
ÉVALUATION DE LA PARTICIPATION D'ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM DANS LE SYNDROME « FIÈVRE DES MONTAGNES » OU *BELAR JOA* DES OVINS DU PAYS BASQUE FRANÇAIS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2005
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Fabrice, Benjamin, Pascal RAZIMBAUD
Né, le 21 avril 1981 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur François SCHELCHER

JURY

PRESIDENT :
M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. François SCHELCHER
M. Philippe JACQUIET

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

à Monsieur le Professeur Henri DABERNAT

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Bactériologie - Virologie

Nous le remercions vivement d'avoir accepté la présidence de notre jury de thèse.

à Monsieur le Professeur François SCHELCHER

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie médicale et des animaux de basse-cour

Nous le remercions de nous avoir fait l'honneur d'être notre directeur de thèse. Nous lui sommes sincèrement reconnaissants de nous avoir guidé dans l'élaboration et la mise en place de cette étude.

à Monsieur le Docteur Philippe JACQUIET

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Parasitologie et maladies parasitaires

Nous le remercions d'avoir accepté d'être membre du jury, et de nous avoir accordé une aide précieuse et d'enrichissantes discussions concernant notre étude.

REMERCIEMENTS

au Docteur Corinne VIAL NOVELLA pour son implication et son indispensable participation à la mise en place de ce projet. Je la remercie également pour son accueil et sa disponibilité.

aux autres vétérinaires ayant bien voulu participer à cette étude : Docteur BISCAICHIPY, Docteur NATORP, Docteur RICHARD.

aux éleveurs pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé et le temps précieux qu'ils ont consacré à cette étude : M. AMBLARD, M. BONNEMASON, M. DARBARY, M. et Mme ETXEVERRI, M. HEGO BURU, M. IHIDOY, M. et Mme LOYATHO, et M. et Mme OXANDABARATS.

au Docteur Pierre MATHEVET et à Merial, au Docteur Renaud MAILLARD, ainsi qu'au Docteur Guy JONCOUR pour leur soutien indispensable pour mener à bien notre étude.

aux vétérinaires de NAY pour la sympathie et le soutien qu'ils m'ont exprimés.

à Annie PAILLARES pour son aide et ses conseils toujours pertinents.

à la mémoire de Gilbert.

à Elodie pour m'avoir toujours soutenu et supporté chaque jour qui passe. icru.

à mes parents pour m'avoir donné la possibilité d'en arriver jusque là, je vous en suis infiniment reconnaissant.

à mon frère qui a toujours été un modèle.

à ma sœur, mon parrain et ma marraine, mes grands-parents et toute ma famille.

à mes trois collocs, aux Pelys, aux Entoïdes, aux Garde-mas, aux Technofive, aux Debaficionados, et aux Apéritubes. A la Pescajoune.

à tout le service de Pathologie du Bétail, et à cette année mémorable passée ensemble.

à mes amis.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	14
LISTE DES FIGURES, DES TABLEAUX ET DES PHOTOGRAPHIES.....	15
INTRODUCTION.....	17
1. POURQUOI UNE HYPOTHESE D'HEMOPARASITOSE TRANSMISE PAR LES TIQUES	21
1.1. EPIDEMIOLOGIE EN FAVEUR D'UNE MALADIE INFECTIEUSE.....	23
1.1.1. <i>Une cause végétale peu probable.....</i>	23
1.1.2. <i>Quel type d'agent infectieux.....</i>	24
1.2. LE VECTEUR TIQUE.....	26
1.2.1. <i>Influences du climat et de la végétation.....</i>	26
1.2.2. <i>Phénologie des tiques.....</i>	27
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES HEMOPARASITOSES OVINES.....	29
2.1. ETIOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE ET SIGNES CLINIQUES.....	31
2.1.1. <i>Anaplasmose à Anaplasma ovis.....</i>	31
2.1.1.1. Agent infectieux.....	31
2.1.1.2. Epidémiologie.....	31
2.1.1.3. Pathogenèse.....	33
2.1.1.4. Description clinique.....	33
2.1.2. <i>Ehrlichiose à Anaplasma phagocytophilum.....</i>	34
2.1.2.1. Agent infectieux.....	34
2.1.2.2. Epidémiologie.....	34
2.1.2.3. Pathogenèse.....	36
2.1.2.4. Description clinique.....	37
2.1.3. <i>Epérythrozoonose à Mycoplasma ovis.....</i>	38
2.1.3.1. Agent infectieux.....	38
2.1.3.2. Epidémiologie.....	39
2.1.3.3. Pathogenèse.....	40
2.1.3.4. Description clinique.....	40
2.1.4. <i>Babésioses à Babesia ovis et Babesia motasi.....</i>	41
2.1.4.1. Agents parasitaires.....	41
2.1.4.2. Epidémiologie.....	42
2.1.4.3. Pathogenèse.....	44
2.1.4.4. Description clinique.....	44
2.1.5. <i>Theilérioses à Theileria lestoquardi et Theileria ovis.....</i>	45
2.1.5.1. Agents parasitaires.....	45
2.1.5.2. Epidémiologie.....	46
2.1.5.3. Pathogenèse.....	47
2.1.5.4. Description clinique.....	47
2.2. DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE.....	49
2.2.1. <i>Identification morphologique sur étalement de sang.....</i>	49

2.2.1.1.	Site de prélèvement.....	49
2.2.1.2.	Moment du prélèvement.....	49
2.2.1.3.	Technique de coloration	50
2.2.1.4.	Caractéristiques morphologiques sur étalement sanguin	51
2.2.2.	<i>Sérologie</i>	54
2.2.3.	<i>Identification des acides nucléiques par PCR</i>	55
2.2.4.	<i>La numération formule sanguine (NFS)</i>	55
2.2.4.1.	Anaplasmose.....	55
2.2.4.2.	Ehrlichiose.....	55
2.2.4.3.	Epérythrozonose	56
2.2.4.4.	Babésiose.....	56
2.2.4.5.	Theilériose.....	56
2.2.5.	<i>Examens biochimiques</i>	57
2.2.6.	<i>Identification et analyse des tiques</i>	57
3.	ETUDE EXPERIMENTALE	59
3.1.	PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	61
3.1.1.	<i>Objectifs</i>	61
3.1.2.	<i>Matériel et méthodes</i>	61
3.1.2.1.	Elevages.....	61
3.1.2.2.	Animaux	61
3.1.2.3.	Prélèvements.....	62
3.1.2.4.	Analyses.....	63
3.2.	RESULTATS	64
3.2.1.	<i>Epidémiologie</i>	64
3.2.1.1.	Environnement	64
3.2.1.2.	Répartition dans le temps.....	64
3.2.1.3.	Animaux atteints	64
3.2.2.	<i>Signes cliniques</i>	66
3.2.2.1.	Délai d'apparition.....	66
3.2.2.2.	Agnelles.....	66
3.2.2.3.	Antenaises.....	67
3.2.2.4.	Béliers	68
3.2.3.	<i>Diagnostic de laboratoire</i>	68
3.2.3.1.	Etalements sanguins	68
3.2.3.2.	Numération et formule sanguines.....	69
3.2.3.3.	Sérologies (Annexe V, tableaux 5 et 6).....	71
3.2.3.4.	Identification des acides nucléiques par PCR (Annexe VI, tableau 7).....	72
3.2.3.5.	Identification et analyse des tiques.....	72
3.3.	DISCUSSION.....	73
3.3.1.	<i>Epidémiologie</i>	73
3.3.1.1.	Environnement	73
3.3.1.2.	Animaux atteints.....	73
3.3.2.	<i>Signes cliniques</i>	74

3.3.2.1. Délai d'apparition.....	74
3.3.2.2. Agnelles.....	74
3.3.2.3. Antenaises.....	74
3.3.2.4. Béliers.....	75
3.3.3. Résultats des examens complémentaires.....	75
3.3.3.1. Etalements sanguins.....	75
3.3.3.2. Numération et formule sanguines.....	75
3.3.3.3. Sérologie <i>A. phagocytophilum</i>	76
3.3.3.4. PCR <i>A. phagocytophilum</i>	77
3.3.3.5. Identification des tiques.....	78
3.3.4. Imputation du Belar Joa à <i>A. phagocytophilum</i>.....	78
3.4. PROPOSITION DE CONDUITE A TENIR FACE A UN CAS DE <i>BELAR JOA</i>	79
3.4.1. <i>Traitement contre <i>A. phagocytophilum</i></i>	79
3.4.2. <i>Traitement contre les tiques</i>	80
3.4.2.1. Le traitement contre les tiques.....	80
3.4.2.2. Les méthodes écologiques.....	80
CONCLUSIONS	83
BIBLIOGRAPHIE	87
ANNEXES	95

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALAT : Alanine aminotransférase

ASAT : Aspartate aminotransférase

AOC : Appellation d'origine contrôlée

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

EDTA : *Ethylene diamine tetra-acetic acid*

EGH : Ehrlichiose granulocytaire humaine

ENVA : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

GB : Globules blancs

GN : Granulocytes

Hb : Hémoglobine

Ht : Hématocrite

IFI : Immuno fluorescence indirecte

LDA 22 : Laboratoire départemental d'analyses des Côtes d'Armor

MGG : May-Grünwald-Giemsa

NDVI : *Normalized difference vegetation index*

NFS : Numération formule sanguine

OTC LA : Oxytétracycline longue action

PAL : Phosphatases alcalines

PLA : Plaquettes

PCR : *Polymerase chain reaction*

PS1 : Prise de sang précoce

PS2 : Prise de sang tardive

spp. : Toutes espèces

TBF : *Tick-borne fever*

VGM : Volume globulaire moyen

LISTE DES FIGURES, DES TABLEAUX ET DES PHOTOGRAPHIES

Figures

Figure 1 : *Anaplasma ovis* dans une hématie

Figure 2 : Morula d' *A. phagocytophilum* dans un polynucléaire neutrophile

Figure 3 : *Mycoplasma ovis* sur une hématie

Figure 4 : *Babesia ovis*, forme annulaire, dans une hématie

Figure 5 : *Babesia motasi* piriforme dans une hématie

Figure 6 : Macro et microschantons de *Theileria* spp. dans des lymphoblastes

Figure 7 : Forme annulaire endoérythrocytaire de *Theileria* spp.

Figure 8 : Forme caractéristique de tétrade en croix de Malte de *Theileria* spp.

Graphique 1 : Pourcentage moyen d'animaux atteints en fonction du délai entre montée à l'estive et expression de la maladie

Tableaux

Tableau 1 : Paramètres hématologiques moyens des agnelles de l'élevage 2.

Tableau 2 : Paramètres hématologiques moyens de l'élevage 4.

Tableau 3 : Paramètres hématologiques individuels de 6 agnelles et d'une antenaïse de l'élevage 2.

Tableau 4 : Paramètres hématologiques individuels de 5 agnelles de l'élevage 4.

Tableau 5 : Résultats d'analyses sérologiques couplées (IFI) pour la recherche d'anticorps anti *A. phagocytophilum* pour les élevages 1 et 2.

Tableau 6 : Résultats d'analyses sérologiques couplées (IFI) pour la recherche d'anticorps anti *A. phagocytophilum* pour les élevages 3, 4 et 5.

Tableau 7 : Résultats de PCR *Anaplasma phagocytophilum*.

Photographie

Photo 1 : Morula d'*A. phagocytophilum* dans un polynucléaire neutrophile (microscope x1000, immersion)

Introduction

Dans le Béarn et le Pays Basque français sont élevées trois races ovines rustiques : la Manech tête noire, la Manech tête rousse, et la Basco-béarnaise. Le lait produit est utilisé en grande partie pour la fabrication de fromage de brebis (dont l'AOC Ossau-Iraty).

Le système de production ovine a su s'adapter aux conditions relatives à ce milieu. Une grande partie (voire la totalité) de la campagne laitière est effectuée de l'automne au printemps. Puis, de nombreux troupeaux transhument en montagne à partir de fin mai - début juillet. Souvent, les agnelles¹ ou antenaises² estivent plus tard que les adultes taries. Quant aux brebis encore en lactation, soit elles sont taries dans l'exploitation, soit elles sont traites en estive puis taries.

De mémoire d'éleveur basque, les animaux montant pour la première fois en estive sont atteints par une maladie : le *Belar Joa*, en langue basque, qui signifie "battu par l'herbe". Ce terme est issu d'une croyance aussi ancienne que la maladie selon laquelle elle serait due à une herbe trop et trop pauvre sur le plan nutritionnel, et qui serait à l'origine de troubles locomoteurs et d'amaigrissement, observés sur les animaux malades. En fait, les troubles sont caractérisés par un syndrome fébrile avec des difficultés de déplacement et de l'anorexie. Dans les cas les plus sévères, certains animaux meurent. Les traitements à base d'oxytétracycline injectable semblent habituellement efficaces.

La cause du *Belar Joa* reste inconnue. Le syndrome fébrile, la réponse favorable aux traitements à base de cyclines, l'apparente immunisation des animaux, et la fréquence des tiques retrouvées sur les animaux, nous ont conduit à formuler une hypothèse de maladie infectieuse, et plus particulièrement d'hémoparasitose à *Anaplasma phagocytophilum*.

Dans un premier temps, nous ferons une synthèse sur les hémoparasitoses transmises par les tiques chez les Ovins.

Ensuite, nous présenterons nos observations effectuées sur 5 élevages afin de déterminer l'agent infectieux responsable de la maladie.

¹ Les agnelles sont des femelles ovines ayant entre 0 et 1 an

² Les antenaises sont femelles ovines de 1 à 2 ans, généralement mises à la reproduction pour la première fois.

Enfin, nous discuterons des résultats obtenus, et nous aborderons les possibilités offertes en matière de traitement et de prévention de cette maladie.

1. Pourquoi une hypothèse d'hémoparasitose transmise par les tiques

Le terme d'hémoparasitose recouvre aussi bien une maladie parasitaire au sens strict qu'une maladie due à des bactéries. Dans les deux cas, l'agent responsable est présent dans le sang, dans le compartiment cellulaire. Ces hémoparasitoses peuvent être transmises par divers vecteurs tels que les tiques, les insectes piqueurs (e.g. Psychodidés et Tabanidés), ou encore de façon iatrogène (aiguille...).

Quelques hypothèses étiologiques peuvent être formulées à partir des données épidémiologiques et cliniques.

1.1. EPIDEMIOLOGIE EN FAVEUR D'UNE MALADIE INFECTIEUSE

Les symptômes apparaissent dans les quelques jours à semaines qui suivent l'arrivée en estive. Le terme de *Belar Joa* semble correspondre à deux entités distinctes : une dans laquelle les animaux boitent avec des membres chauds, et l'autre où domine un syndrome fébrile avec des animaux fiévreux souvent couchés, ayant du mal à suivre le troupeau et fréquemment atteints à de tremblements (on parle alors de "fièvre des montagnes"). L'anorexie explique la dégradation de l'état général et l'amaigrissement.

Quel que soit le tableau clinique, les animaux atteints sont systématiquement ceux qui montent en estive pour la première fois. Les manifestations cliniques sont plus ou moins marquées selon l'âge (agnelle ou antenaïse).

1.1.1. Une cause végétale peu probable

Une cause traumatique ou alimentaire du syndrome fébrile est tout à fait improbable. En effet, l'hyperthermie, qui peut être très élevée (41-42 °C) ne peut être expliquée par la simple consommation d'une herbe trop dure. L'amaigrissement important constaté pourrait, quant à lui, être attribué à une herbe trop pauvre pour couvrir les besoins des animaux, notamment pour la croissance des jeunes. Les besoins de croissance spécifiques aux agnelles pourraient expliquer que les générations suivantes ne soient pas touchées.

Dans un élevage ayant été privé d'estive pendant trois ans pour cause d'agalactie contagieuse, un nombre de cas de *Belar Joa* anormalement élevé s'est déclaré chez les adultes qui sont montés pour la première fois en estive après ces trois ans. Les besoins alimentaires de ces adultes n'étaient pas supérieurs à ceux de leurs congénères adultes déjà montés en estive et n'étant pas atteints par le *Belar Joa*. Ces observations suggèrent que l'atteinte préférentielle des agnelles ou des antenaises serait plutôt liée à l'absence d'immunité.

La mise en place de cette immunité ainsi que la présence d'une forte fièvre ne sont pas cohérents avec des causes traumatiques ou métaboliques, dues à l'herbe rencontrée en estive.

Certains symptômes pourraient être en accord avec l'ingestion de plantes toxiques, mais encore une fois l'atteinte quasi exclusive des animaux montant pour la première fois en estive rend cette hypothèse improbable.

Finalement, il semble peu probable que le *Belar Joa* ait pour cause une origine végétale.

1.1.2. Quel type d'agent infectieux

Parmi les facteurs favorables à cette hypothèse, nous avons : le syndrome fébrile, et la mise en place d'une immunité protectrice.

L'apparition de cas suite à la montée en estive pourrait être expliquée par le mode de transmission, vectorisé, par les arthropodes, ou par l'effet déclencheur du stress de transhumance. Toutefois, l'effet apparemment curateur des oxytétracyclines n'est pas en faveur d'une hypothèse virale.

L'hypothèse d'un agent bactérien ou parasitaire apparaît la plus probable, sans qu'il soit possible de dire lequel de ces deux types de pathogènes est le plus à même d'expliquer le *Belar Joa*.

