Treilles, M., Bébéar, C., 2013. Identification and subtyping of clinically relevant human and ruminant mycoplasmas by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3314–3323. <https://doi.org/10.1128/JCM.01573-13>
- Pereyre, S., Sirand-Pugnet, P., Beven, L., Charron, A., Renaudin, H., Barré, A., Avenaud, P., Jacob, D., Couloux, A., Barbe, V., Daruvar, A. de, Blanchard, A., Bébéar, C., 2009. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLOS Genetics* 5, e1000677. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000677>
- Perez-Casal, J., 2020. Pathogenesis and virulence of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.* 36, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.02.002>
- Persson, A., Jacobsson, K., Frykberg, L., Johansson, K.-E., Poumarat, F., 2002. Variable surface protein vmm of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *J. Bacteriol.* 184, 3712–3722. <https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3712-3722.2002>

- Piasecki, T., Chrzastek, K., Kasprzykowska, U., 2017. *Mycoplasma pulmonis* of rodents as a possible human pathogen. Vector Borne Zoonotic Dis. 17, 475–477. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2104>
- Pickles, K., Pirie, R.S., Rhind, S., Dixon, P.M., McGorum, B.C., 2002. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. part 3: the effect of time, temperature and fixatives. Equine Vet. J. 34, 297–301. <https://doi.org/10.2746/042516402776185967>
- Pilo, P., Frey, J., Vilei, E.M., 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Vet. J. 174, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.016>
- Pirie, R.S., 2014. Recurrent airway obstruction: a review. Equine Vet. J. 46, 276–288. <https://doi.org/10.1111/evj.12204>
- Pollack, J.D., Tryon, V.V., Beaman, K.D., 1983. The metabolic pathways of *Acholeplasma* and *Mycoplasma*: an overview. Yale J. Biol. Med. 56, 709–716. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6206660>
- Poulain, C., 2017. Etude retrospective sur une population de 17 chevaux presentes au cisco pour affections respiratoires entre 2010 et 2016 : recherche et caracterisation des chevaux avec un lavage tracheal positif aux mycoplasmes [Thèse vétérinaire]. Nantes, France.
- Poumarat, F., Perrin, B., Longchambon, D., 1991. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). Vet. Microbiol. 29, 329–338. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90140-B](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90140-B)
- Pottier, M., 2023. Implication de *Pseudomonas aeruginosa* en santé humaine et animale en Normandie : résistances, facteurs d'adaptation et biofilm (These de doctorat). Normandie. <https://www.theses.fr/2023NORMC403>
- Pringle, J., Venner, M., Tscheschlok, L., Bächli, L., Riihimäki, M., 2019. Long term silent carriers of *Streptococcus equi* ssp. *equi* following strangles; carrier detection related to sampling site of collection and culture versus qPCR. Vet. J. 246, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.02.003>
- Pringle, J., Venner, M., Tscheschlok, L., Waller, A.S., Riihimäki, M., 2020. Markers of long term silent carriers of *Streptococcus equi* ssp. *equi* in horses. J. Vet. Intern. Med. 34, 2751–2757. <https://doi.org/10.1111/jvim.15939>
- Pronost, S., Pitel, P.H., Miszczak, F., Legrand, L., Marcillaud-Pitel, C., Hamon, M., Tapprest, J., Balasuriya, U.B.R., Freymuth, F., Fortier, G., 2010. Description of the first recorded major occurrence of equine viral arteritis in France: first EAV outbreak in France. Equine Vet. J. 42, 713–720. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00109.x>
- Provost, A., Perreau, P., Breard, A., Le Goff, C., Martel, J.L., Cottew, G.S., 1987. Péripleurite contagieuse bovine: contagious bovine pleuropneumonia. Rev. Sci. Tech. OIE 6, 565–679. <https://doi.org/10.20506/rst.6.3.306>
- Pusterla, N., Leutenegger, C.M., Barnum, S.M., Byrne, B.A., 2018. Use of quantitative real-time PCR to determine viability of *Streptococcus equi* subspecies *equi* in respiratory secretions from horses with strangles. Equine Vet. J. 50, 697–700. <https://doi.org/10.1111/evj.12809>
- Pusterla, N., James, K., Barnum, S., Bain, F., Barnett, D.C., Chappell, D., Gaughan, E., Craig, B., Schneider, C., Vaala, W., 2022. Frequency of detection and prevalence factors associated with common respiratory pathogens in equids with acute onset of fever and/or respiratory signs (2008–2021). Pathogens 11, 759. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070759>
- Racklyeft, D., Love, D., 2000. Bacterial infection of the lower respiratory tract in 34 horses. Aust. Vet. J. 78, 549–559. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2000.tb11901.x>



- Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M., 2002. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 672–679. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.672-679.2002>
- Rahman, A., Uzal, F.A., Hassebroek, A.M., Carvalho, F.R., 2022. Retrospective study of pneumonia in non-racing horses in California. *J. Vet. Diagn. Invest.* 34, 587–593. <https://doi.org/10.1177/10406387221094273>
- Rakowska, A., Cywinska, A., Witkowski, L., 2020. Current trends in understanding and managing equine rhodococcosis. *Animals* 10, 1910. <https://doi.org/10.3390/ani10101910>
- Razin, S., 1978. The Mycoplasmas. *Microbiol. Rev.* 42, 414–470. <https://doi.org/10.1128%2Fmr.42.2.414-470.1978>
- Razin, S., Banai, M., Gamliel, H., Polliack, A., Bredt, W., Kahane, I., 1980. Scanning electron microscopy of mycoplasmas adhering to erythrocytes. *Infect. Immun.* 30, 538–546. <https://doi.org/10.1128%2Fiai.30.2.538-546.1980>
- Razin, S., 1982. Sterols in *Mycoplasma* membranes, in: Bronner, F., Kleinteller, A. [Eds.], *Current Topics in Membranes and Transport, Membrane Lipids of Prokaryotes*. Academic Press, pp. 183–205. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60311-1](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60311-1)
- Razin, S., 1996. Mycoplasmas, in: Baron, S. [Ed.], *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk7637/>
- Razin, S., Yogeve, D., Naot, Y., 1998. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1094–1156. <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.4.1094-1156.1998>
- Reed, S.M., Toribio, R.E., 2004. Equine herpesvirus 1 and 4. *Vet. Clin. North Am.* 20, 631–642. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2004.09.001>
- Register, K.B., Sacco, R.E., Olsen, S.C., 2013. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Mycoplasma bovis*-specific antibody in bison sera. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 1405–1409. <https://doi.org/10.1128/CI.00409-13>
- Reuss, S.M., Giguère, S., 2015. Update on bacterial pneumonia and pleuropneumonia in the adult horse. *Vet. Clin. N. Am.* 31, 105–120. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.002>
- Rice, P., Houshaymi, B.M., Abu-Groun, E.A.M., Nicholas, R.A.J., Miles, R.J., 2001. Rapid screening of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Mycoplasma mycoides* and differentiation of European subsp. *mycoides* SC (small colony) isolates. *Vet. Microbiol.* 78, 343–351. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00305-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00305-9)
- Richard, E., 2015. *Maladies des chevaux*, 3ème édition. ed. France Agricole.
- Robinson. 2006. HBLB funded project. HBLB Vet. Newsl.
- Rodríguez-Lázaro, D., Lewis, D.A., Ocampo-Sosa, A.A., Fogarty, U., Makrai, L., Navas, J., Scotti, M., Hernández, M., Vázquez-Boland, J.A., 2006. Internally controlled real-time PCR method for quantitative species-specific detection and *vapA* genotyping of *Rhodococcus equi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4256–4263. <https://doi.org/10.1128/AEM.02706-05>
- Rossi, H., Virtala, A.-M., Raekallio, M., Rahkonen, E., Rajamäki, M.M., Mykkänen, A., 2018. Comparison of tracheal wash and bronchoalveolar lavage cytology in 154 horses with and without respiratory signs in a referral hospital over 2009–2015. *Front. Vet. Sci.* 5, 61. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00061>
- Roy, M.-F., Lavoie, J.-P., 2003. Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. *Vet. Clin.* 19, 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(02\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(02)00063-9)

- Rush, B., Mair, T.S., 2006. Equine respiratory diseases, Repr. ed. Blackwell Science, Oxford.
- Saade, G., Deblanc, C., Bougon, J., Marois-Créhan, C., Fablet, C., Auray, G., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., Gagnon, C.A., Zhu, J., Gottschalk, M., Summerfield, A., Simon, G., Bertho, N., Meurens, F., 2020. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Vet. Res.* 51, 80. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00807-8>
- Saito, M., Nakayama, K., Nakagawa, M., 1976. Localization of *Mycoplasma pulmonis* in mice. *Exp. Anim.* 25, 265–272. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1034561/>
- Sawicka-Durkalec, A., Tomczyk, G., Kursa, O., Stenzel, T., Gyuranecz, M., 2022. Evidence of *Mycoplasma* spp. transmission by migratory wild geese. *Poultry Science* 101, 101526. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101526>
- Scheurer, L., Bachofen, C., Hardmeier, I., Lechmann, J., Schoster, A., 2021. Prevalence of nasal shedding of equid gammaherpesviruses in healthy swiss horses. *Viruses* 13, 1686. <https://doi.org/10.3390/v13091686>
- Scheutz, F., Strockbine, N.A., 2015. *Escherichia*, in: Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S. [Eds.], *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp. 1–49. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01147>
- Schimke, R.T., Barile, M.F., 1963. Arginine metabolism in pleuropneumonia-like organisms isolated from mammalian cell culture. *J. Bacteriol.* 86, 195–206. <https://doi.org/10.1128/jb.86.2.195-206.1963>
- Schoeb, T.R., 2000. Respiratory diseases of rodents. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 3, 481–496. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30083-X](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30083-X)
- Seeherman, H.J., Richard Taylor, C., Maloiy, G.M.O., Armstrong, R.B., 1981. Design of the mammalian respiratory system. II. Measuring maximum aerobic capacity. *Respir. Physiol.* 44, 11–23. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(81\)90074-8](https://doi.org/10.1016/0034-5687(81)90074-8)
- Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Seppey, M., Manni, M., Zdobnov, E.M., 2019. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness. *Methods Mol. Biol.* 1962, 227–245. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14)
- Sharma, S., Brousseau, R., Kasatiya, S., 1998. Detection and confirmation of *Mycoplasma pneumoniae* in urogenital specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36, 277–280. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.1.277-280.1998>
- Shibata, K., Totsuka, M., Watanabe, T., 1986. Phosphatase activity as a criterion for differentiation of oral mycoplasmas. *J. Clin. Microbiol.* 23, 970. <https://doi.org/10.1128/jcm.23.5.970-972.1986>
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. J.* 181, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.020>
- Siguier, P., Gournayre, E., Chandler, M., 2014. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 865–891. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067>
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., Chandler, M., 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, D32–D36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>

- Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A., Blanchard, A., 2007. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res. Microbiol., Microbial genomics* 158, 754–766. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.007>
- Smith, P.F., 1955. Amino acid metabolism by pleuropneumonia-like organisms. *J. Bacteriol.* 70, 552–556. <https://doi.org/10.1128/jb.70.5.552-556.1955>
- Smith, W.E., Hillier, J., Mudd, S., 1948. Electron micrograph studies of two strains of Pleuropneumonia-like (L) Organisms of human derivation. *J. Bacteriol.* 56, 589–601. <https://doi.org/10.1128/jb.56.5.589-601.1948>
- Söderlund, R., Bölske, G., Holst, B.S., Aspán, A., 2011. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction method for the detection of *Mycoplasma felis*. *J. Vet. Diagn. Investig.* 23, 890–893. <https://doi.org/10.1177/1040638711407479>
- Spergser, J., Aurich, C., Aurich, J.E., Rosengarten, R., 2002. High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Vet. Microbiol.* 87, 119–129. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00043-3)
- Spuesens, E.B.M., Fraaij, P.L.A., Visser, E.G., Hoogenboezem, T., Hop, W.C.J., Van Adrichem, L.N.A., Weber, F., Moll, H.A., Broekman, B., Berger, M.Y., Van Rijsoort-Vos, T., Van Belkum, A., Schutten, M., Pas, S.D., Osterhaus, A.D.M.E., Hartwig, N.G., Vink, C., Van Rossum, A.M.C., 2013. Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in the upper respiratory tract of symptomatic and asymptomatic children: an observational study. *PLoS Med.* 10, e1001444. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001444>
- Stewart, A.J., Cuming, R.S., 2015. Update on Fungal Respiratory Disease in Horses. *Vet. Clin. North Am.* 31, 43–62. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.005>
- Sun, G.-W., Shook, T.L., Kay, G.L., 1996. Inappropriate use of bivariable analysis to screen risk factors for use in multivariable analysis. *J. Clin. Epidemiol.* 49, 907–916. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(96\)00025-X](https://doi.org/10.1016/0895-4356(96)00025-X)
- Sweeney, C.R., Timoney, J.F., Newton, J.R., Hines, M.T., 2005. *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 123–134. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02671.x>
- Tang, F.F., Wei, H., McWhiter, D.L., Edgar, J., 1935. An investigation of the causal agent of bovine pleuropneumonia. *J. Pathol.* 40, 391–406. <https://doi.org/10.1002/path.1700400220>
- Tardy, F., Mercier, P., Solsona, M., Saras, E., Poumarat, F., 2007. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype large colony isolates from healthy and diseased goats: Prevalence and typing. *Vet. Microbiol.* 121, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.12.002>
- Tardy, F., Baranowski, E., Nouvel, L.-X., Mick, V., Manso-Silván, L., Thiaucourt, F., Thébault, P., Breton, M., Sirand-Pugnet, P., Blanchard, A., Garnier, A., Gibert, P., Game, Y., Poumarat, F., Citti, C., 2012. Emergence of atypical *Mycoplasma agalactiae* strains harboring a new prophage and associated with an alpine wild ungulate mortality episode. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4659–4668. <https://doi.org/10.1128/AEM.00332-12>
- Tardy, F., Mick, V., Dordet-Frisoni, E., Marendia, M.S., Sirand-Pugnet, P., Blanchard, A., Citti, C., 2015. Integrative conjugative elements are widespread in field isolates of *Mycoplasma* species pathogenic for ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1634–1643. <https://doi.org/10.1128/AEM.03723-14>
- Tassew, D.D., Mechesso, A.F., Park, N.-H., Song, J.-B., Shur, J.-W., Park, S.-C., 2017. Biofilm formation and determination of minimum biofilm eradication concentration of antibiotics in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 1716–1720. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0279>



- Tatay-Dualde, J., Prats-van der Ham, M., Gaurivaud, P., de la Fe, C., Tardy, F., 2021. Efflux might participate in decreased susceptibility to oxytetracycline in contagious agalactia-causative *Mycoplasma* spp. *Animals* 11, 2449. <https://doi.org/10.3390/ani11082449>
- Thomas, A., Linden, A., Mainil, J., Bischof, D.F., Frey, J., Vilei, E.M., 2005. *Mycoplasma bovis* shares insertion sequences with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: evolutionary and developmental aspects. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.013>
- Timoney, P.J., McCollum, W.H., 1993. Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North Am.* 9, 295–309. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30397-8](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30397-8)
- Tonkin-Hill, G., MacAlasdair, N., Ruis, C., Weimann, A., Horesh, G., Lees, J.A., Gladstone, R.A., Lo, S., Beaudoin, C., Floto, R.A., Frost, S.D.W., Corander, J., Bentley, S.D., Parkhill, J., 2020. Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biol.* 21, 180. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02090-4>
- Toohy-Kurth, K., Reising, M.M., Tallmadge, R.L., Goodman, L.B., Bai, J., Bolin, S.R., Pedersen, J.C., Bounpheng, M.A., Pogranichniy, R.M., Christopher-Hennings, J., Killian, M.L., Mulrooney, D.M., Maes, R., Singh, S., Crossley, B.M., 2020. Suggested guidelines for validation of real-time PCR assays in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet Diagn. Invest.* 32, 802–814. <https://doi.org/10.1177/1040638720960829>
- Tully, J.G., Whitcomb, R.F., 1979. *The Mycoplasmas: Human and Animal Mycoplasmas*, United Kingdom Edition. ed. Academic Press Inc. <http://journals.lww.com/00007435-198101000-00004>
- Tully, J.G., Razin, S., 1983. *Methods in mycoplasmology*, United Kingdom Edition. ed. Academic Press Inc., New York.
- Uchida-Fujii, E., Kinoshita, Y., Niwa, H., Maeda, T., Nukada, T., Ueno, T., 2021. High prevalence of *Mycoplasma equirhinis* in thoroughbred horses with respiratory symptoms in autumn 2018. *J. Vet. Med. Sci.* 83, 1907–1912. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0163>
- van Kuppeveld, F.J., van der Logt, J.T., Angulo, A.F., van Zoest, M.J., Quint, W.G., Niesters, H.G., Galama, J.M., Melchers, W.J., 1992. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2606–2615. <https://doi.org/10.1128%2Faem.58.8.2606-2615.1992>
- Vázquez-Boland, J.A., Meijer, W.G., 2019. The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*: what's in a name? *Mol. Microbiol.* 112, 1–15. <https://doi.org/10.1111/mmi.14267>
- Voelker, L.L., Dybvig, K., 1998. Characterization of the Lysogenic Bacteriophage MAV1 from *Mycoplasma arthritidis*. *J. Bacteriol.* 180, 5928–5931. <https://doi.org/10.1128%2Fjb.180.22.5928-5931.1998>
- Waites, K.B., Xiao, L., Paralanov, V., Viscardi, R.M., Glass, J.I., 2013. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*, in: de Filippis, I., McKee, M.L. [Eds.], *Molecular Typing in Bacterial Infections*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 229–281. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-185-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-185-1_16)
- Waites, K.B., Xiao, L., Liu, Y., Balish, M.F., Atkinson, T.P., 2017. *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 63. <https://doi.org/10.1128/cmr.00114-16>
- Waller, A.S., 2014. New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses. *Vet. Clin. North Am.* 30, 591–607. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.007>
- Wang, H., Lu, Z., Bao, Y., Yang, Y., de Groot, R., Dai, W., de Jonge, M.I., Zheng, Y., 2020. Clinical diagnostic application of metagenomic next-generation sequencing in children with severe