L'épidémiologie du *Belar Joa* apparaît, par ailleurs, comme tout à fait cohérente avec une transmission par des tiques. Ainsi, le fait que la majorité des animaux soit atteinte par le *Belar Joa* 1 à 2 semaines après la montée, évoque une exposition quasi simultanée des animaux à l'agent pathogène et donc à son éventuel

vecteur. Par ailleurs, les éleveurs rapportent une infestation des animaux atteints de *Belar Joa*, quasi constante par des tiques. La première exposition des animaux aux tiques se déroule en estive. La répartition des cas cliniques, limités à certaines montagnes, est également cohérente avec une infection vectorisée par des tiques.

Notre hypothèse de travail est une maladie bactérienne ou parasitaire transmise par des tiques, hypothèse en accord avec les signes cliniques et l'épidémiologie rencontrés.

1.2. LE VECTEUR TIQUE

Les estives du Béarn et du Pays Basque sont des zones aux conditions et à l'écosystème particulièrement favorables à certaines tiques. La période de l'année (mai – juin) où surviennent les cas de *Belar Joa* est cohérente avec la pullulation des tiques.

Par ailleurs, des éleveurs ayant traité contre les tiques avant la montée à l'estive, auraient remarqué une moindre incidence de la maladie. Plus le niveau d'infestation par le vecteur est élevé, plus le risque de transmission d'un agent pathogène est grand.

Quels sont les facteurs ayant un rôle dans la présence et le taux de prévalence des tiques?

1.2.1. Influences du climat et de la végétation

Les différentes espèces de tiques sont adaptées à différents types de climats, plus ou moins secs (méditerranéen, océanique...).

La plupart de ces arthropodes sont sensibles à la dessiccation et nécessitent de l'humidité pour survivre. Les climats humides à la pluviométrie importante, comme celui du Pays Basque (plus de 1000 mm de pluie par an en moyenne), semblent donc tout à fait convenir à leur survie.

Dans plusieurs études sur *Ixodes ricinus* (7,37), la présence et le taux d'infestation étaient fortement corrélés au type d'environnement. La présence d'un bois à proximité de la pâture, accroît le risque d'infestation par *I. ricinus* d'un facteur 7 (32,37). Le taux d'infestation le plus élevé a été relevé dans les bois contenant diverses espèces de chênes et dans les vieilles forêts à la végétation très hétérogène (7).

Le risque d'infestation est plus élevé en présence d'un tapis végétal épais et surtout d'une végétation naturelle, non cultivée (37), ce qui est le cas dans les estives de montagne. Nous pouvons également citer une préférence des tiques pour les zones situées autour des cours d'eau (7,8).

Les facteurs cités sont responsables de la formation d'un microclimat dans lequel est maintenue une humidité favorable à la survie des tiques (7). Les conditions

climatiques et environnementales rencontrées à l'altitude des estives (entre 700 et plus de 1000 m en général) semblent favorables à ces arthropodes. Néanmoins, ces vecteurs sont sensibles au soleil. Ainsi, une estive sans couvert boisé, située sur le versant sud, leur serait défavorable. L'altitude ne semble pas être un facteur essentiel (9). Ce sont davantage le climat et la végétation rencontrés à ces altitudes particulières qui semblent jouer un rôle (notamment du point de vue de l'humidité).

Cependant, certaines espèces de tiques sont mieux adaptées à un climat sec. C'est le cas de *Rhipicephalus bursa* qui préfère les conditions où prédominent les plantes à feuilles dures et cuticule épaisse comme les buissons (importants dans la définition d'un habitat favorable à cette tique) (9), chêne blanc, pin parasol, olivier (12). Ces conditions ne sont pas retrouvées dans le Pays Basque.

Dans la même étude (9), *R. bursa* était plus abondant dans des zones au niveau d'humidité relativement faible, contrairement à *H. punctata*. Ce niveau d'humidité est représenté par une variable (NDVI³) permettant de quantifier le niveau d'activité photosynthétique de la végétation, qui est lié de façon linéaire à l'humidité relative.

1.2.2. Phénologie des tiques

La phénologie est la science qui étudie la répartition dans le temps des organismes dans le milieu, en rapport avec leur cycle vital.

Le développement des différents stades de tiques est principalement lié à la température du milieu. Des températures ambiantes inférieures à 5-7°C empêchent le développement d'*I. ricinus* (54). La tique entre ainsi en diapause durant l'hiver et reprend son activité, dont la ponte, à l'arrivée des beaux jours. Les œufs éclosent et un pic de larves à l'affût est ainsi observé en fin de printemps (54) début d'été (8). Au cours de leur repas sanguin, les larves pourront être infectées par des bactéries ou des parasites sanguins qu'elles pourront ensuite transmettre à d'autres animaux (au stade nymphal dans le cas d'*I. ricinus*, cette tique n'effectuant qu'un seul repas sanguin par stade). Les nymphes d'*I. ricinus* ont une distribution bimodale avec un très fort pic au printemps (par mue des larves ayant passé l'hiver) et un pic généralement moins conséquent en automne (8).

³ Normalized Difference Vegetation Index

Au Pays Basque, sous influence océanique, les hivers sont relativement doux, ce qui favorise la survie des différents stades des tiques et permet notamment d'observer un pic d'adultes, à la recherche d'un hôte, dès le printemps. Dans le cas contraire, il n'y aurait eu qu'un pic à l'automne avec une faible activité le reste de l'année (8,33,38).

Les estives du Pays Basque semblent tout à fait favorables à la présence de tiques d'un point de vue climatique. Aussi, le fait que la plupart des cas de *Belar Joa* soient concentrés au printemps et que quelques-uns soient observés à l'automne en estive est bien en accord avec la possible implication de ce vecteur et de ses pics d'activité.

Il semblerait que, lorsque les agnelles montent en estive, plus tard dans l'été, le troupeau soit moins atteint par la maladie. Suite à un hiver froid, le nombre d'animaux atteints par la maladie semblerait diminuer. Le climat froid pourrait être à l'origine d'une diapause plus longue, et quand les animaux arrivent en estive, ils seraient moins exposés aux tiques et donc probablement à l'agent pathogène, d'où une possible mise en place d'un début d'immunité sans signes cliniques prononcés.

Le rôle des tiques est également cohérent avec une grande différence d'incidence de la maladie d'une estive à l'autre, même très proches. La maladie semble cantonnée à des sites "bien précis". Cela peut s'expliquer par la présence de microclimats et de flore permettant la survie et la multiplication des vecteurs grâce à une humidité suffisante, ou encore par une moindre exposition de l'estive au soleil (que ce soit à cause d'ombre due à la végétation ou à cause d'un versant moins exposé au soleil).

2. Etude bibliographique des hémoparasitoses ovines

Les agents pathogènes transmissibles par des tiques responsables d'hémoparasitoses chez les Ovins sont des bactéries (rickettsies et mycoplasmes), naguère considérées comme étant des protozoaires (10), ou des parasites au sens strict, les protozoaires de l'ordre des *Piroplasmidae*.

2.1. ETIOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE ET SIGNES CLINIQUES

2.1.1. Anaplasmose à *Anaplasma ovis*

2.1.1.1. Agent infectieux

Au sein de l'ordre bactérien des *Rickettsiales*, la famille des *Anaplasmataceae* proposée par Philip en 1957 comprenait initialement trois espèces du genre *Anaplasma* : *Anaplasma marginale* et *Anaplasma centrale* chez les Bovins (respectivement responsables d'une maladie grave et d'une maladie bénigne), et *Anaplasma ovis* responsable de l'anaplasmose des Ovins et Caprins (11), nommée ainsi par Lestoquard en 1924.

Dans un article de 1979, Uilenberg *et al.* (53) proposaient l'existence d'un anaplasme, *A. mesaeterum*, autre que *Anaplasma ovis*. Cette distinction reposait, pour *A. mesaeterum*, sur une répartition intraérythrocytaire apparemment plus fréquemment centrale avec une atteinte plus grave des Ovins que des Caprins. Néanmoins, peu d'informations ont été publiées depuis, et ce nouveau taxon n'est pas reconnu unanimement par la communauté scientifique.

Nous traiterons donc de l'anaplasmose d'une manière générale (*A. ovis*) en ne tenant pas compte de cette distinction taxonomique.

L'agent responsable de l'anaplasmose chez les Ovins est une bactérie intraérythrocytaire stricte à Gram négatif.

2.1.1.2. Epidémiologie

Répartition géographique

Sous nos climats tempérés, l'anaplasmose se déclare essentiellement sous la forme de cas sporadiques. Des cas récents ont été décrits en Europe Occidentale

(44). *A. ovis* est très présent en milieu tropical où le climat est fortement favorable à ses vecteurs et où l'incidence de la maladie peut être élevée (44).

Transmission

La source de l'infection est exclusivement le sang d'un animal porteur. La transmission d'un animal à l'autre fait donc intervenir des vecteurs tels que des tiques ou encore des mouches piqueuses comme les Tabanidés, la transmission iatrogène est également possible.

Chez les tiques, *A. ovis* peut être transmis transstadialement⁴, mais la transmission transovarienne⁵ n'a jamais été mise en évidence. La transmission d'un animal à l'autre a lieu le plus fréquemment lorsque les tiques changent d'hôte durant la phase d'engorgement sanguin.

La transmission verticale intrautérine est possible. Ainsi, les anaplasmes sont capables de traverser la barrière placentaire dès le second tiers de gestation suite à l'exposition de femelles gravides réceptives (64). Les fœtus ainsi infectés sont capables de transmettre la maladie à des agneaux splénectomisés (seuls capables d'exprimer la maladie suite à une faible exposition à *A. ovis*). Ces fœtus peuvent également s'anémier, et dans certains cas mourir *in utero* (14).

Animaux atteints

A. ovis peut infecter les Ovins et les Caprins. Les Caprins sont plus sensibles et expriment fréquemment des symptômes, ce qui n'est observé chez les Ovins que sous certaines conditions (de stress ou d'immunodépression). Sans ces conditions, l'infection reste subclinique.

Comme chez les Bovins, les adultes sont plus sensibles à la maladie que les jeunes (44).

Un animal infecté est immunisé contre de nouvelles infections car il reste porteur à vie (44), mais il sera également une source potentielle d'infection pour les autres animaux.

⁴ Transstadialement signifie d'un stade de développement à l'autre (de la larve à la nymphe ou de la nymphe à l'adulte).

⁵ Une transmission transovarienne est une transmission d'une génération à l'autre (de la femelle adulte à ses œufs).

A notre connaissance, aucune espèce de ruminant sauvage d'Europe n'a été décrite comme réservoir possible pour *A. ovis*.

2.1.1.3. *Pathogenèse*

La bactérie se multiplie au rythme d'un doublement du nombre d'érythrocytes infectés, toutes les 24 à 48 heures. Ainsi, il faudra 2 à 6 semaines avant que la maladie n'apparaisse, sur le plan clinique (44), le taux de globules rouges infectés étant alors supérieur à 15%. Cependant, chez la plupart des animaux, ce taux n'est jamais atteint et la maladie reste silencieuse.

Les hématies parasitées sont par la suite phagocytées, ce qui entraîne leur destruction et la libération de molécules inflammatoires. L'anémie et la fièvre en sont les principales conséquences (44).

2.1.1.4. *Description clinique*

L'anaplasmose ovine est, dans la plupart des cas, une infection subclinique. Son impact économique, relativement faible, est lié à une réduction du gain de poids quotidien par rapport à des animaux non infectés (28).

Par ailleurs, en dehors de la sensibilité individuelle, plusieurs facteurs peuvent favoriser l'apparition d'un épisode clinique d'anaplasmose, comme par exemple une maladie intercurrente ou un stress important (28). Cet épisode, qui dure de 1 à 2 semaines, est le plus souvent caractérisé par une hyperthermie modérée (autour de 40°C), de l'anorexie, de l'anémie (d'où des muqueuses pâles) et parfois même de l'ictère, des modifications de consistance fécale (constipation suivie de diarrhée), une importante fatigabilité à l'effort, ainsi que des fréquences cardiaque et respiratoire augmentées (14,35). La rémission de l'anémie peut durer jusqu'à 3 à 4 mois.

L'anaplasmose peut être à l'origine de troubles de la reproduction chez les béliers. Ces troubles seraient dus à une dégradation de la fonction testiculaire qui commencerait 7 à 8 semaines après l'infection par *Anaplasma ovis* (30). Ces troubles du sperme seraient dus à l'hyperthermie associée à une hypoxie des tissus (les fonctions gonadiques des mammifères mâles sont sensibles à des augmentations de température). Suite à un traitement adéquat, près de 5 mois ont été nécessaires avant de retrouver la qualité du sperme antérieure à l'infection.

L'anaplasmose ne semble pas avoir de conséquences sur la reproduction des brebis. Ainsi, contrairement aux Bovins, cette maladie ne serait pas responsable d'avortements (sauf cas de mort du fœtus *in utero*).

2.1.2. Ehrlichiose à *Anaplasma phagocytophilum*

2.1.2.1. Agent infectieux

Cette bactérie à Gram négatif, également de l'ordre des *Rickettsiales* (famille des *Anaplasmataceae*), n'a été incluse dans le genre *Anaplasma* que récemment (6). Précédemment, elle faisait partie du genre *Ehrlichia* (anciennement *Cytoecetes*). En fait, il y avait alors trois espèces bactériennes distinctes: *Ehrlichia phagocytophila* (responsable d'ehrlichiose notamment chez les ruminants), *Ehrlichia equi*, et l'agent de l'EGH (Ehrlichiose Granulocytaire Humaine). Ces espèces viennent d'être réunies sous une seule et même espèce, *A. phagocytophilum* (11).

Néanmoins, ce classement pourrait de nouveau être reconsidéré comme il a été proposé par Inokuma *et al.* en 2001 (23) sur des considérations génomiques, selon lesquelles les trois espèces citées constitueraient un groupe proche mais différent d'*Anaplasma*. Ces auteurs font également remarquer que ces espèces, anciennement du genre *Ehrlichia*, parasitent principalement les granulocytes, tandis que celles du genre *Anaplasma* ont pour cible les érythrocytes.

Notons que l'espèce *A. phagocytophilum* serait constituée par quatre variants génétiques qui pourraient se distinguer par leurs biologie, écologie et surtout pathogénie (51). Ainsi, l'un de ces variants serait à l'origine d'une atteinte clinique plus grave et serait impliqué dans la majorité de cas mortels chez les agneaux (en Norvège). Ce variant serait par ailleurs le seul à survivre dans la phase de persistance, lors d'infection par plusieurs variants (51). Par ailleurs, trois souches différentes de la bactérie avec certains antigènes communs ont été distinguées (57).

2.1.2.2. Epidémiologie

Répartition géographique

L'Ehrlichiose ovine à *A. phagocytophilum* a été répertoriée au Royaume-Uni, en Irlande, en Scandinavie, en Suisse, en Italie, et plus récemment en Espagne,

notamment dans le Pays Basque espagnol (25,44). Il est vraisemblable que la zone de répartition est plus large que les pays dans lesquels elle a été répertoriée. Cet agent pathogène n'a jamais été identifié sur des Ovins en France.

Transmission

Comme pour *A. ovis*, *A. phagocytophilum* ne peut être transmise que par l'intermédiaire d'un vecteur, mais dans ce cas, seules les tiques de l'espèce *Ixodes ricinus* semblent capables de transmettre la bactérie (44). La saisonnalité de la maladie coïncide avec la période d'activité de ce vecteur. Dans nos régions, les deux pics d'activité sont au printemps–début d'été, et en automne. Comme pour l'anaplasmose, il peut y avoir une transmission entre les stades de développement d'*I. ricinus*, mais pas d'une génération à l'autre. Une tique donnée doit donc préalablement s'infecter sur un animal hôte porteur pour être contaminant. Un très petit nombre de tiques suffisent à l'infection des Ovins. Cependant, plus les tiques sont nombreuses à se nourrir sur un même individu, plus la transmission d'*A. phagocytophilum* depuis l'animal infecté vers les tiques est efficace (42). Ce phénomène est dû à la salive des tiques qui provoque un afflux de granulocytes neutrophiles (principales cellules hôtes de la bactérie) au niveau de la peau.

Animaux atteints

Les Ovins, les Bovins, les Cerfs, ainsi que les Chevaux et les Chiens peuvent être atteints. Certains d'entre eux, notamment les espèces sauvages, sont considérés comme un cul-de-sac épidémiologique pour *A. phagocytophilum*.

Les Ovins sont réceptifs quel que soit leur âge (44), mais les jeunes le sont davantage. L'immunité maternelle passive transmise à l'agneau est insuffisante pour le protéger totalement de l'infection, bien qu'elle permette de diminuer l'intensité de la maladie (47) jusqu'à l'âge de 2 semaines. Après la disparition de cette immunité, les agneaux sont plus sensibles à l'infection, d'où une atteinte plus sévère (46). Cependant, au-delà de la période couverte par l'immunité passive, plus ils sont âgés, moins ils sont sensibles à l'infection (2).

Le principal facteur de risque est le mouvement d'animaux de zones saines vers des zones d'enzootie. Un animal infecté reste porteur à vie, et le cycle d'*I. ricinus* dure trois ans, ce qui participe à la pérennisation du cycle infectieux (44).

Dans les zones d'enzootie, l'atteinte est généralement peu sévère, mais l'infection peut être à l'origine d'avortements et de perte importante de poids chez les agneaux. Les cas mortels sont peu nombreux (bien que plus élevés que chez les Bovins), et le plus souvent associés à une maladie intercurrente (44). Une létalité directe élevée est néanmoins possible, qui serait expliquée par la différence de virulence entre les variants d'*A. phagocytophilum* (50).

2.1.2.3. Pathogenèse

A. phagocytophilum est une bactérie intracellulaire stricte qui, comme son nom l'indique, infecte principalement les granulocytes (surtout les neutrophiles) mais également les monocytes. Pourtant, les polynucléaires neutrophiles au pouvoir bactéricide élevé et à la demi-vie vasculaire très brève (6 à 12 heures) ne semblent pas être, à première vue, des hôtes de choix pour des bactéries. Mais, l'espèce *A. phagocytophilum* est capable de survivre dans les neutrophiles grâce à des mécanismes d'inhibition de la fusion phagolysosomiale (18), et grâce à sa capacité à retarder leur apoptose. Ces mécanismes permettent à l'agent pathogène de se multiplier dans ces cellules, et donc de survivre chez l'animal, sans risque d'une mort précoce des cellules qui l'hébergent.

L'infection intracellulaire par la bactérie entraînerait, à terme, une destruction des cellules infectées, et serait responsable d'une neutropénie prolongée (2 à 3 semaines)(29). Aussi, dès le début de l'infection, les cellules infectées subissent une altération de leurs fonctions (58).

Une autre conséquence importante sur le système immunitaire est une lymphocytopenie touchant les deux types de lymphocytes (T et B) et apparaissant 6 jours après l'infection (59). Ainsi, l'action d'*A. phagocytophilum* sur le système immunitaire (cellulaire et humoral) favorise le développement d'autres infections comme les pyohémies staphylococciques, les pneumonies bactériennes et virales, le *louping-ill* (35), ou encore l'ecthyma contagieux chez les agneaux (19). Les animaux porteurs d'*A. phagocytophilum* déclareraient un ecthyma plus sévère, avec un portage viral plus long et une réponse en anticorps plus faible (19).

2.1.2.4. *Description clinique*

La présence de la bactérie dans le sang circulant est responsable d'une hyperthermie élevée, symptôme principal lors de reproduction expérimentale de l'affection.

Cette fièvre a d'ailleurs donné le nom anglais de la maladie, *tick-borne fever (TBF)*, ou "fièvre transmise par les tiques". Cette maladie peut prendre différentes formes selon le type d'individu atteint.

Ovins non gravides et non immunisés

Suite à une primo-exposition naturelle aux tiques, la maladie se déclare généralement après 4 à 8 jours sous la forme d'un syndrome fébrile avec un pic d'intensité en tout début d'évolution clinique. Le symptôme essentiel est une forte hyperthermie pouvant dépasser les 41°C et persistant une à deux semaines (44). Dans cette phase, on peut également observer une baisse importante de l'appétit et de la production laitière, avec des animaux généralement apathiques, et une fréquence cardiaque et respiratoire élevées (35). Une toux (35), des tremblements et une légère diarrhée ont également été décrits (20).

L'infection peut également se présenter sous une forme subclinique. Chez des agneaux pâturant sur une parcelle où aucun cas clinique de la maladie n'avait été détecté jusqu'alors, 60% d'entre eux ont été infectés par *A. phagocytophilum*. L'infection s'est soldée par une réduction du gain de poids moyen de 3,8 kg sur 4 mois environ (49).

Certains cas mortels sont dus à l'effet délétère d'*A. phagocytophilum* sur le système immunitaire de son hôte. Chez les jeunes agneaux, la pyohémie à staphylocoque est une complication fréquente de l'ehrlichiose, responsable de polyarthrites. Les complications respiratoires sont également possibles (35).

L'ehrlichiose à *A. phagocytophilum* peut rendre les béliers temporairement infertiles (44). Les raisons de cette infertilité pourraient être les mêmes que celles vues précédemment pour l'infection par *Anaplasma ovis*.

Ovins gravides non immunisés

L'infection par *A. phagocytophilum* conduit fréquemment à un avortement et la létalité chez ces individus peut parfois être élevée (35). Rappelons qu'une forte fièvre peut être à l'origine d'avortements.

Ainsi, en Espagne, depuis sa première description (25), *A. phagocytophilum* a été associé à des avortements dans certaines zones montagneuses du Pays Basque (16). Sur 206 cas d'avortement dans 86 exploitations différentes, *A. phagocytophilum* a été détecté, par la lecture d'étalements sanguins, dans 16% de ces exploitations. Le principal facteur de risque associé a été l'arrivée de femelles gravides non immunisées sur des pâtures infestées d'*I. ricinus*. L'agent pathogène était dans 25% des cas associé à un autre agent abortif, ce qui tend à confirmer l'action immunosuppressive d'*A. phagocytophilum* (16).

Ovins immunisés

Chez les animaux ayant déjà été infectés par *A. phagocytophilum*, en cas de réinfection, on pourra parfois observer de la fièvre ainsi que des signes cliniques atténués, malgré l'immunisation et le portage à vie (2). Les avortements chez ces animaux restent extrêmement rares.

2.1.3. Epérythrozonose à *Mycoplasma ovis*

2.1.3.1. Agent infectieux

Mycoplasma ovis est une bactérie à Gram négatif, parasite des hématies chez les Ovins. Connue sous le terme d'*Eperythrozoon ovis*, elle a été décrite pour la première fois par Neitz *et al.*, en 1934, et a longtemps été classée dans l'ordre des *Rickettsiales* (11). Mais, en 2004, une analyse génomique de l'ARNr 16S est venue bouleverser ce classement, en révélant qu'il s'agissait en fait d'une bactérie de l'ordre des *Mycoplasmatales* (40). Le nouveau nom retenu est donc *Mycoplasma ovis*. Comme les autres membres de ce genre bactérien, il s'agit d'une bactérie sans paroi. Elle a également la caractéristique de n'avoir jamais pu être isolée en culture jusqu'à ce jour. L'observation de différences de gravité entre les aires géographiques de la maladie, a conduit à postuler qu'il existerait différentes souches.

Chez les Ovins infectés, ce mycoplasme est localisé principalement en surface des hématies. On parle d'espèce hémotrope épi-érythrocytaire (d'où son ancienne dénomination d'*Eperythrozoon*). Il peut également être retrouvé libre dans le plasma.

2.1.3.2. *Epidémiologie*

Répartition géographique

L'épérythrozonose a une large répartition géographique, on la retrouve en effet sur les cinq continents. En Europe, elle est décrite dans plusieurs pays comme la Grande-Bretagne, la Norvège, ou encore la France (44). Au sein d'un troupeau infecté, la maladie évolue sous une forme enzootique (3).

Transmission

M. ovis peut être transmis par n'importe quel vecteur permettant le transfert de sang infecté (44), notamment par les tiques. L'infection peut également être transmise par des insectes hématophages, considérés les principaux vecteurs naturels, mais aussi de façon iatrogène par des pratiques comme la vaccination, le bouclage à l'oreille ou simplement la tonte.

Un seul globule rouge parasité est suffisant pour infecter un animal sain (36), ce qui explique la facilité avec laquelle cette maladie peut être transmise.

La transmission verticale, bien que suspectée, n'est pas démontrée chez les Ovins. L'épérythrozonose est parfois responsable d'une diminution de poids à la naissance d'agneaux nés de mères infectées (34). Le passage par voie transplacentaire a été mis en évidence chez les Porcins (44).

Animaux atteints

Outre les Ovins, plusieurs espèces de Mammifères peuvent être atteintes par l'épérythrozonose : les Porcins, les Bovins, ou encore certaines espèces sauvages comme les Cervidés. Cependant, le germe est très spécifique de l'espèce hôte qu'il infecte, et chaque espèce a son propre agent de l'épérythrozonose. Ainsi, toutes ces espèces citées ne représentent pas un réservoir potentiel pour *M. ovis* (44). La bactérie peut être transmise aux Caprins, bien que sur le terrain cela soit peu fréquent en raison d'une moindre réceptivité, et d'une moindre affinité des arthropodes vecteurs pour cet hôte (36).

En fait, le principal réservoir pour l'infection sont les animaux infectés qui restent porteurs asymptomatiques de la bactérie à vie, étant ainsi immunisés. Une réactivation de l'infection peut néanmoins avoir lieu à la faveur d'un stress, ou expérimentalement lors d'une injection de Dexaméthasone (21).

La maladie provoquée par ce mycoplasme touche essentiellement les agneaux. La race Mérinos y serait davantage réceptive et sensible. Les plus jeunes individus sont cependant protégés par les anticorps maternels du colostrum et du lait, et ce jusqu'au sevrage (5). Les agneaux sevrés sont par conséquent les plus durement atteints par cette maladie.

2.1.3.3. *Pathogenèse*

Lors d'infection expérimentale, les symptômes apparaissent après 1 à 3 semaines d'incubation. Le début d'infection est caractérisé par une période de 5 à 10 jours d'intense bactériémie (avec l'éventuelle apparition de signes cliniques), puis une anémie se met en place, et la quantité de corps bactériens dans le sang diminue (44).

L'infection expérimentale des Ovins conduit à trois situations différentes concernant la formule sanguine (21). Certains individus résistent à l'infection sans aucun signe d'atteinte hématologique. D'autres animaux parviennent à contrôler la bactériémie et donc à limiter ses effets; après une faible chute, le comptage érythrocytaire revient rapidement à la normale. Enfin, une troisième catégorie d'individus est incapable de contrôler cette bactériémie, et une anémie modérée s'installe alors et peut durer plusieurs mois. La régression de l'anémie se fait avec l'apparition cyclique de pics d'anémie de plus en plus faibles, conséquence de phases de bactériémie récurrentes.

L'anémie serait principalement due à une phagocytose dans la rate des hématies infectées (44). Chez les Bovins (17), les parasites sanguins en surface des hématies seraient responsables d'une altération de la membrane cellulaire. Des antigènes normalement inaccessibles seraient ainsi exposés au système immunitaire, entraînant la formation d'autoanticorps, eux-mêmes responsables de la destruction des érythrocytes et donc de l'anémie.

L'infection par *M. ovis* s'accompagne d'une hypoglycémie plus ou moins sévère selon le degré de bactériémie. Cette hypoglycémie serait due à une consommation directe du glucose par la bactérie (4).

2.1.3.4. *Description clinique*

L'expression clinique de la maladie est souvent liée à la présence d'un facteur débilitant, stress ou maladie intercurrente (comme, par exemple, une parasitose

interne à *Haemonchus*). En l'absence de ces facteurs favorisant, l'infection reste le plus souvent subclinique (44).

L'épérythrozonose est, dans la plupart des cas, une infection asymptomatique, avec simplement une anémie transitoire, et sans aucun effet sur le gain de poids (41).

Un épisode clinique d'épérythrozonose se manifeste le plus souvent par une fièvre modérée et un affaiblissement important avec intolérance à l'effort, puis par l'apparition progressive d'une anémie (muqueuses pâles) (27,44). Les performances de croissance et de production de laine sont réduites d'où un certain impact économique (26). Dans certains cas apparaît un subictère (27).

Néanmoins, cette dernière manifestation de la maladie reste peu fréquente. Elle correspond à la forme sévère de l'infection en association avec une hémoglobinurie possible, et une létalité plus ou moins rapide (44). Dans ces circonstances, des pertes atteignant jusqu'à 30% du troupeau ont été observées (27).

Alors que chez le Porc, l'épérythrozonose à *Mycoplasma suis* est responsable d'une immunodépression, ce phénomène n'a jamais pu être prouvé chez les Ovins, contrairement au cas de l'ehrlichiose.

Cette maladie n'a pas été décrite comme responsable d'avortements.

Au final, l'épérythrozonose est une infection généralement subclinique et touchant principalement les jeunes.

2.1.4. Babésioses à *Babesia ovis* et *Babesia motasi*

2.1.4.1. Agents parasites

Babesia ovis et *B. motasi* ont été dénommés ainsi respectivement par Starcovici (en 1893) et par Wenyon (1926). Ces agents pathogènes font partie de la famille des *Babesiidae* (ordre des *Piroplasmidae*). Ce sont des hémoprotozoaires, parasites des hématies chez les Ovins et Caprins (*B. ovis* très rare chez ces derniers). On peut également parler de piroplasmies, nom venant de leur forme particulière (poire), reconnaissable au microscope dans les érythrocytes.

Ces deux espèces de piroplasmes se distinguent principalement par leur pathogénicité, qui est moindre dans le cas de *B. motasi* malgré un degré de parasitémie bien plus important (14). Les deux espèces semblent assez proches sur le plan génétique, partageant 91,5% de similitude (39).

2.1.4.2. *Epidémiologie*

Répartition géographique

B. ovis est largement présent en Europe, mais également en Afrique du Nord, au Moyen-Orient, et en Asie centrale. En France, ce parasite a été principalement observé dans le Midi, plus particulièrement dans le Sud-Ouest (Lot, Haute-Garonne, Aude, Pyrénées-Orientales) et dans les Alpes (14).

B. motasi peut être rencontré essentiellement en Europe du Nord (Allemagne, Pays-Bas, Suède, Ecosse) ainsi qu'en France (même zone de répartition que *B. ovis*), et dans les pays d'Europe de l'Est (14). Peu présente au Proche-Orient, cette espèce est largement dominante en Inde.

Récemment, ces deux espèces ont été détectées dans le Pays Basque espagnol avec, toutefois, une prévalence bien inférieure à celle du genre *Theileria* (§ 2.1.5.) (39).

Une étude menée en Catalogne espagnole (Delta de l'Ebre, Côte méditerranéenne, moyenne montagne) a, par ailleurs, révélé des prévalences de *B. ovis* bien plus élevées dans la dernière zone située entre 600 et 1100m, et boisée de pins, chênes et hêtres (12). Cette constatation est à mettre en relation avec l'écologie du vecteur.

Transmission

Les deux espèces du genre *Babesia* touchant les Ovins sont transmises exclusivement par des tiques. Alors que les espèces du genre *Rhipicephalus* (*R. bursa* notamment) peuvent transmettre les deux espèces de *Babesia*, *Haemaphysalis punctata* ne serait vecteur que de *B. motasi*. *H. punctata* est principalement retrouvée dans les zones de maquis (genêts, bruyère...) (39), *R. bursa* serait quant à elle plutôt présente dans des zones d'altitude moyenne sous influence méditerranéenne (climat et végétation secs) (*supra*) (62,12).

Par ailleurs, alors que *B. ovis* ne peut être transmis que par le stade adulte de *R. bursa*, *B. motasi* peut être transmis quel que soit le stade de développement de la tique (larve, nymphe, ou adulte). Le pic d'activité des *R. bursa* adultes est en fin de printemps–début d'été. Une préimmunisation des animaux est possible s'ils ont été infestés par des larves de cette même tique pendant l'hiver (62).

De plus, la transmission transovarienne a été démontrée. L'infection par les piroplasmés peut être transmise d'une génération de tiques à l'autre (et même sur deux générations) sans qu'il n'y ait de repas sanguin entre temps (14).

Chez les Bovins, lorsqu'une mère gravide est infectée par un protozoaire du genre *Babesia*, il n'y a pas de transmission au fœtus *in utero* (44). Il en est très certainement de même chez les Ovins.

Animaux atteints

Dans les conditions naturelles, *B. ovis* infecte les Ovins et très exceptionnellement les Caprins. *B. motasi* serait plus fréquemment rencontrée chez les Caprins que *B. ovis* (14). Dans les deux cas, il n'existe pas d'hôte sauvage du piroplasmé, donc pas de réservoir sauvage potentiel.

Le caractère enzootique de l'infection dans certaines zones géographiques s'explique non seulement par une transmission transovarienne des protozoaires chez les tiques, mais surtout par l'existence d'animaux infectés immunisés et porteurs asymptomatiques pendant plus de deux ans chez les Ovins, voire à vie s'il y a réinfection par la suite (22).

Dans ces zones d'enzootie, à forte pression parasitaire, la babésiose à *B. ovis* peut réapparaître chaque année dans un même troupeau malgré la présence de l'agent pathogène en permanence. Cette évolution enzootique est différente de celle rencontrée chez les Bovins, pour lesquels un équilibre s'installe entre pression infectieuse et immunité (l'immunité du veau prenant le relais de celle fournie par le colostrum maternel) (62). L'infection par *B. ovis* touche principalement les jeunes animaux de plus de 3 mois (14,61) n'ayant pas encore rencontré l'agent pathogène. En dessous de cet âge, ils sont protégés par les anticorps maternels.

La réceptivité et la sensibilité des animaux dépendent, par ailleurs, de la race concernée, mais aussi de l'existence d'une co-infection par *Mycoplasma ovis* qui peut inhiber une infection par *B. ovis* (14).

L'infection par *B. motasi* est souvent asymptomatique lorsqu'elle survient sur un animal sain (14). Seule une baisse d'immunité de l'hôte peut permettre l'expression de la maladie.

2.1.4.3. Pathogenèse

Chez les Ovins, on retrouve principalement les protozoaires dans les vaisseaux périphériques où ils se multiplient pour atteindre un pic, après 1 à 3 semaines d'incubation.

Le principal effet pathogène d'une infection par les piroplasmes est une hémolyse intravasculaire des hématies parasitées, beaucoup plus sévère dans le cas de *B. ovis* comparé à *B. motasi*. L'anémie hémolytique peut conduire à la mort par anoxie dans les cas les plus aigus (44). Lors d'infection par *B. ovis*, outre l'hémolyse intravasculaire, une phagocytose des hématies, parasitées ou non, a lieu dans le foie et la rate (22).