- nonresponding pneumonia. PLoS One 15, e0232610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232610>
- Watanabe, M., Hitomi, S., Goto, M., Hasegawa, Y., 2012. Bloodstream infection due to *Mycoplasma arginini* in an immunocompromised patient. J. Clin. Microbiol. 50, 3133–3135. <https://doi.org/10.1128/JCM.00736-12>
- Webb, K., Barker, C., Harrison, T., Heather, Z., Steward, K.F., Robinson, C., Newton, J.R., Waller, A.S., 2013. Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. Vet. J. 195, 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.07.007>
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Etten, J., 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. J. Bacteriol. 171, 6455–6467. <https://doi.org/10.1128/jb.171.12.6455-6467.1989>
- Westberg, J., Persson, A., Holmberg, A., Goesmann, A., Lundeberg, J., Johansson, K.-E., Pettersson, B., Uhlén, M., 2004. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1t, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Genome Res. 14, 221–227. <https://doi.org/10.1101/gr.1673304>
- Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K.E., 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput. Biol. 13, e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Wilsher, S., Allen, W.R., Wood, J.L.N., 2006. Factors associated with failure of Thoroughbred horses to train and race. Equine Vet. J. 38, 113–118. <https://doi.org/10.2746/042516406776563305>
- Windsor, G.D., 1973. The isolation of mycoplasma from horses. Vet. Rec. 93, 593–594. <https://doi.org/10.1136/vr.93.22.593>
- Wisselink, H.J., Smid, B., Plater, J., Ridley, A., Andersson, A.-M., Aspán, A., Pohjanvirta, T., Vähänikkilä, N., Larsen, H., Høggberg, J., Colin, A., Tardy, F., 2019. A European interlaboratory trial to evaluate the performance of different PCR methods for *Mycoplasma bovis* diagnosis. BMC Vet. Res. 15, 86. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1819-7>
- Wood, J.L.N., Burrell, M.H., Roberts, C.A., Chanter, N., Shaw, Y., 1993. Streptococci and *Pasteurella* spp. associated with disease of the equine lower respiratory tract. Equine Vet. J. 25, 314–318. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb02970.x>
- Wood, J.L.N., Chanter, N., Newton, J.R., Burrell, M.H., Dugdale, D., Windsor, H.M., Windsor, G.D., Rosendal, S., Townsend, H.G.G., 1997. An outbreak of respiratory disease in horses associated with *Mycoplasma felis* infection. Vet. Rec. 140, 388–391. <https://doi.org/10.1136/vr.140.15.388>
- Wood, J.L.N., Newton, J.R., Chanter, N., Mumford, J.A., 2005. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. J. Clin. Microbiol. 43, 120–126. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.120-126.2005>
- Xiao, L., Ptacek, T., Osborne, J.D., Crabb, D.M., Simmons, W.L., Lefkowitz, E.J., Waites, K.B., Atkinson, T.P., Dybvig, K., 2015. Comparative genome analysis of *Mycoplasma pneumoniae*. BMC Genomics 16, 610. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1801-0>
- Xie, Z., Tang, H., 2017. ISEScan: automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes. Bioinformatics 33, 3340–3347. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx433>
- Xu, QY., Pan, Q., Wu, Q., Xin, JQ., 2022. *Mycoplasma bovis* adhesins and their target proteins. Front. Immunol. 13, 1016641. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1016641>

- Yamao, F., Muto, A., Kawauchi, Y., Iwami, M., Iwagami, S., Azumi, Y., Osawa, S., 1985. UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. PNAS 82, 2306–2309. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.8.2306>
- Yiwen, C., Yueyue, W., Lianmei, Q., Cuiming, Z., Xiaoxing, Y., 2021. Infection strategies of mycoplasmas: Unraveling the panoply of virulence factors. Virulence 12, 788–817. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1889813>
- Yus, E., Maier, T., Michalodimitrakis, K., Van Noort, V., Yamada, T., Chen, W.-H., Wodke, J.A.H., Güell, M., Martínez, S., Bourgeois, R., Kühner, S., Raineri, E., Letunic, I., Kalinina, O.V., Rode, M., Herrmann, R., Gutiérrez-Gallego, R., Russell, R.B., Gavin, A.-C., Bork, P., Serrano, L., 2009. Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. Science 326, 1263–1268. <https://doi.org/10.1126/science.1177263>
- Zhang, X., Chen, Z., Gu, W., Ji, W., Wang, Y., Hao, C., He, Y., Huang, L., Wang, M., Shao, X., Yan, Y., 2018. Viral and bacterial co-infection in hospitalised children with refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Epidemiol. Infect. 146, 1384–1388. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000778>
- Zhou, Qi, Mai, K., Yang, D., Liu, J., Yan, Z., Luo, C., Tan, Y., Cao, S., Zhou, Qingfeng, Chen, L., Chen, F., 2021. Comparative genomic analysis of *Mycoplasma anatis* strains. Genes Genomics 43, 1327–1337. <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01129-5>
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K.H., Dennis, J.J., Wishart, D.S., 2011. PHAST: a fast phage search tool. Nucleic Acids Res. 39, W347-352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>
- Zhou, Y., Shao, Z., Dai, G., Li, X., Xiang, Y., Jiang, S., Zhang, Z., Ren, Y., Zhu, Z., Fan, C., Zhang, G., 2023. Pathogenic infection characteristics and risk factors for bovine respiratory disease complex based on the detection of lung pathogens in dead cattle in Northeast China. J. Dairy Sci. 106, 589–606. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21929>
- Zink, M.C., Yager, J.A., Smart, N.L., 1986. *Corynebacterium equi* infections in horses, 1958-1984: a review of 131 cases. Can. Vet. J. 27, 213–217. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17422658>