En conséquence apparaissent un ictère et une hémoglobinurie, fréquents lors d'infection par *B. ovis* et rares dans le cas de *B. motasi* (14,44).

Par ailleurs, l'infection par *B. ovis* serait responsable d'une altération de la réponse immunitaire (lymphocytopénie), favorisant ainsi l'action pathogène d'autres agents infectieux (22,39).

Lors d'infection par *B. ovis*, certains sujets sont atteints d'une encéphalite non purulente, d'un œdème pulmonaire aigu, d'une endocardite hémorragique, d'une nécrose hépatique centrolobulaire, ainsi que d'une nécrose tubulaire aiguë avec syndrome de choc rénal. Ces lésions seraient responsables, davantage que l'anémie, de la mort de l'animal (22).

2.1.4.4. Description clinique

La babésiose à *B. motasi* aurait comme seule expression clinique une anémie d'intensité modérée (14). Si certains cas sévères ont été décrits, il se peut qu'ils aient été attribués à ce piroplasma par erreur. Il n'est pas rare, en effet, que les deux espèces du genre *Babesia* cohabitent chez un même hôte. La parasitémie de *B. motasi* avait une bien plus importante que celle à *B. ovis*, ce qui facilite la mise en évidence de *B. motasi* (14).

B. ovis est responsable d'une atteinte clinique sévère. Les premiers signes cliniques observés sont généralement évocateurs d'une pneumonie aiguë (toux,

jetage muqueux voire muco-purulent...) (14). Le syndrome fébrile intense est caractérisé par une forte hyperthermie pouvant atteindre 42°C. L'état général est très atteint avec des animaux apathiques, anorexiques, ne ruminant plus, et ayant une production de lait diminuée. Les fréquences cardiaque et respiratoire sont augmentées (44). Les muqueuses sont très pâles, ou avec un ictère sévère. L'urine est rouge sombre voire marron (hémoglobinurie).

Les animaux les plus sévèrement atteints peuvent mourir après à peine 24h d'évolution clinique. Les survivants mettront plus de 3 semaines à se remettre complètement de l'anémie et de l'amaigrissement.

La fièvre pourra être responsable d'avortements chez les femelles gravides.

2.1.5. Theilérioses à *Theileria lestoquardi* et *Theileria ovis*

2.1.5.1. Agents parasites

Le genre *Theileria* fait partie de la famille des *Theileriidae* (ordre des *Piroplasmidae*). Comme les espèces du genre *Babesia*, il s'agit de piroplasmies. Ces protozoaires sont observés dans les hématies. Mais, ils sont surtout présents dans les lymphoblastes, au sein des nœuds lymphatiques, sous la forme de schizontes (corps bleus) (10).

Une grande confusion a longtemps régné sur la classification des espèces du genre *Theileria* chez les Ovins. Les descriptions sont insuffisantes et imprécises (10). La diversité génétique de ces protozoaires a été récemment soulignée dans le Pays Basque espagnol (39).

Classiquement sont distinguées, la theilériose maligne à *Theileria lestoquardi* (anciennement *hirci*, Dschunkowski 1924), et la theilériose bénigne à *Theileria ovis* (Rodhain 1916) ou à *T. recondita* (10). Dernièrement (39), les espèces *Theileria* sp. OT1 et *Theileria* sp. OT3 ont été identifiées dans le Pays Basque espagnol. La première de ces espèces serait extrêmement proche génétiquement de *Theileria* sp. China 1 (ce seraient deux souches différentes d'un même taxon). Cette dernière a été incriminée dans des cas très sévères parfois mortels en Chine. Il semblerait cependant que *Theileria* sp. OT1 et OT3 soient peu pathogènes car leur prévalence est extrêmement forte (autour de 30% chacune) et resterait asymptomatique (39).

2.1.5.2. *Epidémiologie*

Répartition géographique

T. lestoquardi, espèce fortement pathogène, est principalement rencontrée dans le bassin méditerranéen (comprenant uniquement la partie sud-est de l'Europe), ainsi qu'au Moyen-Orient et en Inde. Elle ne semble pas avoir été, jusqu'à ce jour, décrite en France (10).

T. ovis, peu pathogène, est très largement répandue. On la retrouve en effet en Europe (y compris dans le midi de la France, en Allemagne, au Pays de Galles...), au Moyen-Orient, et dans certains pays d'Afrique et d'Asie (35). *T. recondita* aurait une aire de répartition exclusivement nord européenne. Mais les informations recueillies à son sujet sont contradictoires. Pour certains, il s'agirait de la même espèce que *T. ovis*, alors que d'autres les distinguent... (10,13) Pour simplifier, nous considérerons indistinctement ces deux espèces sous le nom de *T. ovis* étant donné qu'elles sont identiques du point de vue de la pathogénicité.

Pour les espèces récemment décrites (*T. sp.* OT1 et OT3, et *T. sp.* China 1), trop peu d'informations sont encore disponibles.

Transmission

Le vecteur de *T. lestoquardi* est la tique *Hyalomma anatolicum anatolicum* chez laquelle se déroule l'évolution sporogonique du protozoaire. La tique s'infecte à l'état larvaire ou nymphal. La transmission transstadiale du protozoaire est possible alors que la transmission transovarienne ne l'est pas (10).

Le vecteur de *T. ovis* n'est pas connu avec certitude. Il semblerait que dans le bassin méditerranéen ce soit *Rhipicephalus bursa*, tique la plus présente dans cette région (43,52). Chez les Ovins infectés par ce piroplasma, la transmission *in utero* a par ailleurs été mise en évidence (10).

Animaux atteints

Les Ovins ainsi que les Caprins peuvent être atteints de theilériose maligne à *T. lestoquardi* (35). Chez les Ovins, l'infection des adultes conduit à une maladie plus sévère que chez les agneaux.

La theilériose bénigne à *T. ovis* est retrouvée essentiellement chez les Ovins. Chez les Ovins, la prévalence de *T. ovis* est élevée. De nombreux animaux sont

porteurs asymptomatiques, et représentent par conséquent un réservoir important de l'infection (39). Chez les Caprins, la prévalence serait très faible. Les Caprins pourraient même ne pas être réceptifs à *T. ovis* (13).

2.1.5.3. Pathogenèse

T. lestoquardi peut être observée, en fin d'évolution clinique, dans les hématies, où elle peut prendre différentes formes. Tout au long de l'évolution clinique, l'agent pathogène peut être observé sous la forme de schizontes dans les lymphoblastes d'abord localisés aux nœuds lymphatiques, puis migrant dans divers organes comme le foie, la rate, les poumons et même parfois le sang en cas de processus infectieux aigu (10). Les lymphoblastes sont en fait des lymphocytes transformés par la présence du protozoaire dans la cellule, qui se multiplie de manière synchrone avec ce parasite (31). Les lésions associées sont une hypertrophie des nœuds lymphatiques, des suffusions hémorragiques cardiaques, de l'hépatosplénomégalie avec congestion, ainsi que des hémorragies, entre autres rénales (10).

L'infection naturelle par *T. ovis* est le plus souvent asymptomatique. Les schizontes sont moins abondants que dans le cas précédent, et les formes endo-érythrocytaires, présentes pendant une courte durée, ne concernent qu'un petit nombre d'hématies (0,1 à 0,3%), et sont essentiellement observables dans le sang du foie et de la rate (10).

2.1.5.4. Description clinique

L'infection par *T. lestoquardi* conduit, après une période d'incubation de 12 à 15 jours, à un syndrome fébrile très marqué accompagné d'une polyadénomégalie. La forte hyperthermie atteint 41°C et s'accompagne d'un état typhique. Le plus souvent les animaux atteints ne mangent plus et la perte de poids est rapide. Un jetage oculaire et nasal, et parfois du sang dans les fèces sont observés (35). Une anémie et un ictère se développent (35), bien que certains auteurs considèrent que ces symptômes ne soient pas réellement dus à la theilériose, mais plutôt à une babésiose sous-jacente non détectée (10). Ce tableau conduit, dans les cas les plus graves, à la mort en 24-48h. Le taux de létalité peut dépasser 40% (14). Sinon, la guérison est possible après 5 à 6 jours d'évolution de la maladie (10).

Cependant, un tableau subclinique de la theilériose maligne existerait dans les zones d'enzootie où il serait plus fréquent que le précédent. Cette forme consisterait en des accès intermittents de fièvre et d'anémie (35).

Dans le cas de *T. ovis*, l'infection expérimentale ne permet pas de déclencher de symptômes. Il n'est, par ailleurs, pas fait mention d'une possible apparition d'épisode clinique en cas d'immunodépression.

Lors de theilériose maligne, la forte hyperthermie peut être à l'origine d'avortements. Lors de theilériose bénigne, telle qu'elle a été observée dans le Pays Basque espagnol (39), seule la combinaison de divers piroplasmes, individuellement peu pathogènes (y compris *Babesia motasi*), pourrait être associée à des avortements.

2.2. DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

2.2.1. Identification morphologique sur étalement de sang

L'identification morphologique sur étalement de sang est la méthode de référence pour la recherche d'hémoparasites.

Theileria lestoquardi représente cependant un cas particulier, car ce piroplasma est retrouvé principalement sur des étalements effectués à partir de biopsie de tissus lymphoïdes. Mais cette dernière technique n'est malheureusement qu'assez peu sensible sur les nœuds lymphatiques, seul site aisément accessible du vivant de l'animal (35).

2.2.1.1. Site de prélèvement

Les parasites et bactéries infectent le plus souvent les érythrocytes, à l'exception d'*A. phagocytophilum* qui infecte les globules blancs, avec une préférence pour les granulocytes neutrophiles.

Les cellules sanguines infectées ou parasitées auront davantage de mal à passer dans les petits vaisseaux et capillaires, à cause de l'augmentation de taille et de la déformation dues au parasite (44). Les cellules infectées seront par conséquent davantage concentrées dans le sang capillaire, ce qui en fait le prélèvement idéal pour la détection d'agents infectieux sur étalement sanguin. Ce sang est facilement accessible, par exemple au niveau du pavillon de l'oreille externe.

2.2.1.2. Moment du prélèvement

Pour l'ehrlichiose comme pour la babésiose à *B. ovis*, le meilleur moment pour faire le prélèvement est le début de la phase fébrile.

Lors d'ehrlichiose, *A. phagocytophilum* est visible au moment de la période fébrile aiguë, mais la prévalence des bactéries intracellulaires diminue assez rapidement après la phase clinique. De plus, le nombre de neutrophiles est relativement faible à cause de la neutropénie (15,29,35,44,50). Pour *Babesia ovis*, le pic de parasitémie a lieu au moment des symptômes (44). A ce moment, la parasitémie est faible voire très faible, entre 0,2 et 7% des hématies sont infectées (14). Aussi, un étalement négatif ne permettra pas d'exclure une atteinte par *B. ovis*.

Lors d'anaplasmose, la phase clinique de la maladie est également un moment propice pour la détection de la bactérie sur un étalement sanguin (35).

Lors d'épérythrozonose, la bactériémie est plus intense avant le développement de l'anémie clinique et peut être difficile à mettre en évidence une fois les symptômes déclarés (27). Dans ce cas, il sera conseillé de prélever également des animaux en apparence sains, afin d'éventuellement détecter une bactériémie plus intense.

Lors de theilériose, le parasite est présent dans le sang uniquement en fin d'évolution clinique (10). L'étalement sanguin n'a donc que peu d'intérêt avant cette période.

2.2.1.3. Technique de coloration

La coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG), bien que donnant de très bons résultats, est peu employée car sa réalisation est longue (plus d'une heure). Les trousse de coloration rapide, telles que le RALND, fournissent d'aussi bons résultats et ne demandent que quelques minutes de réalisation.

Cette trousse de coloration rapide est conseillée notamment pour l'anaplasmose et l'ehrlichiose (44), et pourra également être utilisée pour la détection des piroplasmes (babésies et theiléries). Toutefois, les piroplasmes sont parfois visibles sans aucune coloration.

Le cas de l'épérythrozonose est particulier, du fait qu'il existe une autre coloration qui permet d'obtenir un étalement d'une sensibilité plus grande, et de pouvoir mieux détecter les formations épiérythrocytaires, notamment lors de parasitémie faible (comme c'est le cas en phase clinique de la maladie). Cette coloration est l'acridine orange (3), mais elle reste difficile à mettre en place car elle nécessite une observation au microscope précoce (dès que la coloration est terminée) avec un microscope à fluorescence. De plus, cette coloration n'est pas adaptée à la détection des autres hémoparasites étudiés qui sont intracellulaires (pas de diagnostic différentiel microscopique possible).

2.2.1.4. Caractéristiques morphologiques sur étalement sanguin

L'anaplasmose et les piroplasmoses malignes, responsables d'anémie hémolytique (anémie régénérative), ou encore l'épérythrozonose seront parfois à l'origine de l'apparition de globules rouges immatures (réticulocytes) et de corps de Howell-Jolly⁶ détectables sur les étalements sanguins.

Anaplasmose

Les anaplasmes apparaissent sous la forme de points intra-érythrocytaires, le plus souvent uniques, de 0,4 à 0,8 µm, généralement situés en périphérie du cytoplasme (10). Toutefois, dans 40% des cas, leur position est plus centrale (44).

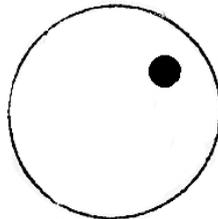


Figure 1 : *Anaplasma ovis* dans une hématie⁷

Ehrlichiose

Anaplasma phagocytophilum se situe à l'intérieur des leucocytes, principalement des neutrophiles et éventuellement des monocytes (44). Dans ces cellules, la bactérie peut soit se trouver sous la forme d'un corps élémentaire isolé dans le cytoplasme, soit sous la forme d'un amas cytoplasmique de rickettsies, également appelé "morula". Cette dernière forme est la plus fréquente.

Suite à une infection par *A. phagocytophilum*, le pourcentage moyen de neutrophiles infectés augmenterait de 0 à 50% entre le 4ème et le 6ème jour (15). Au pic de bactériémie, jusqu'à plus de 60% des granulocytes neutrophiles peuvent être

⁶ Les corps de Howell-Jolly sont des fragments nucléaires apparaissant sous la forme d'inclusions intracytoplasmiques simples, arrondies, et de taille variable. On les retrouve lors d'anémie régénérative.

⁷ D'après J. Euzéby (1988)

infectés (42,45,60). Mais cette proportion est très variable avec des valeurs relativement basses pour certains animaux (parfois 1%).



Figure 2 : Morula d' *A. phagocytophilum*
dans un polynucléaire neutrophile

Epérythrozoonose

Cette bactérie se présente sous la forme de petits anneaux, toujours très nombreux, de 0,5 à 1 μm , à centre non coloré (couleur bleu foncée lors de coloration au MGG) (10). Elle est située en périphérie ainsi qu'en surface des globules rouges (34). Par ailleurs, il est possible d'observer une anisocytose⁸ des hématies (44).

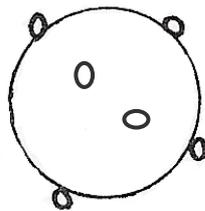


Figure 3 : *Mycoplasma ovis* sur une hématie⁹

Babésiose

⁸ Cellules de différentes tailles.

⁹ D'après J. Euzéby (1988)

B. ovis responsable de la babésiose maligne est un parasite de 1 à 2,5 μm de longueur, alors que *B. motasi* a un diamètre d'environ 4 μm (10). Dans les hématies, la forme annulaire est nettement prédominante, et se trouve en position excentrée, voire périphérique (10). D'autres formes intra-érythrocytaires plus caractéristiques mais aussi plus rares sont des éléments piriformes ou anaplasmoïdes.

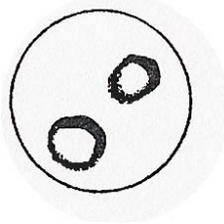


Figure 4 : *Babesia ovis*, forme annulaire, dans une hématie¹⁰

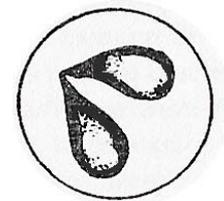


Figure 5 : *Babesia motasi* piriforme dans une hématie¹⁰

Theilériose

Les theiléries dans les hématies ont le plus souvent une forme annulaire ou ovale (85% des cas) d'environ 2 μm de diamètre. Les 15% restants sont des formes allongées pouvant prendre l'aspect évocateur de tétrades en croix de Malte (10). Pour les deux types de theiléries ovines étudiées, les formes endo-érythrocytaires sont difficiles à observer.

Les schizontes (ou corps bleus) dans les lymphoblastes, au sein des nœuds lymphatiques, sont les seules formes observables pendant la phase clinique (10). Il peut arriver, en fin d'évolution du processus aigu, que ces schizontes passent dans le sang.

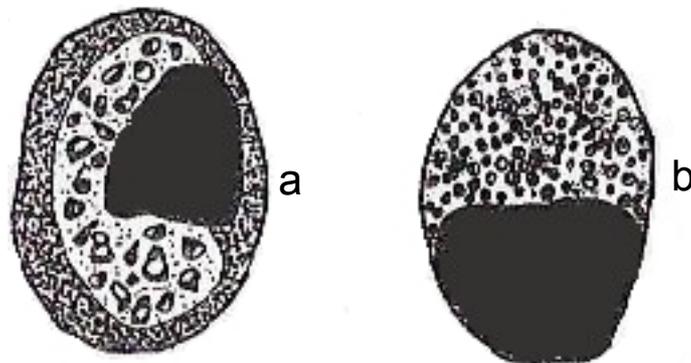


Figure 6 : Macro (a) et microschantons (b) de *Theileria* spp. dans des lymphoblastes¹⁰

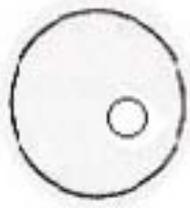


Figure 7 : Forme annulaire endoérythrocytaire de *Theileria* spp.¹⁰



Figure 8 : Forme caractéristique de tétrade en croix de Malte de *Theileria* spp.¹⁰

2.2.2. Sérologie

Cette méthode d'analyse permet de rechercher les anticorps produits chez l'hôte contre l'agent pathogène. Selon les maladies, les anticorps persistent plus ou moins longtemps dans l'organisme, et sont encore présents alors que l'agent pathogène ne l'est plus. Mais ce point peut également représenter un inconvénient car, en cas de positivité, le délai est inconnu entre l'infection et la prise de sang.

Dans la majorité des hémoparasitoses, la sérologie apparaît comme un examen de choix.

La sensibilité de ce test est, dans certains cas, relativement faible.

Pour pallier en partie ce problème de sensibilité, il est possible d'effectuer une sérologie couplée. Les animaux sont prélevés juste avant la première exposition théorique à l'agent pathogène (avant la première montée à l'estive dans notre cas), puis de nouveau quelques semaines après l'exposition aux tiques, afin de détecter une éventuelle séroconversion. Dans le cas de l'ehrlichiose, un animal infecté pendant la saison de pâture est encore séropositif à l'hiver suivant (48). En Norvège, une IFI utilisant des antigènes d'*Ehrlichia equi* a permis de mettre en évidence 60% de séropositivité (seuil au 1/40ème) chez des ovins en phase fébrile de la maladie (50). Suite à une infection expérimentale, le pic d'anticorps (IFI utilisant des lames où ont été déposés des granulocytes infectés par *A. phagocytophilum*) est observé au bout de 4 semaines, et le titre d'anticorps est toujours élevé 8 semaines après (56).

¹⁰ D'après J. Euzéby (1988)

2.2.3. Identification des acides nucléiques par PCR

Il s'agit d'une technique potentiellement très sensible permettant la détection de très faibles quantités d'agent pathogène.

Cette technique est une technique de référence, notamment pour la détection d'*A. ovis*, *A. phagocytophilum* (42), et *B. ovis* (39).

Lors d'ehrlichiose, une grande majorité d'animaux est devenue positive au bout de une à 2 semaines d'exposition à des tiques infectées (42). Par ailleurs, 11 animaux parmi les 60 étudiés (soit 18%) ont eu des phases où ils sont redevenus négatifs en PCR (42).

Dans le cas de *M. ovis*, on préfère la sérologie. En effet, l'absence de bactérie dans le sang au moment de la phase clinique rend difficile la détermination du moment opportun pour prélever le sang et pouvoir espérer y trouver des mycoplasmes.

Le problème de la détection de *T. lestoquardi* par PCR est à peu près similaire, sauf que la phase de parasitémie a lieu en toute fin d'expression clinique de la maladie.

2.2.4. La numération formule sanguine (NFS)

Il s'agit d'un examen essentiel dans l'étude des hémoparasitoses.

2.2.4.1. Anaplasmose

Cette maladie est responsable d'une anémie sévère (44). Le nombre d'hématies peut chuter jusqu'à $1,5 \times 10^9$ cellules/L (44). L'hématocrite peut, quant à lui, être abaissé à des valeurs proches de 10% (valeurs usuelles de 27 à 45%)(14).

2.2.4.2. Ehrlichiose

Le début de la phase fébrile de la maladie est caractérisé par une thrombopénie sévère (pouvant chuter à 10×10^9 PLA/L) mais passagère (20). Une moyenne expérimentale donne un minimum à 150×10^9 PLA/L, 5 jours après inoculation (20). En même temps apparaît une leucopénie, d'abord due à une lymphocytopénie précoce et transitoire (phase pendant laquelle il y a même une

légère augmentation des neutrophiles) (20), puis une neutropénie prend rapidement le relais (15,35,44,58,59).

Avant le début de la phase fébrile, dès que la PCR¹¹ est positive, les neutrophiles diminuent légèrement (de 5×10^9 à $2,4 \times 10^9$ cellules/L en moyenne) (42).

Enfin, *Anaplasma phagocytophilum* serait à l'origine d'une diminution progressive du nombre d'hématies, et par conséquent de l'hémoglobiniémie. Mais cette légère anémie est beaucoup moins marquée que celle pouvant être rencontrée dans les autres hémoparasitoses étudiées (20).

2.2.4.3. *Epérythrozoonose*

Selon les animaux, l'anémie sera soit absente, soit modérée et transitoire, soit intense et durable (21).

Dans certains cas, le nombre d'hématies baisse (44), avec une diminution de l'hémoglobiniémie de 30 à 60% (34).

Ces modifications ont généralement lieu après le pic de parasitémie précédant la phase fébrile (21), c'est-à-dire, dans certains cas, au moment de la phase d'expression clinique de la maladie.

2.2.4.4. *Babésiose*

La babésiose à *B. ovis* est à l'origine d'une anémie hémolytique sévère, avec pour conséquence une diminution marquée de l'hématocrite de 30 à 40% (62). L'augmentation du VGM¹² est due à l'arrivée de réticulocytes dans le sang remplaçant les hématies hémolysées.

L'anémie est par ailleurs accompagnée d'une leucopénie sévère (14).

2.2.4.5. *Theilériose*

La theilériose à *T. lestoquardi* est responsable d'une anémie sévère et entraîne une leucocytopénie (44).

¹¹ Polymerase Chain reaction: test servant à détecter les acides nucléiques d'un agent pathogène grâce à l'utilisation d'amorces génétiques et à l'amplification de séquences.

¹² Volume Globulaire Moyen: paramètre hématologique représentant le volume moyen des globules rouges (prenant en compte les immatures également).

2.2.5. Examens biochimiques

Les cas d'épérythrozoonose sont caractérisés par une hypoglycémie plus ou moins sévère, corrélée au degré de bactériémie (4).

Sur des cas de babésiose maligne expérimentale (63), une augmentation des enzymes hépatiques, aspartate et alanine aminotransférases (ASAT et ALAT), ainsi qu'une diminution des phosphatases alcalines (PAL), des protéines totales et de l'albumine ont été observées dans le sang. Les variations de ces paramètres reflètent une atteinte plus ou moins importante du foie, corrélée à la sévérité de l'affection. L'augmentation de l'urémie et de la créatininémie reflète, de la même manière, le degré d'atteinte des reins (63).

2.2.6. Identification et analyse des tiques

Ces examens apportent des informations intéressantes dans l'étude des hémoparasitoses.

Chez les Ovins, les tiques se situent préférentiellement dans les zones à peau fine: les oreilles, l'ars, le bas de l'abdomen et l'aine.

Une fois prélevées, il est possible d'identifier les tiques sous une loupe binoculaire. L'identification de ces arthropodes peut apporter des indications sur les agents pathogènes qu'ils peuvent transporter. Ainsi, *Mycoplasma ovis* et *Anaplasma ovis* n'ont pas réellement de vecteur arthropode spécifique, *Anaplasma phagocytophilum* est exclusivement transmise par *Ixodes ricinus*, *Babesia ovis* par les tiques du genre *Rhipicephalus*, et *Theileria lestoquardi* par *Hyalomma anatolicum anatolicum*.

Par ailleurs, notons qu'il est également possible de rechercher la présence des agents pathogènes directement sur un broyat de tique par PCR ((24) → exemple pour *Anaplasma phagocytophilum*), voire sur les glandes salivaires de celles-ci après les avoir disséquées. Une simple conservation des tiques dans de l'alcool à 70° et à température ambiante suffit (24).

3. Etude expérimentale

3.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

3.1.1. Objectifs

L'objectif était de déterminer si le *Belar Joa* sur les jeunes ovins dans les Pyrénées centrales et occidentales, dans les 1 à 3 semaines après la montée à l'estive, est due à des hémoparasites transmis par des tiques. Les hémoparasites évalués ont été les suivants : *Anaplasma* (dont ancien *Ehrlichia phagocytophilum*), *Babesia*, *Mycoplasma* et *Theileria*.

3.1.2. Matériel et méthodes

3.1.2.1. Elevages

7 élevages ont été recrutés sur la base du volontariat et de l'existence, les années précédentes, de cas cliniques répondant aux critères d'inclusion définis ci-dessous. Ces élevages ont été recrutés par le CDEO 64¹³, et/ou par des vétérinaires libéraux des Pyrénées occidentales ou centrales.

3.1.2.2. Animaux

Critères d'inclusion

- Agnelles et/ou antenaises montant pour la première fois en estive (seul critère retenu pour les prélèvements sanguins destinés à la sérologie et effectués avant la montée en estive et un mois après le dernier cas clinique)
- Animaux malades avec un ou plusieurs des signes d'appel suivants : difficultés à se déplacer et à suivre le troupeau, abattement, anorexie, amaigrissement, fatigabilité, animal « fiévreux ».
- Animaux "témoins" , apparemment sains, répondant au premier critère, mais sans aucun des symptômes précédents, et n'ayant reçu aucun traitement antibiotique.

¹³ Centre Départemental de l'Elevage Ovin des Pyrénées Atlantiques

Critères d'exclusion (non retenus pour les sérologies pré et post estive)

- Animaux ayant reçu un traitement antibiotique après la montée en estive et avant la réalisation des prélèvements.

3.1.2.3. *Prélèvements*

Avant la montée en estive

Les prélèvements de sang sur tube sec ont été réalisés à la veine jugulaire sur tous les jeunes ovins avant leur première montée à l'estive.

Après centrifugation à 4000 tours/min pendant 5 min, le sérum a été séparé dans des tubes Ependorf et congelé à -20°C, en attente d'analyse.

A l'apparition de symptômes (uniquement chez les agnelles)

Sur la zone d'estive, à l'apparition d'animaux malades, les opérations suivantes ont été effectuées :

- Renseigner une fiche d'examen clinique (annexe I).
- Prélever du sang veineux à la jugulaire sur tube sec ; centrifugation à 4000 tours/min pendant 5 min, séparation du sérum et congélation à -20°C.
- Prélever du sang veineux à la jugulaire sur EDTA et le conserver au frais.
- Prélever du sang veineux à la jugulaire sur EDTA puis congeler à -80°C, en vue d'un examen PCR.
- Faire un étalement de sang capillaire à partir d'une entaille à l'oreille avec coloration sur place.
- Faire un étalement de sang veineux prélevé sur les tubes EDTA conservés au frais.
- Si des Ovins sont porteurs de tiques, les prélever et les placer dans de l'alcool à 70° et les conserver ainsi à température ambiante.

Un mois après le dernier cas de maladie

- Prélever du sang veineux à la jugulaire sur tube sec; centrifugation à 4000 tours/min pendant 5 min. Et séparation du sérum alors mis à la congélation à -20°C.

3.1.2.4. Analyses

- Etalements de sang : identification morphologiques des hémoparasites (Philippe JACQUIET, ENVT).
- Tube EDTA réfrigéré : numération et formule sanguines avec un analyseur SCIL ABCVet (ENVT) ou un appareil IDEXX VetTest avec système d'hématologie QBCVet autoread (cabinet vétérinaire de NAY(64)) (annexe IV)
- Tube EDTA congelé : recherche d'*Anaplasma phagocytophilum* par PCR (Renaud MAILLARD, ENVA) selon une technique dérivée d'un article d'Inokuma *et al* (24) et décrite en annexe II.
- Sérum congelé : recherche des anticorps anti *A. phagocytophilum* par Immuno Fluorescence Indirecte (LDA 22). Technique décrite en annexe III (55).
- Identification des tiques (Philippe JACQUIET, ENVT)

3.2. RESULTATS

3.2.1. Epidémiologie

3.2.1.1. Environnement

Les estives sur lesquelles la maladie a été observée réunissaient des conditions favorables aux tiques avec, par exemple, une forêt ou un cours d'eau. Ainsi, dans la zone d'estive de l'élevage 1, dans lequel de nombreuses tiques ont été observées sur les Ovins, les animaux passaient régulièrement dans un sous-bois où coulait un ruisseau, pour s'y abreuver. Nous avons pu également y rencontrer, comme dans d'autres élevages, de nombreuses fougères, type de végétation convenant parfaitement aux tiques notamment en phase d'affût (tout comme les broussailles et les buissons). Dans l'élevage 2, un ruisseau coulait au milieu de l'estive.

Ces 2 estives étaient orientées au Nord, elles étaient situées entre 700 et 1300 mètres d'altitude, dans la zone du plateau d'Iraty. La frontière espagnole partage l'estive de l'élevage 2 en deux.

3.2.1.2. Répartition dans le temps

La maladie se déclare suite à la montée à l'estive, qui a généralement lieu en fin de printemps–début d'été. Les montées en estive ont eu lieu entre le 10 mai (élevage 1) et le 10 juillet 2004 (élevage 3).

Dans l'élevage 7, un cas de *Belar Joa* a eu lieu à l'automne.

3.2.1.3. Animaux atteints

- Elevage 1 : 37 agnelles dont 8 (22%) ont été malades
- Elevage 2 : 106 agnelles dont 11 (10%) ont été malades
- Elevage 3 : 42 antenaises (gravides avant l'estive) dont 23 (55%) sont redescendues vides de l'estive (§3.2.2.3.)
- Elevage 4 : 30 agnelles dont 3 (10%) ont été malades
- Elevage 5 : 30 antenaises (non gravides avant l'estive) dont 16 (53%) ont été malades

- Elevages 6 (antenaises) et 7 (agnelles) avec un cas de *Belar Joa* dans chaque

Le *Belar Joa* touche essentiellement les agnelles ou les antenaises transhumant pour la première année. Il peut néanmoins arriver, que des adultes soient atteints (notamment par le syndrome fébrile) comme ça a été le cas dans l'élevage 1, privé d'estive pendant 3 ans pour agalactie contagieuse, dont certaines adultes transhumaient pour la première fois. Une brebis adulte de l'élevage 5 a été malade alors qu'elle l'avait déjà été l'année précédente, quand elle était antenaïse.

Dans la majorité des cas néanmoins, une immunité semble se mettre en place, protégeant les animaux pour toutes les années d'estive suivantes. Néanmoins, cette immunité n'est pas totale. Certains animaux pourraient être atteints de *Belar Joa* plusieurs fois dans leur vie. Une antenaïse de l'élevage 2 avait été malade en 2003 (en agnelle), puis de nouveau en 2004. Ce second épisode clinique est apparu 38 jours après la montée (beaucoup plus tard que dans les cas "classiques"). Cette antenaïse a de nouveau rechuté 1 mois plus tard.

La morbidité moyenne du *Belar Joa* était de 19%, mais cette valeur semble différer selon le type d'animaux considérés.

Agnelles

La morbidité était comprise entre 10% (élevages 2 et 4) et 22% (élevage 1)

La létalité était de 13% dans l'élevage 1, de 36% dans l'élevage 2, mais était nulle dans l'élevage 4.

Antenaises

Dans l'élevage 5, les 30 antenaises avaient mis bas et étaient en lactation avant la montée à l'estive. Chez 16 d'entre elles (53%), un syndrome fébrile a été observé.

Dans l'élevage 3, aucune observation clinique n'a été effectuée. 55% des antenaises sont redescendues "vides" de l'estive (§3.2.2.3.).

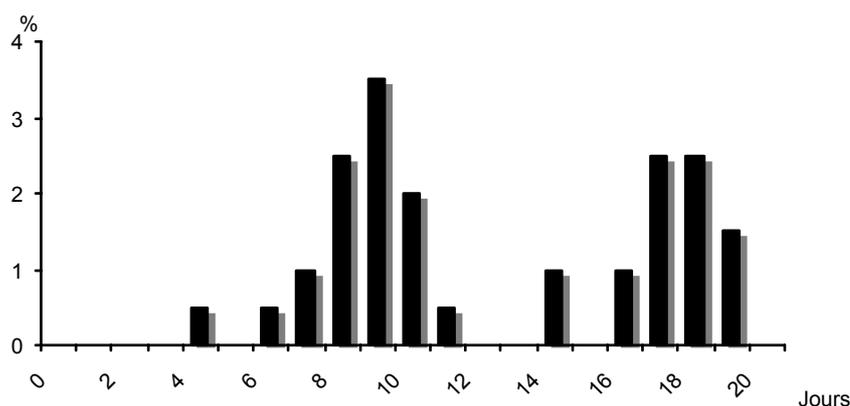
Dans ces deux élevages, la létalité était nulle.

3.2.2. Signes cliniques

En fonction des troupeaux, les animaux sont montés en estive pour la première fois, soit dans leur première année de vie (agnelles), soit dans la deuxième (antenaises). Cette différence de conduite de troupeau a plusieurs raisons d'être. Les agnelles nécessitent un suivi journalier de leurs déplacements. Les éleveurs doivent donc être présents pendant toute la période d'estive pour vérifier qu'aucune ne se soit égarée. Les antenaises nécessitent moins de surveillance car elles ne s'éloignent généralement pas du reste du troupeau.

3.2.2.1. Délai d'apparition

Sur le **graphique 1** a été reportée la proportion moyenne d'animaux touchés par la maladie en fonction du délai écoulé depuis le jour de montée en estive.