# VALORISATIONS

---

### 1. Publications scientifiques internationales

Matthieu Martineau, Sophie Castagnet, Éléna Kokabi, Agnes Tricot, Maryne Jaÿ, Albertine Léon, Florence Tardy. Detection of *Mycoplasma* spp. in horses with respiratory disorders. *Equine Veterinary Journal*, 2023, 55, 747-754. doi.org/10.1111/evj.13918

Matthieu Martineau, Éléna Kokabi, Anis Taiebi, Stéphanie Lefebvre, Sophie Pradier, Maryne Jaÿ, Florence Tardy, Albertine Léon. Epidemiology and pathogenicity of *M. equirhinis* in equine respiratory disorders. *Veterinary Microbiology*, 2023, 287, doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109926

Matthieu Martineau, Chloé Ambroset, Stéphanie Lefebvre, Éléna Kokabi, Albertine Léon, Florence TARDY. Unravelling main genomic features of *Mycoplasma equirhinis*. *Microbial Genomics*, submitted for publication on 3 January 2024.

### 2. Communications orales

#### 2.1. Congrès internationaux

Matthieu Martineau, Sophie Castagnet, Maryne Jay, Florence Tardy, Albertine Léon. Characterisation of *Mycoplasma* spp. isolated in 2020 from respiratory tract samples of horses in France. *11th International Equine Infectious Diseases Conference*, Septembre 2021, Online, France. pp.15-16, [10.1111/evj.09\\_13495](https://doi.org/10.1111/evj.09_13495). [hal-03385370](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03385370)

Matthieu Martineau, Éléna Kokabi, Maryne Jaÿ, Florence Tardy, Albertine Léon. Association of *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* and *Mycoplasma* spp. in equine respiratory infections. *Workshop Havemeyer*, Mai 2023, Mendenhall, United States. [hal-04095078](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-04095078)

## 2.2. Congrès nationaux

Matthieu Martineau. Développement d'outils moléculaires pour l'identification des mycoplasmes impliqués dans les affections respiratoires du cheval et détermination de leur profil de résistance aux antibiotiques. *4<sup>ème</sup> journée des doctorants de la filière équine*, IFCE, Mai 2021, Online, France. [hal-03385244](https://hal-03385244) / [https://youtu.be/2HzFjlmZ\\_xY?si=fzh5UWU5ReR9iUo6](https://youtu.be/2HzFjlmZ_xY?si=fzh5UWU5ReR9iUo6)

Matthieu Martineau, Elena Kokabi, Maryne Jaÿ, Florence Tardy, Albertine Léon. Characterisation of *Mycoplasma* spp. detected in 2020/2021 from respiratory tract samples of horses in France. *Journées de l'École doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement*, EDnBise, Online, Juin 2022, France. [hal-04167243](https://hal-04167243)

Matthieu Martineau, Sophie Castagnet, Éléna Kokabi, Agnès Tricot, Maryne Jay, Florence Tardy, Albertine Léon. Les mycoplasmes dans les pathologies respiratoires équines. *Journées sciences et innovations équines 2022*, IFCE, Juin 2022, Saumur, France. [hal-03690326](https://hal-03690326) / <https://www.youtube.com/watch?v=KRJlpt9NN8c>

Matthieu Martineau, Sophie Castagnet, Elena Kokabi, Agnès Tricot, Maryne Jay, Florence Tardy, Albertine Léon. Prévalence et identification des mycoplasmes respiratoires équins en France. *50<sup>èmes</sup> Journées annuelles de l'AVEF*, AVEF, Novembre 2022, Reims, France. [hal-03846966](https://hal-03846966)

Albertine Léon, Matthieu Martineau, Florence Tardy. Les mycoplasmes respiratoires équins. *Journées nationales des groupements techniques vétérinaires*, SNGTV, Mai 2023, Poitiers, France. [hal-04167253](https://hal-04167253)

Matthieu Martineau, Elena Kokabi, Maryne Jaÿ, Florence Tardy, Albertine Léon. Rôle des mycoplasmes dans les affections respiratoires équines. *Prix du meilleur thésard 2023 du Pôle Hippolia*, Pôle Hippolia, Juin 2023, Tourgeville, France. [hal-04167243](https://hal-04167243)

Matthieu Martineau, Elena Kokabi, Maryne Jaÿ, Albertine Léon, Florence Tardy. Role of mycoplasma in equine respiratory disorders. *Journées Scientifiques et Doctorales de l'Anses*, ANSES, Octobre 2023, Maisons-Alfort, France. [hal-04227824](https://hal-04227824)

Matthieu Martineau, Éléna Kokabi, Maryne Jaÿ, Florence Tardy, Albertine Léon. Rôle des mycoplasmes dans les affections respiratoires équines. *51<sup>èmes</sup> Journées annuelles de l'AVEF*, AVEF, Novembre 2023, Toulouse, France.