Graphique 1: Pourcentage moyen d'animaux atteints en fonction du délai entre montée à l'estive et expression de la maladie

L'expression clinique du *Belar Joa* a lieu entre quelques jours et 3 semaines après la montée à l'estive. Quelques cas ont été observés entre 4 et 8 jours, mais la majorité l'ont été entre 8 jours et 3 semaines.

3.2.2.2. Agnelles

Le premier symptôme détecté par l'éleveur est une difficulté des animaux à se déplacer. Les animaux ont du mal à suivre le troupeau (un des principaux critères

d'inclusion dans notre protocole expérimental) lors de ses déplacements, restent à l'écart, certainement à cause du syndrome fébrile.

Une forte fièvre est observée dans la majorité des cas avec des maxima de 42°C. Dans l'élevage 2, sur 7 animaux malades, la température rectale moyenne était de 40,4°C. Le syndrome fébrile est marqué avec de l'anorexie, une augmentation des fréquences cardiaque (150 battements par minute en moyenne dans l'élevage 2) et respiratoire (64 mouvements par minute en moyenne dans l'élevage 2). Un cas isolé de tremblements a été observé dans l'élevage 1.

Un jetage nasal et un écoulement oculaire ont également été observés chez 3 malades de l'élevage 2 (sur un total de 11 malades). Une pâleur des muqueuses légère à modérée a été détectée sur 4 malades.

Par ailleurs, dans les élevages 1 et 2, plusieurs animaux malades (3 et 5 respectivement) étaient atteints de lésions fortement évocatrices d'ecthyma contagieux (croûtes sur le nez, le chanfrein, ou la commissure des lèvres). Ces lésions semblaient avoir une prévalence plus forte chez les animaux affectés par le *Belar Joa*.

L'affection a parfois conduit à la mort malgré le traitement des animaux atteints. Dans l'élevage 2, 4 agnelles (2 d'entre elles ayant reçu un traitement à l'oxytétracycline longue action) sont mortes parmi les 11 atteintes.

Les symptômes du *Belar Joa* sont maximaux 2 jours après le début symptômes. La mort des animaux peut survenir également rapidement, parmi les 4 cités précédemment, 2 sont morts le jour du début des symptômes, alors que les 2 autres sont morts le lendemain.

Ni hypertrophie des nœuds lymphatiques, ni ictère n'ont été observés sur les 22 animaux observés au total dans les élevages 1, 2 et 4. De même, aucune modification des fécès ou des urines n'a été détectée, excepté dans un cas isolé de l'élevage 2, atteint de diarrhée en plus des signes plus "classiques" de *Belar Joa*.

3.2.2.3. *Antenaises*

L'affection touchant les antenaises est similaire. Les symptômes restent cependant très discrets. Seule une observation rapprochée par l'éleveur peut

permettre leur observation. Ainsi, lors de la traite, la palpation pis permet de détecter une hyperthermie.

Dans l'élevage 5, sur 5 animaux malades, la température rectale moyenne était de 41,5°C.

Chez les femelles gravides montant pour la première fois en estive, le *Belar Joa* est responsable de nombreux avortements et d'infertilité. Dans l'élevage 3, les antenaises sont montées en estive avec les béliers. La lutte a lieu dans la plupart des cas avant la mi-août, et les taux de fécondité classiques se situent autour des 80% en conduite extensive. Cependant, 23 antenaises sur 42 sont redescendues vides (diagnostic échographique mi-septembre), soit 55%. Parmi ces 23, 4 avortements ont été observés, et sur une le fœtus était momifié *in utero*.

3.2.2.4. *Béliers*

Les béliers ne semblent pas être atteints par le *Belar Joa*. Cependant, cela est très certainement dû au fait qu'ils ne sont pas montés en estive avant l'âge d'un an. Aussi, les symptômes, s'il y en a, passent probablement inaperçus.

3.2.3. Diagnostic de laboratoire

3.2.3.1. *Étalements sanguins*

Sang capillaire

Dans l'élevage 2, onze étalements ont été réalisés à partir de sang capillaire prélevé à l'oreille de 7 animaux malades et de 4 animaux "témoins". Un de ces étalements était illisible. Sur l'étalement provenant de l'agnelle malade 4055, nous avons observé un élément anaplasmoïde dans une hématie. Chez l'agnelle malade 4063, a été observée une morula d'*A. phagocytophilum* dans un polynucléaire neutrophile (photo 1).

Sur les 9 autres étalements, aucun hémoparasite n'a été détecté.



Photo 1 : Morula d'*A. phagocytophilum* dans un polynucléaire neutrophile (microscope x 1000, immersion)

Sang veineux

Dans l'élevage 2, onze étalements ont été réalisés à partir de sang prélevé à la veine jugulaire de 7 animaux malades et de 4 animaux "témoins". Deux de ces étalements étaient illisibles. Chez l'agnelle malade 4050, un corps élémentaire d'*Anaplasma phagocytophilum* a été observé dans un granulocyte neutrophile.

Sur les 10 autres étalements, aucun hémoparasite n'a été détecté.

3.2.3.2. Numération et formule sanguines

Dans les **tableaux 1 et 2** sont répertoriés les résultats des paramètres hématologiques obtenus pour 10 ovins malades et 6 témoins issus de 2 élevages (n°2 et 4).

Tableau 1: Paramètres hématologiques des agnelles de l'élevage 2.

	Ht (%)	Hb (g/dL)	GB ($\times 10^9/L$)	GN ($\times 10^9/L$)	PLA ($\times 10^9/L$)
Valeurs usuelles	[25,6–38,0]	[8,0–10,7]	[6,0–8,4]	[2,6–8,1]	[218,6–338,2]
Malades (n=7)	32,0 \pm 1,9	9,7 \pm 0,6	2,9 \pm 1,1	1,1 \pm 0,6	107,1 \pm 84,5
Témoins (n=4)	27,2 \pm 5,8	7,6 \pm 1,2	5,5 \pm 1,9	2,8 \pm 1,2	362 \pm 361,9

Ht= hématocrite; Hb= hémoglobininémie; GB= globules blancs; GN= granulocytes (essentiellement des neutrophiles); PLA= plaquettes.

Tableau 2: Paramètres hématologiques de l'élevage 4.

	Ht (%)	Hb (g/dL)	GB ($\times 10^9/L$)	GN ($\times 10^9/L$)	PLA ($\times 10^9/L$)
Valeurs usuelles	[27,0–45,0]	[9,0–15,0]	[4,0–12,0]	[0,7–6,0]	[250,0–750,0]
Malades (n=3)	29,8 \pm 6,8	9,0 \pm 2,1	5,7 \pm 0,7	2,8 \pm 0,4	192,3 \pm 63,2
Témoins (n=2)	26,6 \pm 3,7	8,6 \pm 0,8	6,8 \pm 0,3	4,0 \pm 0,1	355 \pm 137,2

Ht= hématocrite; Hb= hémoglobininémie; GB= globules blancs; GN= granulocytes; PLA= plaquettes.

1- Les animaux de l'élevage 2 sont caractérisés par :

- Une leucopénie marquée chez les malades
- Une neutropénie sévère, sans atteinte des lymphocytes, chez les malades
- Une thrombopénie marquée chez les malades
- Une anémie (taux d'Hb) légère chez les témoins

Annexe IV, **tableau 3** : parmi les 7 agnelles malades, 4 (4004, 4085, 4101 et 4105) sont en neutropénie sévère ($<0,8 \times 10^9$ GN/L), ce sont également celles qui ont eu les hyperthermies les plus marquées dans leur élevage (4101 et 4105 au-delà de 41°C). Les 3 autres malades (4050, 4055 et 4063) sont en neutropénie légère à modérée (autour de $1,5 \times 10^9$ GN/L).

Ces animaux neutropéniques ont par ailleurs une thrombopénie modérée à sévère (jusqu'à 15×10^9 PLA/L pour la 4101). Concernant les témoins, l'agnelle 4053 est en thrombopénie sévère (10×10^9 PLA/L), et la 4098 est en neutropénie modérée ($1,6 \times 10^9$ GN/L).

2- Les animaux de l'élevage 4 sont caractérisés par :

- Chez les malades, comparés aux témoins, les concentrations en thrombocytes semblent plus faibles, mais apparemment sans atteinte de la concentration en neutrophiles
- Des taux d'Hb et d'Ht à la limite inférieure pour les malades
- Une anémie (taux d'Hb et d'Ht) légère chez les témoins

Annexe IV, **tableau 4** : deux agnelles malades (4001 et 4016) sont en thrombopénie modérée à marquée, alors que deux autres (une malade (4004) et une témoin (4008)) ont un hématoците, ainsi qu'une hémoglobiniémie en dessous des valeurs usuelles. Aucune anomalie n'a cependant été relevée, dans cet élevage, sur la numération des globules blancs.

3.2.3.3. *Sérologies (Annexe V, tableaux 5 et 6)*

Ces analyses ont été effectuées sur les animaux malades des élevages 1, 2, et 5, sur les malades et les témoins de l'élevage 4, et sur les animaux de l'élevage 3 pour lesquels un avortement a été observé.

Les prélèvements de sérums ont été couplés afin de mettre en évidence une séroconversion.

Dans les élevages 2 et 3, une prise de sang a été effectuée pour chaque animal avant l'exposition (avant la montée en estive) à *A. phagocytophilum* (PS1), et une autre 4 semaines après le dernier cas clinique de *Belar Joa* dans l'élevage (PS2) dans le cas de l'élevage 2 et 2 semaines après le retour d'estive dans le cas de l'élevage 3. L'agnelle 4101, de l'élevage 2, était absente du lot au moment où les PS1 ont été effectuées (avant la montée). La PS1 a été réalisée au moment de l'expression clinique du *Belar Joa*.

Dans les élevages 1 et 4, la PS1, n'a pu être réalisée qu'au moment de l'apparition des premiers cas cliniques, 10 jours et 15 jours après la montée à l'estive respectivement. Et dans l'élevage 4, la PS2 n'a été effectuée que 6 mois après les cas de *Belar Joa*.

Dans l'élevage 5, les PS1 n'ont été réalisées que sur 2 animaux, 8 jours après la montée à l'estive. Les PS2 ont été réalisées sur toutes les antenaises.

Dans les élevages 1 et 2, on observe une séroconversion vis à vis d'*A. phagocytophilum*, entre PS1 et PS2, pour les 5 malades de chaque élevage, excepté pour la 4101 qui était déjà séropositive au moment de sa PS1.

Dans l'élevage 3, 2 des 5 antenaises ayant avorté étaient séropositives avant la montée à l'estive et après la descente. Les 3 autres ont séroconverti.

Dans l'élevage 4, toutes les agnelles (3 malades et 2 témoins) étaient séropositives en PS1 et PS2, à l'exception de la 4008 qui avait séronégativé au moment de la PS2.

Dans l'élevage 5, les antenaises 3003 et 3015 étaient séronégatives en PS1, et séropositives en PS2. Les 5 autres étaient séropositives en PS2.

3.2.3.4. Identification des acides nucléiques par PCR (Annexe VI, tableau 7)

La PCR pour rechercher *A. phagocytophilum* a été effectuée aussi bien sur les sangs d'animaux malades que sur ceux d'animaux témoins.

Les prélèvements analysés concernent 12 animaux de l'élevage 2 (7 malades et 5 témoins), 8 de l'élevage 4 (3 malades, 2 témoins, et 3 agnelles témoins non montées en estive), et 1 malade de l'élevage 7. Pour les malades, les prélèvements ont été récoltés au cours de la phase clinique de *Belar Joa*.

Toutes les PCR pour *A. phagocytophilum* sont négatives.

3.2.3.5. Identification et analyse des tiques

Des tiques ont été récoltées dans les élevages 1 et 2.

Dans l'élevage 1, elles ont été récoltées juste après la vague de cas cliniques de *Belar Joa*. Sur un total de 7 animaux, toutes les tiques recueillies appartenaient à l'espèce *Ixodes ricinus* (2 nymphes, 3 mâles adultes, et 21 femelles adultes, dont 10 à jeun et 11 partiellement ou totalement gorgées).

Dans l'élevage 2, seule une tique a pu être récoltée et identifiée, il s'agit d'une femelle gorgée de *Dermacentor* spp.

3.3. DISCUSSION

3.3.1. Epidémiologie

3.3.1.1. Environnement

Le climat humide du Pays Basque est défavorable à certaines tiques vectrices d'hémoparasites. C'est notamment le cas des vecteurs de piroplasmes que sont *Rhipicephalus bursa* (adaptée aux climats secs et à leur végétation), *Haemaphysalis punctata* (adaptée aux zones de maquis) ou encore de *Hyalomma anatolicum anatolicum* (adaptée aux climats arides ou semi-arides). Cependant, des infections par *Theileria lestoquardi* ont été rencontrées bien en dehors des limites de distribution de son vecteur habituel (*Hyalomma anatolicum anatolicum*) (14). Aussi, des espèces comme *I. ricinus* ou *Dermacentor reticulatus* pourraient être des vecteurs de *B. ovis* (10).

Sur certaines estives très exposées au Soleil, des conditions favorables aux tiques xérophiles (comme celles transmettant les piroplasmes) peuvent cependant être rencontrées.

3.3.1.2. Animaux atteints

Plus les animaux sont âgés et moins ils sont sensibles au *Belar Joa*. Dans l'ehrlichiose, la sensibilité a tendance à diminuer avec l'âge. L'anaplasmosse et la theilériose sont plus graves chez les adultes. La babésiose et l'épérythrozoonose touchent exclusivement les jeunes animaux.

Il semblerait, par ailleurs, que les antenaises soient plus réceptives, la morbidité étant plus élevée chez ces animaux. La létalité observée était marquée, ce qui peut être le cas lors d'ehrlichiose, babésiose ou theilériose.

La mise en place d'une immunité est un élément majeur de l'épidémiologie du *Belar Joa*. C'est également un élément commun aux hémoparasitoses ovines.

3.3.2. Signes cliniques

3.3.2.1. Délai d'apparition

Le délai entre la montée à l'estive (exposition aux tiques) et les premiers signes cliniques de *Belar Joa* était de 4 jours à 3 semaines. Le délai entre l'infection expérimentale et l'apparition des symptômes est de 1 à 3 semaines dans l'épérythrozonose et la babésiose, de 12 à 15 jours dans la theilériose, de 2 à 6 semaines dans l'anaplasmosse et de 4 à 8 jours dans l'ehrlichiose

L'apparition de la maladie 4 jours après la montée en estive dans certains cas, serait davantage en adéquation avec l'ehrlichiose.

3.3.2.2. Agnelles

Une hyperthermie élevée est décrite dans les cas d'ehrlichiose, ainsi que dans la babésiose à *B. ovis* et la theilériose à *T. lestoquardi*. Dans les autres hémoparasitoses, l'hyperthermie reste modérée à absente.

Le syndrome fébrile est décrit, plus ou moins marqué, dans toutes les hémoparasitoses ovines.

L'étude clinique n'est pas en faveur d'une infection par *M. ovis*. L'épérythrozonose reste le plus souvent subclinique ou l'anémie et le subictère sont d'intensité modérée.

Ni la polyadénomégalie, quasi systématique lors de theilériose, ni l'ictère et l'hémoglobinurie de la babésiose n'ont été décrites ou observées dans les cas de *Belar Joa*.

Tous les symptômes rencontrés dans le *Belar Joa* sont décrits dans l'ehrlichiose à *A. phagocytophilum*.

La prévalence élevée de l'ecthyma contagieux dans l'élevage 2 est cohérente avec une immunodépression pouvant être due à *A. phagocytophilum* ou à *B. ovis*.

3.3.2.3. Antenaises

La babésiose à *B. ovis*, la theilériose à *T. lestoquardi*, comme l'ehrlichiose pourraient être à l'origine des avortements (liés à l'hyperthermie) et des problèmes de reproduction observés chez les antenaises gravides de l'élevage 3. Ce qui n'est le cas ni de l'épérythrozonose, ni de l'anaplasmosse.

3.3.2.4. *Béliers*

Bien qu'ils ne semblent pas atteints par le *Belar Joa*, ils pourraient être atteints d'hyperthermie passant inaperçue (comme chez les antenaises) ce qui pourrait entraîner des troubles de la fertilité et de la qualité du sperme.

3.3.3. Résultats des examens complémentaires

3.3.3.1. *Étalements sanguins*

Les étalements sanguins, réalisés au début de l'épisode clinique, n'ont pas permis d'observer d'images évocatrices d'une infection par *M. ovis*, *Theileria* spp., ou *Babesia* spp.

Sur un des étalements sanguins, un unique élément anaplasmoïde a été observé. Il est donc peu probable qu'*A. ovis* ne soit responsable des symptômes observés, car au minimum 15% des hématies sont infectées lors d'un épisode clinique d'anaplasmosse (44).

Une morula et un corps élémentaire d'*A. phagocytophilum* chez deux animaux. Ce résultat semble insuffisant pour imputer le tableau clinique du *Belar Joa* à *A. phagocytophilum*. Toutefois, les animaux malades étaient atteints de neutropénie. Sur ces deux animaux, la numération de granulocytes était relativement faible ($1,6 \times 10^9$ GN/L et $2,1 \times 10^9$ GN/L).

3.3.3.2. *Numération et formule sanguines*

Les résultats de numération et formule sanguines sont compatibles avec une infection par *Anaplasma phagocytophilum*.

En effet, sur les 7 malades prélevés de l'élevage 2, la thrombopénie est modérée à sévère et sur 4 d'entre eux la neutropénie est marquée.

Sur 2 animaux des 3 malades prélevés de l'élevage 4, la thrombopénie est modérée à marquée. Or, comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique de l'ehrlichiose, une thrombopénie sévère est observée en tout début de phase fébrile et la neutropénie apparaît par la suite.

Sur les animaux témoins de l'élevage 2, également exposés aux tiques, deux d'entre eux ont les numérations de neutrophiles ont été relativement basses. Ce

résultat est cohérent avec les observations de Ogden *et al.* en 2003 (42) : le nombre de neutrophiles diminue dans le sang avant même l'apparition de la phase fébrile de l'ehrlichiose (sans pour autant atteindre le seuil de la neutropénie).

Certains animaux considérés comme témoins pouvaient être en phase préclinique. Malheureusement, l'évolution clinique n'a pas pu être vérifiée. En effet, le lendemain des prélèvements, une métaphylaxie a été mise en place sur l'ensemble des agnelles étant donné qu'il y avait déjà eu 4 agnelles mortes dans ce lot.

Une anémie légère, objectivée par une diminution de l'hémoglobinémie, a été observée sur les animaux témoins. Toutefois, ces animaux n'étaient pas cliniquement anémiés. Gokce et Woldehiwet en 1999 (20), ont montré que l'ehrlichiose à *A. phagocytophilum* pouvait être associée à une diminution marquée de l'hémoglobinémie (autour 8 g/dL), notamment chez les Ovins adultes, comme c'est le cas pour 3 des témoins.

3.3.3.3. Sérologie *A. phagocytophilum*

Les séroconversions vis-à-vis d'*A. phagocytophilum*, observées sur les agnelles et les antenaises malades, encadrent la phase clinique, ce qui suggère qu'*A. phagocytophilum* est bien l'agent responsable du *Belar Joa*.

La séropositivité en PS1 de certaines des agnelles s'explique par un prélèvement tardif, la séroconversion ayant eu lieu dans les jours suivant la montée à l'estive. C'est le cas de l'agnelle 4101 de l'élevage 2 et de toutes les agnelles de l'élevage 4. Lors d'ehrlichiose ovine, en Norvège, 60% des animaux atteints seraient séropositifs au moment de la phase fébrile de la maladie (50).

Dans l'élevage 3, une séroconversion de 3 des 5 antenaises ayant été observées en train d'avorter, suggère l'implication d'*A. phagocytophilum* dans ces avortements, et dans les mauvais résultats de reproduction affectant uniquement cette classe d'animaux.

3.3.3.4. PCR *A. phagocytophilum*

Les résultats de PCR *Anaplasma* spp. sont négatifs.

Ces résultats paraissent contradictoires avec ceux obtenus en analyse sérologique. Les résultats de la sérologie suggèrent, au moins en partie, l'existence de faux négatifs en PCR. Les raisons de ces faux négatifs apparaissent cependant difficiles à identifier précisément.

La PCR consiste en une détection d'une séquence d'acides nucléiques de l'agent pathogène. Les amorces sont spécifiques d'une portion du génome.

Après une infection expérimentale par *A. phagocytophilum*, la sensibilité du test PCR passerait de 0 à 90% entre le deuxième et le 5ème jour, la sensibilité resterait supérieure à 90% jusqu'à 14 jours, puis serait de 75% la troisième semaine, et chuterait sensiblement par la suite (15). L'hyperthermie étant observable à partir du 4ème jour, un prélèvement trop précoce pourrait expliquer quelques faux négatifs (sensibilité autour de 70%), mais pas les 20 négatifs que nous avons obtenus.

Dans une autre étude, sur des animaux positifs en PCR *A. phagocytophilum* une à deux semaines après l'infection, près de 20% sont devenus provisoirement négatifs une à trois semaines après la première positivité (42).

L'existence d'un variant d'*A. phagocytophilum* assez éloigné génétiquement sur la région amplifiée, expliquerait que les amorces utilisées n'aient pas permis de le détecter). Cependant, la PCR mise en œuvre (annexe II) utilise des amorces communes à toutes les espèces du genre *Anaplasma*. De plus, la PCR été répétée deux fois dans notre expérience afin de vérifier que tous les résultats étaient bien négatifs. L'existence d'inhibiteurs de PCR, comme l'EDTA des tubes de prélèvement ou l'hémoglobine, peut expliquer les résultats obtenus.

La PCR ne donne une indication sur la présence de bactérie qu'à l'instant t où la prise de sang est faite, contrairement à la sérologie couplée, qui permet d'évaluer rétrospectivement l'existence d'une infection.

3.3.3.5. *Identification des tiques*

La femelle de *Dermacentor* trouvée dans l'élevage 2 est capable de transmettre les hémoparasites comme *A. ovis* et *M. ovis* qui n'ont pas de spécificité de vecteur.

Ixodes ricinus (retrouvé dans l'élevage 1) est capable de transmettre, en plus des deux hémoparasites précédents, *A. phagocytophilum* dont elle serait l'unique vecteur connu à ce jour en Europe. Il aurait pu être intéressant de rechercher la présence d'*A. phagocytophilum* par PCR sur ces tiques.

Rappelons que, l'habitat dans lequel a été menée cette étude est tout à fait propice au développement des tiques de l'espèce *I. ricinus*.

3.3.4. *Imputation du Belar Joa à A. phagocytophilum*

L'examen clinique a mis en évidence un intense syndrome fébrile d'évolution rapide compatible avec une ehrlichiose à *A. phagocytophilum* ou avec une infection à *B. ovis* ou à *T. lestoquardi*. Cependant, les autres symptômes généralement rencontrés dans la babésiose (ictère, hémoglobinurie) ou la theilériose (polyadénomégalie) étaient absents, et le milieu écologique de l'étude était peu propice aux tiques vectrices des agents pathogènes.

Par ailleurs, les numérations et formule sanguines et la population importante d'*I. ricinus* rencontrée sont compatibles avec une ehrlichiose ovine.

Les examens directs sur animaux malades (étalement) sont peu convaincants ou ne corroborent pas l'hypothèse d'ehrlichiose.

En revanche, les analyses sérologiques suggèrent fortement d'attribuer le syndrome "fièvre des montagnes" ou *Belar Joa* des ovins à *A. phagocytophilum*.

Les avortements mis en évidence sur les antenaises de l'élevage 3 pourraient également être attribués à *A. phagocytophilum* sur la base des examens sérologiques.

Le rôle d'*A. phagocytophilum* dans les avortements a été évoqué régulièrement (15,16,25,35). Toutefois, en l'absence d'examens complémentaires pour évaluer les causes abortives classiques (toxoplasmose, Border Disease, fièvre Q, chlamydie...) il est difficile de conclure définitivement.

3.4. PROPOSITION DE CONDUITE A TENIR FACE A UN CAS DE BELAR JOA

La forte probabilité d'implication d'*A. phagocytophilum* dans le *Belar Joa*, le traitement de cette maladie ouvre des perspectives de maîtrise raisonnée de la maladie.

Nous allons tenter ici de déterminer quelle est la meilleure façon de l'utiliser.

3.4.1. Traitement contre *A. phagocytophilum*

A. phagocytophilum est sensible à peu d'anti-infectieux. L'oxytétracycline et les associations triméthoprime-sulfamide sont efficaces (2,35,44).

Sur le plan curatif, l'oxytétracycline simple à la dose de **20 mg/kg** au début de la maladie est efficace (2). Cependant, les rechutes sont possibles. C'est pourquoi il est conseillé d'utiliser une **tétracycline longue action** à la même dose et en une seule injection. C'est actuellement le traitement utilisé par la majorité des éleveurs. Rappelons toutefois que l'OTC LA est interdite sur les brebis dont le lait est destiné à la consommation humaine, et déconseillée chez les mâles reproducteurs chez qui il peut provoquer des troubles de la fertilité. Toutefois, les animaux cibles du *Belar Joa* ne sont habituellement pas en lactation.

Sur le plan préventif, aucun vaccin n'existe contre l'ehrlichiose ovine. L'injection d'OTC LA à la dose de 20 mg/kg à l'ensemble des animaux du lot, lors de la montée à l'estive permettrait une protection sur les 5 à 6 premiers jours de l'estive (2). La principale limite de cette mesure est que les animaux risquent d'être malades une fois la tétracycline éliminée de leur organisme, si l'exposition est décalée. Le rôle de faibles concentrations plasmatiques en OTC sur l'installation d'une immunité n'est pas connu.

Par ailleurs, pour éviter les avortements, une des mesures est de ne faire transhumer que des agnelles non gravides afin qu'elles s'immunisent. C'est la raison pour laquelle de nombreux éleveurs ont choisi de ne faire reproduire leurs animaux

qu'en antenaises une fois qu'elles se sont immunisées lors de l'estive de l'année précédente.

La métaphylaxie consiste en la mise en place d'un traitement sur l'ensemble du lot d'animaux sensibles une fois que les premiers d'entre eux ont été cliniquement atteints. On utilise encore l'oxytétracycline longue action à 20 mg/kg. Quelques rechutes mineures seraient observées après ce traitement, mais avec des symptômes beaucoup moins intenses. Il semblerait même que ces rechutes soient nécessaires à une mise en place correcte de l'immunité (2).

3.4.2. Traitement contre les tiques

Une autre possibilité de maîtrise est la lutte contre les vecteurs.

3.4.2.1. Le traitement contre les tiques

Il permet, de manière préventive, d'éviter aux animaux sensibles de contracter l'ehrlichiose. Par ailleurs, ce traitement est valable pour toutes les hémoparasitoses. La deltaméthrine (ButoxND 7,5 pour-on), utilisée à la dose de 75 mg *in toto* chez les Ovins, permet de les protéger pendant 4 à 5 semaines contre les tiques. L'amitraz (TakticND), utilisé en bains ou en pulvérisations, est acaricide, et a une rémanence de 6 semaines sur *Ixodes ricinus*. Le dimpylate (DimpygalND) est également acaricide, mais à cause de sa rémanence limitée à quelques jours, il ne présente que peu d'intérêt en utilisation préventive.

Cependant, à nouveau, le problème de l'immunité se pose. Le risque est que les animaux non exposés à l'agent pathogène restent réceptifs et sensibles. Les traitements réguliers contre les tiques sont très contraignants et difficiles à justifier économiquement.

3.4.2.2. Les méthodes écologiques

Elles visent à éviter l'exposition des animaux aux tiques, en maintenant les brebis éloignées de l'habitat des vecteurs. Il faut raisonner sur les différents biotopes qui composent la zone d'estive. Il faudrait ainsi veiller à éviter les zones boisées, proches d'un ruisseau ou ayant un tapis végétal épais (tel que des fougères ou des

buissons). Des versants très exposés au soleil (tel que l'adret) permettraient également de limiter l'infestation par ces vecteurs très sensibles à la dessiccation.

De telles mesures restent inapplicables en pratique et sont incompatibles avec le principe même de l'estive.

Conclusions

Nos observations apportent un nouvel éclairage sur l'étiologie d'une maladie connue de longue date des bergers du Pays Basque et du Béarn, le *Belar Joa*.

Il reste cependant encore à déterminer si les avortements observés chez les antenaises sont dus au même agent pathogène, à mieux connaître les éventuels réservoirs sauvages, à préciser les méthodes de diagnostic direct.

En outre, la mise en place de mesures thérapeutiques ou préventives adéquates apparaît compte tenu des contraintes sanitaires et économiques.

Par ailleurs, *Anaplasma phagocytophilum* est l'agent responsable de l'ehrlichiose granulocytaire humaine. Il s'agit donc d'un agent potentiellement responsable de zoonose pouvant être transmis à l'Homme par les tiques. Plusieurs cas faisant suite à des morsures de tiques ont été répertoriés récemment en Amérique du Nord et en Europe (35). L'infection chez l'Homme se manifeste 5 à 10 jours après la morsure de tique par une myalgie sévère accompagnée d'un syndrome pseudogrippal (35). Mais l'effet le plus important de l'infection est, comme chez les animaux, l'immunodépression pouvant conduire à de graves complications dues à des infections bactériennes ou fongiques secondaires (35).

Bibliographie

1. Barral M, Benedicto L, Gil H, *et al.* Detection of *Ehrlichia phagocytophila* DNA in *Ixodes ricinus* from areas in the North of Spain. In Rickettsiae and Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millennium. D. Raoult & P. Brouqui, 1999, Eds.: 428-31. Elsevier
2. Brodie TA, Holmes PH, Urquhart GM. Prophylactic use of long-acting tetracycline against tick-borne fever (*Cytoecetes phagocytophila*) in sheep. *Vet Rec.* 1988 Jan 9;122(2):43-4.
3. Brun-Hansen H, Gronstol H, Seltveit PH, Waldeland H. Prevalence of antibodies to *Eperythrozoon ovis* in Norwegian sheep. *Vet Med B.* 1997 44(5):295-9.
4. Burkhard MJ, Garry F. Artifactual hypoglycemia associated with hemotrophic mycoplasma infection in a lamb. *Vet Clin Pathol.* 2004;33(4):244-8.
5. Daddow KN. The protection of lambs from eperythrozoon infection while suckling *Eperythrozoon ovis* carrier ewes. *Vet Parasitol.* 1982 Mar;10(1):41-5.
6. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR, 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001 Nov;51(Pt 6):2145-65.
7. Estrada-Pena A. Distribution, abundance, and habitat preferences of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Spain. *J Med Entomol.* 2001 May;38(3):361-70.
8. Estrada-Pena A, Martinez JM, Sanchez Acedo C, Quilez J, Del Cacho E. Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Med Vet Entomol.* 2004 Dec;18(4):387-97.
9. Estrada-Pena A, Quilez J, Sanchez Acedo C. Species composition, distribution, and ecological preferences of the ticks of grazing sheep in north-central Spain. *Med Vet Entomol.* 2004 Jun;18(2):123-33.
10. Euzéby J. Les hémoprotozooses des Ovins en France. *Rev Méd Vét.* 1988; 139(1): 69-81.

11. Euzéby JP. Site internet consulté en juillet 2005. List of Prokariotic names. <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>
12. Ferrer D, Castella J, Gutierrez JF. Seroprevalence of *Babesia ovis* in sheep in Catalonia, northeastern Spain. *Vet Parasitol.* 1998 Nov 27;79(4):275-81.
13. Ferrer D, Castella J. Seroprevalence of *Theileria ovis* in small ruminants in north-east Spain determined by the indirect fluorescent antibody test. *Vet Rec.* 1999 Sep 18;145(12):346-7.
14. Friedhoff KT. Tick-borne diseases of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. *Parassitologia.* 1997 Jun;39(2):99-109. Review.
15. Garcia-Perez AL, Mandaluniz N, Barral M, Juste RA. Microscopic and PCR findings in sheep after experimental infection with *Ehrlichia phagocytophila*. *Small Rumin. Res.* 2000 Jul 1;37(1-2):19-25.
16. Garcia-Perez AL, Barandika J, Oporto B, Povedano I, Juste RA. *Anaplasma phagocytophila* as an abortifacient agent in sheep farms from northern Spain. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:429-32.
17. Goff WL, Johnson LW, Kuttler KL. *Anaplasma marginale*, *Eperythrozoon wenyoni*: lectin reactions with bovine erythrocytes. *Exp Parasitol.* 1986 Feb;61(1):103-13.
18. Gokce HI, Ross G, Woldehiwet Z. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in ovine polymorphonuclear leucocytes by *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila*. *J Comp Pathol.* 1999 May;120(4):369-81.
19. Gokce HI, Woldehiwet Z. *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* predisposes to severe contagious ecthyma (Orf) in lambs. *J Comp Pathol.* 1999 Oct;121(3):227-40.
20. Gokce HI, Woldehiwet Z. Differential haematological effects of tick-borne fever in sheep and goats. *J Vet Med.* 1999 Mar;46(2):105-15.
21. Gulland FM, Doxey DL, Scott GR. The effects of *Eperythrozoon ovis* in sheep. *Res Vet Sci.* 1987 Jul;43(1):85-7.
22. Habela M, Reina D, Navarrete I, Redondo E, Hernandez S. Histological changes in sheep experimentally infected with *Babesia ovis*. *Vet Parasitol.* 1991;38:1-12.

23. Inokuma H, Brouqui P, Drancourt M, Raoult D. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. *J Clin Microbiol*. 2001 Sep;39(9):3031-9.
24. Inokuma H, Parola P, Raoult D, Brouqui P. Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Vet Parasitol*. 2001;99:335-9.
25. Juste RA, Garcia-Pérez AL, Povedano-Fernandez. Estudio experimental de algunos patógenos transmitidos por garrapatas (*Babesia*, *Theileria*, *Cytoecetes* y *Anaplasma*) en ovejas del País Vasco. *Med. Vet*. 1986 3:431-9
26. Kabay MJ, Sunderman FM, Richards RB, Ellis TM. Naturally occurring *Eperythrozoon ovis* infection in sheep reduces wool production. *Aust Vet J*. 1992 Sep;69(9):232. *Erratum in: Aust Vet J* 1992 Dec;69(12):339.
27. Kemp B, revised by Robson S. Eperythrozoonosis in sheep. *Agfact A3.9.25, 3rd edition*. 2005 Apr.
28. Kimberling, C.V. 1988. Jensen and Swift's diseases of sheep, 3rd ed. Lea and Febiger, Philadelphia, Pennsylvania, 394 pp.
29. Kleppa KE, Stuen S. High serum folate values in lambs experimentally infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Acta Vet Scand*. 2003;44(3-4):199-202.
30. Kumi-Diaka J., Sackey A.K., Akerejola O.O. and Ogwu D. Effect of chemotherapy on semen characteristics of Balami rams infected with *Anaplasma ovis*. *Vet Res Comm*. 1988 12(2-3), 119-124
31. Leemans I, Hooshmand-Rad P, Uggla A. The indirect fluorescent antibody test based on schizont antigen for study of the sheep parasite *Theileria lestoquardi*. *Vet Parasitol*. 1997 Apr;69(1-2):9-18.
32. L'Hostis M, Dumon H, Dorchies B, Boisdron F, Gorenflot A. Seasonal incidence and ecology of the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) on grazing pastures in western France. *Exp Appl Acarol*. 1995 Apr;19(4):211-20.
33. L'Hostis M, Bureaud A, Gorenflot A. Female *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) in cattle of western France: infestation level and seasonality. *Vet Res*. 1996;27(6):589-97.