### 3. Posters

Matthieu Martineau, Sophie Castagnet, Éléna Kokabi, Agnès Tricot, Maryne Jaÿ, Albertine Léon, Florence Tardy. Detection of *Mycoplasma* spp. in horses with respiratory disorders. *Anses scientific and doctoral days*, ANSES, Octobre 2022, Maisons-Alfort, France. [hal-03811429](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03811429)



Anses scientific and doctoral days

18 -19 October 2022



## DETECTION OF *MYCOPLASMA* SPP. IN HORSES WITH RESPIRATORY DISORDERS

MARTINEAU Matthieu<sup>1,2</sup>, CASTAGNET Sophie<sup>2</sup>, KOKABI Éléna<sup>2</sup>, TRICOT Agnès<sup>1</sup>, JAÿ Maryne<sup>1</sup>, LEON Albertine<sup>2</sup>, TARDY Florence<sup>1</sup> – <sup>1</sup>Unité mixte de recherche Mycoplasmoses animales, Anses laboratoire de Lyon, VetAgro Sup; <sup>2</sup>LABÉO, Pôle recherche, St contest, Caen

### INTRODUCTION

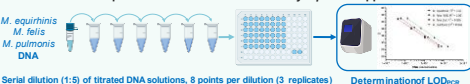
Bacteria belonging to the genus *Mycoplasma* are often involved in respiratory disorders in their animal hosts. Three species have been reported so far from the respiratory tract of horses worldwide: *Mycoplasma* (*M.*) *equirhinis*, *M. pulmonis* and *M. felis*<sup>1,2</sup>. Their clinical role remains unclear, partly owing to the lack of standardised detection tools.

### AIM OF THE STUDY

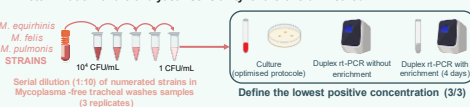
This study aimed at i) developing and validating tools to detect, isolate and identify strains from different *Mycoplasma* species in clinical respiratory equine specimens and ii) subsequently defining the three species' prevalence in France depending on the sample types and horses' characteristics (age, breed and sex).

### MATERIALS AND METHODS

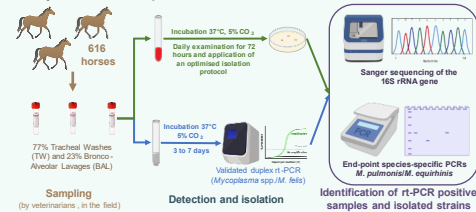
#### Validation of a duplex rt-PCR for the detection of *Mycoplasma* spp./*M. felis*



#### Determination of the analytical sensitivity of the overall method



#### Analysis of clinical samples



### RESULTS

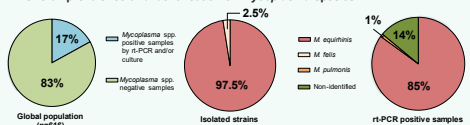
#### Analytical sensitivity of the methods

	CFU/mL		
	Culture	rt-PCR without enrichment	rt-PCR with enrichment
<i>M. equirhinis</i>	10	10000	<1
<i>M. felis</i>	10	10 and <1 <sup>†</sup>	<1 <sup>†</sup>
<i>M. pulmonis</i>	100	1000	100

<sup>†</sup> Using the *M. felis* specific rt-PCR, for rt-PCR with enrichment the results are identical with both systems.

→ The rt-PCR with an enrichment procedure was the most sensitive method

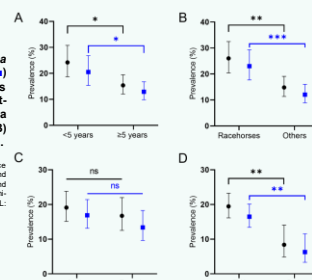
#### Overall prevalence and identification of *Mycoplasma* species



→ 104 samples were positive by at least one method. *M. equirhinis* is the predominant circulating species

#### Prevalence of *Mycoplasma* spp. (●) and *M. equirhinis* (■) in clinical specimens (positivity is defined by rt-PCR and/or culture) as a function of age (A), breed (B) sex (C) and sample types (D).

Errors bars correspond to 95% confidence interval. "ns", not significant; "ns", "ns" and "ns" refer to p-values of <math>0.05</math>, <math>0.01</math> and <math>0.001</math>, respectively, as obtained using Chi-squared test. TW: Tracheal Washes, BAL: Broncho-Alveolar Lavages.



→ The prevalence of *Mycoplasma* spp. and *M. equirhinis* varied with age, racehorses and the type of sample

### CONCLUSION/DISCUSSION

We proposed a mixed diagnostic based on both culture and a duplex rt-PCR. The pre-enrichment step was shown to improve the sensibility of the method, but prevented an estimation of the initial mycoplasma load in the clinical samples. The commonest detected species was *M. equirhinis*, which is in agreement with a previous study<sup>2</sup>. Our results showed a significantly higher prevalence of *Mycoplasma* spp. or *M. equirhinis* in racehorses, possibly explained by the strong ventilation during exercises. Also, this prevalence was higher in TW than BAL, TW being often preferred for airway infection diagnostic. Future studies should address the actual clinical role of mycoplasmas and more specifically of the frequent *M. equirhinis* species in equine respiratory infections.

<sup>1</sup> Allam, N. M. & Lemcke, R. M. Mycoplasmas isolated from the respiratory tract of horses. *J. Hyg.* 74, 385–408 (1975).

<sup>2</sup> Uchida-Fuji, E. et al. High prevalence of *Mycoplasma equirhinis* in Thoroughbred horses with respiratory symptoms in autumn 2018. *J. Vet. Med. Sci.* 83, 1907–1912 (2021).