34. Martin BJ, Chrisp CE, Averill DR Jr, Ringler DH. The identification of *Eperythrozoon ovis* in anemic sheep. *Lab Anim Sci.* 1988 Apr;38(2):173-7.
35. Martin WB, Aitken ID. Diseases of Sheep 3^{ème} éd. Oxford: Blackwell Science 2000 528 pages.
36. Mason RW, Statham P. Susceptibility of sheep and goats to *Eperythrozoon ovis* infection. *Aust Vet J.* 1991 Mar;68(3):116-7.
37. Memeteau S, Seegers H, Jolivet F, L'Hostis M. Assessment of the risk of infestation of pastures by *Ixodes ricinus* due to their phyto-ecological characteristics. *Vet Res.* 1998 Sep-Oct;29(5):487-96.
38. Moreno JA, Estrada-Pena A. Prevalence and seasonal activity of *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) on domestic ruminants of the Basque country, Spain. *Exp Appl Acarol.* 1997 Jan;21(1):41-8.
39. Nagore D, Garcia-Sanmartin J, Garcia-Perez AL, Juste RA, Hurtado A. Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. *Int J Parasitol.* 2004 Aug;34(9):1059-67.
40. Neimark H, Hoff B, Ganter M. *Mycoplasma ovis comb. nov.* (formerly *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004 Mar;54(Pt 2):365-71.
41. Nicholls TJ, Veale PI, Overend D. The effect of artificial *Eperythrozoon ovis* infection on the growth rate of stressed and nonstressed sheep. *Aust Vet J.* 1989 Jun;66(6):184-6.
42. Ogden NH, Casey AN, Woldehiwet Z, French NP. Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection. *Infect Immun.* 2003 Apr;71(4):2071-8.
43. Papadopoulos B, Brossard M, Perie NM. Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 3. Piroplasms of small ruminants. *Vet Parasitol.* 1996 May;63(1-2):67-74.
44. Radostits, 8^{ème} éd. Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses -- by D.C. Blood, O. M. Radostits, C. C. Gay and K. W. Hinchcliff 2000

45. Scaife H, Woldehiwet Z, Hart CA, Edwards SW. *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. *Infect. Immun.* 2003 Apr;71(4):1995-2001.
46. Stuen S. Tick-borne fever in lambs of different ages. *Acta Vet Scand.* 1993;34(1):45-52.
47. Stuen S, Bergstrom K. Persistence of *Ehrlichia phagocytophila* infection in two age groups of lambs. *Acta Vet Scand.* 2001;42(4):453-8.
48. Stuen S, Bergstrom K. Serological investigation of granulocytic *Ehrlichia* infection in sheep in Norway. *Acta Vet Scand.* 2001;42(3):331-8.
49. Stuen S, Bergstrom K, Palmer E. Reduced weight gain due to subclinical *Anaplasma phagocytophilum* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) infection. *Exp Appl Acarol.* 2002;28(1-4):209-15.
50. Stuen S, Van De Pol I, Bergstrom K, Schouls LM. Identification of *Anaplasma phagocytophilum* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3192-7.
51. Stuen S, Whist SK, Bergstrom K, Moum T. Possible exclusion of genotypes in *Anaplasma phagocytophilum*-infected lambs. *Vet Rec.* 2005 Apr 16;156(16):518-20.
52. Uilenberg G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet Parasitol.* 1995 Mar;57(1-3):19-41. Review
53. Uilenberg G, Van Vorstenbosch CJAH and Perié NM. Blood parasites of sheep in the Netherlands. I. *Anaplasma mesaeterum* sp.n. (Rickettsiales, Anaplasmataceae). *Vet Q.* 1979 1: 14-22
54. Vassallo M, Paul RE, Perez-Eid C. Temporal distribution of the annual nymphal stock of *Ixodes ricinus* ticks. *Exp Appl Acarol.* 2000;24(12):941-9.
55. Vassallo N et Lamanda P. Ehrlichiose bovine à *A. phagocytophilum* : diagnostic de laboratoire. *RICKETTSIOSES-ZOONOSES et autres ARBO-BACTERIOSES-ZOONOSES. Colloque européen francophone à l'ISPAIA.* 2003 Sep;54-55

56. Whist SK, Storset AK, Johansen GM, Larsen HJ. Modulation of leukocyte populations and immune responses in sheep experimentally infected with *Anaplasma* (formerly *Ehrlichia*) phagocytophilum. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003 Aug 15;94(3-4):163-75.
57. Woldehiwet Z, Scott GR. Differentiation of strains of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever, by complement fixation. *J Comp Pathol.* 1982 Jul;92(3):475-8.
58. Woldehiwet Z. The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. *J Comp Pathol.* 1987 Jul;97(4):481-5.
59. Woldehiwet Z. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood of sheep experimentally infected with tick-borne fever. *Res Vet Sci.* 1991 Jul;51(1):40-3.
60. Woldehiwet Z, Scaife H, Hart CA, Edwards SW. Purification of ovine neutrophils and eosinophils: *Anaplasma phagocytophilum* affects neutrophil density. *J Comp Pathol.* 2003 May;128(4):277-82.
61. Yeruham I, Hadani A, Galker F, Rosen S. A study of an enzootic focus of sheep babesiosis (*Babesia ovis*, Babes, 1892). *Vet Parasitol.* 1995 Dec;60(3-4):349-54.
62. Yeruham I, Hadani A, Galker F. Some epizootiological and clinical aspects of ovine babesiosis caused by *Babesia ovis*--a review. *Vet Parasitol.* 1998 Jan 31;74(2-4):153-63. Review.
63. Yeruham I, Hadani A, Galker F, Avidar Y, Bogin E. Clinical, clinico-pathological and serological studies of *Babesia ovis* in experimentally infected sheep. *J Vet Med. B.* 1998 sep;45(7):385-94.
64. Zaugg JL. Ovine anaplasmosis: In utero transmission as it relates to stage of gestation. *Am J Vet Res.* 1987 Jan;48(1):100-3.

Annexes

ANNEXE II: Technique de PCR utilisée pour la recherche d'*A. phagocytophilum*, d'après Inokuma et al. (24)

Cette technique est aussi bien valable pour la PCR sur sang total que pour celle sur les tiques.

L'extraction d'ADN est effectuée avec le kit "QIAGEN DNA Tissue". Deux amorces permettant la détection de toutes les espèces du genre *Anaplasma* sont utilisées pour la recherche d'ADN anaplasmique. Chaque mélange réactif de PCR a un volume final de 25 µL et contient 12,5 pmol de chaque amorce, 0,75 U d'ADN Taq polymérase, 20 mmol/L de chaque dNTP, 10 mmol/L de Tris-HCL, 50 mmol/L de KCl, 1,6 mmol/L de MgCl₂, et 7,5 µL de modèle d'ADN de l'hôte. Les cycles d'amplification, effectués avec un thermocycleur, sont constitués d'une dénaturation initiale de 5 min à 95°C, suivie de 34 cycles de dénaturation (30 s à 95°C), hybridation (30 s à 52°C), et polymérisation (90 s à 72°C) avec une polymérisation finale de 5 min à 72°C.

Les produits de l'amplification sont visualisés sur un gel d'agarose à 2% après électrophorèse de 8 µL du matériel amplifié. Les produits de PCR sont par la suite purifiés avec un kit de purification de PCR QIAquick et l'ADN est séquencé grâce à l'utilisation de didéoxynucléotides fluorescents avec un séquenceur d'ADN automatisé. Les séquences obtenues sont assemblées, éditées, et leur homologie a été analysée par un programme informatique.

Une fois cette première phase de recherche de matériel génétique appartenant au genre *Anaplasma* terminée, un protocole identique est suivi avec des amorces permettant la détection de matériel génétique appartenant à *A. phagocytophilum*. Un témoin positif d'*A. phagocytophilum* est obtenu à partir d'un tissu de culture et permet de vérifier le bon fonctionnement des processus d'extraction et d'amplification.

ANNEXE III: Technique d'Immuno Fluorescence Indirecte utilisée pour la sérologie *A. phagocytophilum*

Il s'agit d'une technique reposant sur l'utilisation de lames à puits sur lesquelles sont fixés des granulocytes neutrophiles infectés par *A. phagocytophilum*. Les sérums testés sont déposés dans ces puits, si des anticorps spécifiques sont présents, ils sont révélés par conjugué anti-Ig G de ruminant couplé à de la fluorescéine (reconnaissant les anticorps des espèces Bovine, Ovine et Caprine, ainsi que ceux du chevreuil et du chamois).

ANNEXE IV: Résultats de numérations et formules sanguines

Tableau 3: Paramètres hématologiques individuels de 6 agnelles et d'une antenaise de l'élevage 2.

		Ht (%)	Hb (g/dL)	GB (x10 ⁹ /L)	GN (x10 ⁹ /L)	PLA (x10 ⁹ /L)
Valeurs usuelles		[25,6–38,0]	[8,0–10,7]	[6,0–8,4]	[2,6–8,1]	[218,6–338,2]
Malades	4004	31,4	9,5	1,3	0,8	49,0
	4050	33,1	10,2	3,6	2,1	212,0
	4055	34,1	9,2	3,4	1,3	199,0
	4063	32,3	10,1	4,7	1,6	36,0
	4085	30,5	9,5	2,3	0,5	123,0
	4101	31,9	10	2,7	0,5	15,0
	4105	33,1	10,4	2,7	0,7	64,0
Témoins	4053	21,4	6,7	5,5	3,0	10,0
	4095	34,4	8,3	NC	NC	NC
	4098	29,3	8,9	3,6	1,6	343,0
	4106	23,8	6,6	7,3	3,9	733,0

Ht= hématocrite; Hb= hémoglobininémie; GB= globules blancs; GN= granulocytes (essentiellement des neutrophiles); PLA= plaquettes.

Tableau 4: Paramètres hématologiques individuels de 5 agnelles de l'élevage 4.

		Ht (%)	Hb (g/dL)	GB (x10 ⁹ /L)	GN (x10 ⁹ /L)	PLA (x10 ⁹ /L)
Valeurs usuelles		[27,0–45,0]	[9,0–15,0]	[4,0–12,0]	[0,7–6,0]	[250,0–750,0]
Malades	4001	32,9	10,2	5,3	2,5	187,0
	4004	22,0	6,6	6,5	3,2	258,0
	4016	34,4	10,1	5,4	2,7	132,0
Tém.	4008	24,0	8,0	6,6	4,0	258,0
	4022	29,2	9,1	7,0	3,9	452,0

Ht= hématocrite; Hb= hémoglobininémie; GB= globules blancs; GN= granulocytes (essentiellement des neutrophiles); PLA= plaquettes.

ANNEXE V: Résultats d'analyses sérologiques

Tableau 5: Résultats d'analyses sérologiques couplées (IFI) pour la recherche d'anticorps anti *A. phagocytophilum* pour les élevages 1 et 2.

	Brebis	Date montée	Date PS1	Date PS2	Résultat PS1	Résultat PS2
Elevage 1	4010	10/05/04	20/05/04	08/07/04	négative	POSITIVE
	4022	10/05/04	20/05/04	08/07/04	négative	POSITIVE
	4028	10/05/04	20/05/04	08/07/04	négative	POSITIVE
	4031	10/05/04	20/05/04	08/07/04	négative	POSITIVE
	4032	10/05/04	20/05/04	08/07/04	négative	POSITIVE
Elevage 2	4004	18/06/04	28/05/04	13/08/04	négative	POSITIVE
	4063	18/06/04	28/05/04	13/08/04	négative	POSITIVE
	4085	18/06/04	28/05/04	13/08/04	négative	POSITIVE
	4101	18/06/04	08/07/04	13/08/04	POSITIVE	POSITIVE
	4105	18/06/04	28/05/04	13/08/04	négative	POSITIVE

Tableau 6: Résultats d'analyses sérologiques couplées (IFI) pour la recherche d'anticorps anti *A. phagocytophilum* pour les élevages 3, 4 et 5.

	Brebis	Date montée	Date PS1	Date PS2	Résultat PS1	Résultat PS2
Elevage 3	3760	15/07/04	08/07/04	20/09/04	négative	POSITIVE
	3769	15/07/04	08/07/04	20/09/04	POSITIVE	POSITIVE
	3773	15/07/04	08/07/04	20/09/04	négative	POSITIVE
	3787	15/07/04	08/07/04	20/09/04	POSITIVE	POSITIVE
	3794	15/07/04	08/07/04	20/09/04	négative	POSITIVE
Elevage 4	4001	15/06/04	28/06/04	07/12/04	POSITIVE	POSITIVE
	4004	15/06/04	28/06/04	07/12/04	POSITIVE	POSITIVE
	4008	15/06/04	28/06/04	07/12/04	POSITIVE	négative
	4016	15/06/04	28/06/04	07/12/04	POSITIVE	POSITIVE
	4022	15/06/04	28/06/04	07/12/04	POSITIVE	POSITIVE
Elevage 5	3001	02/06/04	-	08/07/04	-	POSITIVE
	3003	02/06/04	10/06/04	08/07/04	négative	POSITIVE
	3006	02/06/04	-	08/07/04	-	POSITIVE
	3010	02/06/04	-	08/07/04	-	POSITIVE
	3015	02/06/04	10/06/04	08/07/04	négative	POSITIVE
	3021	02/06/04	-	08/07/04	-	POSITIVE
	3022	02/06/04	-	08/07/04	-	POSITIVE

ANNEXE VI: Résultats de PCR

Tableau 7: Résultats de PCR *Anaplasma phagocytophilum*.

		Brebis	Date PS (EDTA)	PCR
Elevage 2	Malades	3096	7/07/04	négative
		4004	7/07/04	négative
		4050	7/07/04	négative
		4055	7/07/04	négative
		4063	7/07/04	négative
		4085	7/07/04	négative
		4101	7/07/04	négative
		4105	7/07/04	négative
	Tém.	4053	7/07/04	négative
		4095	7/07/04	négative
		4098	7/07/04	négative
		4106	7/07/04	négative

		Brebis	Date PS (EDTA)	PCR
Elevage 4	Malades	4001	28/06/04	négative
		4004	28/06/04	négative
		4016	28/06/04	négative
	Tém.	4008	28/06/04	négative
		4022	28/06/04	négative
	Témoins restées en bas	1	28/06/04	négative
		2	28/06/04	négative
		3	28/06/04	négative
E. 7	Malade	4635	15/10/04	négative

Nom: **RAZIMBAUD**

Prénom: **Fabrice**

TOULOUSE 2006

Titre: **Évaluation de la participation d'*Anaplasma phagocytophilum* dans le syndrome "fièvre des montagnes" ou *Belar Joa* des Ovins du Pays Basque français**

RÉSUMÉ

Après une présentation des principales hémoparasitoses ovines, les méthodes de diagnostic épidémio-clinique et de laboratoire sont développées.

L'impact des conditions climatiques et écologiques du milieu sur l'abondance des tiques vectrices d'hémoparasites est abordé.

Le *Belar Joa* (en basque) ou "fièvre des montagnes" correspond à une maladie touchant les Ovins lors de leur première estive. Cette maladie est connue depuis longtemps par les bergers, mais son origine n'a jamais été élucidée.

Les hypothèses de travail étaient qu'une hémoparasitose, notamment l'ehrlichiose (*Anaplasma phagocytophilum*), était responsable de l'entité "fièvre des montagnes".

Différents examens de laboratoire ont permis d'évaluer le rôle d'*Anaplasma phagocytophilum*.

MOTS-CLEFS: hémoparasitose; Ovins; tiques; estive; ehrlichiose; diagnostic; Pays Basque

Title: **Evaluation of the participation of *Anaplasma phagocytophilum* in the *fièvre des montagnes* or *Belar Joa* syndrom of sheep in the french Basque Country**

SUMMARY

After a presentation of the main ovine hemoparasitoses, the epidemioclinical and laboratory diagnosis methods are developed.

The impact of pasture's weather and ecological conditions on the abundance of ticks vectors of hemoparasites is discussed about.

The *Belar Joa* (in Basque) or *Fièvre des montagnes* corresponds to a disease hitting sheeps on their first season of mountain pasture. This disease has been known for a long time by shepherds but its origin has never been elucidated.

Working hypotheses were that an hemoparasitosis, especially ehrlichiosis (*Anaplasma phagocytophilum*), was responsible for the *Fièvre des montagnes* entity.

Various laboratory tests have allowed the evaluation of *Anaplasma phagocytophilum*'s role.

KEY WORDS: hemoparasitosis; sheep; ticks; mountain pasture; ehrlichiosis; diagnosis; Basque Country