Contact du projet : Florence TARDY

Coordonnées complètes du contact +33 478696843, florence.tardy@anses.fr

Partenaires du projet : VetAgroSup, LABÉO



Pôle d'analyses et de recherche de Normandie



Matthieu Martineau, Sophie Castagnet, Éléna Kokabi, Agnès Tricot, Maryne Jay, Florence Tardy, Albertine Léon. Caractérisation des mycoplasmes respiratoires équins détectés en France en 2020 et 2021. *JNRB - Journée Normande de Recherche Biomédicale 2022*, Juin 2022, Rouen, France. [hal-03811404](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03811404)

## Caractérisation des mycoplasmes respiratoires équins détectés en France en 2020 et 2021

Matthieu Martineau<sup>1,2,3</sup>, Sophie Castagnet<sup>1,2</sup>, Éléna Kokabi<sup>1,2</sup>, Agnès Tricot<sup>3</sup>, Maryne Jay<sup>3</sup>, Florence Tardy<sup>3</sup>, Albertine Léon<sup>1,2</sup>

1. LABÉO, Pôle recherche, France 2. Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, Inserm UMR 1311 DYNAMICURE, France 3. Université de Lyon, UMR Mycoplasmoses animales, VetAgro Sup, Anses, France

### Contexte et objectifs

**Les bactéries du genre *Mycoplasma* :**

- Petite taille cellulaire
- Petit génome → nécessité des milieux et des conditions de croissance spécifiques
- Essentiellement responsables d'infections pulmonaires ou génitales pour les espèces pathogènes

**Dans la sphère respiratoire équine :**

- Trois espèces décrites depuis 1975 : *M. equirhinis*, *M. felis* et *M. pulmonis* → Implication clinique non démontrée
- Détectées par rt-PCR dans 15% des prélèvements des voies respiratoires profondes, Lavages Trachéaux (LT) et Lavages Broncho-Alvéolaires (LBA), envoyés à LABÉO

**Responsables de signes cliniques respiratoires et/ou de baisse de performance ?**

### Matériel et méthodes

Afin d'exclure un potentiel biais de détection et d'identification par espèce de la méthode, la Limite de Détection de la rt-PCR (LD<sub>PCR</sub>) et la sensibilité de la méthode ont été déterminées, en utilisant respectivement des extraits d'ADN quantifiés et des suspensions bactériennes calibrées de trois souches ; *M. equirhinis* (souche terrain), *M. felis* (souche terrain) et *M. pulmonis* (NCTC 10139), selon les recommandations de la norme AFNOR (NF U47-600-2).

### Résultats

- Les LD<sub>PCR</sub> obtenues sont de 6,00.10<sup>-6</sup>, 4,20.10<sup>-6</sup> et 1,35.10<sup>-5</sup> ng/µL pour *M. equirhinis*, *M. felis* et *M. pulmonis* respectivement.
- La sensibilité de la méthode donne une différence maximum de 2 log<sub>10</sub> UFC/mL détectables entre les espèces pour les techniques utilisées.

Prévalences des bactéries du genre *Mycoplasma* spp. en fonction de la matrice

Résultats obtenus par rt-PCR et culture sur les 1428 prélèvements analysés

Résultats d'identification obtenus sur les extraits ADN positifs en rt-PCR (A) et les souches isolées (B)

### Conclusions

- Prévalence des mycoplasmes de 18,6% dans la population étudiée
- Détection plus importante dans les lavages trachéaux
- Prédominance de l'espèce *M. equirhinis*
- Pas de détection ou d'isolement préférentiels de cette espèce

### Perspectives

***Mycoplasma equirhinis* :**

- Diversité ? : Analyse phénotypique et génotypique des souches isolées
- Implication clinique ? : Comparaison des prévalences versus score clinique

### Références

1: Allam et Lemcke, 1975 (*The Journal of hygiene*), 2: Van Kuppelveld et al., 1992 (*Applied and environmental microbiology*), 3: Söderlund et al., 2011 (*Journal of veterinary diagnostic investigation*) 4: Johansson et al., 1998 (*Methods in molecular biology*), 5: Robinson et al., 2006 (*HLB Veterinary Newsletter*)

Co-Financeurs : Fonds Éperon, ifce institut français du cheval et de l'équitation, Caricature



#### 4. Vulgarisation scientifique

Matthieu Martineau, Sophie Pradier, Albertine Léon. Mycopab : caractérisation des mycoplasmes des affections respiratoires du cheval. Vidéo de présentation du projet tournée lors de la collecte des prélèvements à la Jumenterie du Pin, du 30 juin au 2 juillet 2021, Gouffern-en-Auge, France.

<https://www.youtube.com/watch?v=SBresZ-ingE>

Participations au Festival de l'Excellence Normande (FENO), présentation du laboratoire et démonstration de méthodes scientifiques, Parc des expositions de Rouen, 11 novembre 2021 et Parc des expositions de Caen, 22 octobre 2022.

Participation aux EQUIDAYS, présentation vulgarisée du sujet de thèse, Plateforme Normandie Equine Vallée, 21 octobre 2023.

#### 5. Enseignements et encadrements

Enseignements UFR des sciences, Université CAEN-Normandie, 2021 - 2023 :

- Licence 2ème année - Travaux pratiques, 51,5 heures : bases de microbiologie, croissance bactérienne, culture de bactériophages, antibiogramme.
- Licence 1ère année - Travaux dirigés, 20 heures : Clonage moléculaire, vecteur plasmidique, enzyme de restriction, phosphorylation.

Encadrement :

Vincent Leprince, stage de DUT, 2ème année Option : Analyses Biologiques et Biochimiques (six semaines en 2021). Mise au point d'un schéma MLST spécifique de l'espèce *Mycoplasma equirhinis* et caractérisation des souches isolées de prélèvements respiratoires équins en 2020.

Membre du comité de suivi individuel de :

- Eulalie Fourneau, doctorante du laboratoire Glyco-MEV, UR 4358, Université de Rouen Normandie)
- Sarah Hue, doctorante de l'UMR-I 02 SEBIO - Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques, Université du Havre Normandie

## 6. Formations

### Formations scientifiques par la société BRUKER (2021) :

- Incrémentation de bases de données par la construction de spectres de référence sur l'appareil MALDI-TOF (7 heures).
- Utilisation du logiciel « MALDI Biotyper 3/OC/Explorer » dans le but d'explorer les approches expertes d'identification et les approches épidémiologiques (5 heures).

### Formations transversales (2020 – 2022) :

- Intégrité scientifique (4 heures)
- Anglais (30 heures)
- Structure et fonctionnement de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (3 heures)
- Développer son réseau professionnel (3 heures)
- Protéger, valoriser et diffuser le résultats et produits de la recherche en Sciences Technologiques et Santé (3 heures)

### Formations suivies à l'ESPE (écoles supérieures du professorat et de l'éducation) dans le cadre de la mission d'enseignement :

- Pédagogies pour apprendre dans l'enseignement supérieur (12 heures)
- Construire, conduire et évaluer un CM et TD (12 heures)
- Voix, corps et communication professionnelle (6 heures)





## Prévalence, identification et caractérisation des bactéries du genre *Mycoplasma* détectées dans les affections respiratoires équinés

---

Les affections respiratoires sont la seconde cause de contre-performance chez le cheval athlète. Elles sont associées à un ensemble de signes cliniques dont certains sont déclenchés ou exacerbés par la présence de micro-organismes dans la sphère respiratoire de l'animal. Les bactéries du genre *Mycoplasma*, atypiques par leurs caractéristiques phénotypiques et génomiques, ont été décrites comme associées à des infections respiratoires à l'échelle mondiale, tant chez l'homme que les animaux d'élevage. Elles sont retrouvées avec une prévalence proche de 15 % dans les lavages respiratoires équinés reçus pour diagnostic sans que leur rôle clinique ne soit clairement défini. Pour comprendre le rôle de ces bactéries, un protocole mixte, associant culture et amplification génique à partir d'un enrichissement sur bouillon du prélèvement initial, a été validé. Cette méthode a été utilisée sur 1948 échantillons de 1764 chevaux vivant en France, reçus sur la période 2020-2022. La prévalence des bactéries du genre *Mycoplasma* a été affinée à 16,1% avec une prédominance de l'espèce *M. equirhinis* (85,3%). La détection de *M. equirhinis* n'a pas pu être associée à des signes cliniques rapportés par les vétérinaires. Toutefois, une détection plus importante chez les chevaux de races de course et ceux vivant en box, dans les lavages trachéaux, a été mise en évidence. Dans les liquides bronchoalvéolaires, *M. equirhinis* a été identifié de façon concomitante à une inflammation à médiation neutrophilique. La prévalence de *M. equirhinis* est augmentée en présence d'autres micro-organismes tels que *Streptococcus zooepidemicus*, EHV-5 et *Actinobacillus equuli*. L'analyse des génomes de diverses souches de *M. equirhinis* montre une homogénéité importante de l'espèce malgré la présence d'éléments génétiques mobiles. Les gènes associés à la virulence retrouvés sont caractéristiques du genre *Mycoplasma* et très similaires à ceux détectés dans l'espèce *M. hominis*, un pathogène opportuniste de la sphère génitale chez l'homme, phylogénétiquement très proche de *M. equirhinis*. Tous ces éléments conduisent donc à considérer *M. equirhinis* comme un agent opportuniste au sein d'un complexe respiratoire équin, qu'il s'agira de caractériser plus finement par sa détection quantitative dans les prélèvements initiaux et l'analyse plus globale du microbiote respiratoire.

**Mots clés :** Équidés, Affections respiratoires, *Mycoplasma*, *M. equirhinis*, Diagnostic

### Prevalence, identification and characterisation of bacteria belonging to the *Mycoplasma* genus detected in equine respiratory disorders

---

Respiratory disorders are the second most common cause of poor performance in horses and are associated with numerous clinical signs. Some of these are caused or enhanced by microorganisms present in the equine respiratory tract. Bacteria of the *Mycoplasma* genus, which have atypical phenotypic and genomic characteristics, have been described to be associated with respiratory infections worldwide, in both humans and domesticated animals. Their prevalence has been estimated to be close to 15% in equine respiratory samples submitted for diagnosis, while their clinical role is unclear. To assess their role, a hybrid protocol combining culture and gene amplification from broth enrichment of the initial clinical specimen was validated. This method was used on 1,948 samples from 1,764 horses in France received over the 2020-2022 period, and the prevalence of *Mycoplasma* bacteria was refined to 16.1%, with a predominance of *M. equirhinis* species (85.3%). Detection of *M. equirhinis* was not associated with specific clinical signs reported by the veterinarians. However, a higher detection in tracheal washes was observed in racehorses and stabled horses. In bronchoalveolar lavages, *M. equirhinis* was detected in association with neutrophil-mediated inflammation. The prevalence of *M. equirhinis* is increased when other microorganisms, such as *Streptococcus zooepidemicus*, EHV-5, and *Actinobacillus equuli* were detected. Genomic analysis of a panel of *M. equirhinis* strains shows that this species is homogeneous, despite the presence of mobile genetic elements. The virulence-associated genes found are characteristic of the *Mycoplasma* genus and very similar to those found in *M. hominis*, an opportunistic pathogen of the human genital tract, and phylogenetically very close to *M. equirhinis*. All these elements suggest that *M. equirhinis* is an opportunistic agent involved in the equine respiratory complex, which should be characterized more precisely by its direct quantitative detection in samples and by analysis of the respiratory microbiota.

**Keywords:** Equine, Respiratory disorders, *Mycoplasma*, *M. equirhinis*, Diagnosis