

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

**ETUDE SERO-EPIDEMIOLOGIQUE  
DE LA NEOSPOROSE BOVINE DANS  
42 ELEVAGES DES  
PYRENEES-ATLANTIQUES**

THESE

GUINOT Pauline

**A notre jury de thèse**

**A Monsieur le Professeur Henri DABERNAT**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Bactériologie-Virologie

*Qui nous fait l'honneur de présider notre jury de thèse*

*Hommages respectueux*

**A Monsieur le Professeur François SCHELCHER**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour

*Pour le temps consacré à l'élaboration de cette thèse*

*Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance*

**A Monsieur le Docteur Philippe JACQUIET**

Maître de conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Parasitologie et Maladies parasitaires

*Qui a aimablement accepté de faire partie de notre jury*

*Sincères remerciements*

**A Fabien Corbière,**  
*Sans qui les statistiques ne seraient pas,  
merci pour ta patience.*

**A Anne Van De Wiele,**  
*Pour m'avoir offert l'opportunité de traiter ce sujet.*

**A Julie Maupomé,**  
*Pour son encadrement et ses conseils.*

**A toute l'équipe du GDS 64,**  
*Pour les bons moments passés à leurs côtés.*

**Aux éleveurs,**  
*Pour leur accueil et leur disponibilité.*

*A mes parents,  
Avec tout mon amour et ma reconnaissance à votre égard.*

*A mon frère,  
Que tu continues brillamment dans la dentelle...*

*A toute ma famille,  
Pour leur soutien.*

*A Fred,  
A notre amour et notre vie rêvée...*

*A Pauline,  
Pour m'avoir supportée durant ce dur labeur...*

*Aux « filles »,  
Et aux bons moments passés ensemble à Toulouse...*

# *Table des matières*

<b>Introduction .....</b>	<b>p12</b>
<b><u>Première partie : Étude bibliographique .....</u></b>	<b>p 13</b>
<i>I - <u>Données actuelles concernant Neospora caninum, la pathogenèse et les moyens diagnostiques</u> .....</i>	<i>p 14</i>
<b>A - Historique .....</b>	<b>p 14</b>
<b>B - Biologie de <i>Neospora caninum</i> .....</b>	<b>p 16</b>
1) Taxonomie et classification .....	p 16
2) Cycle évolutif .....	p 18
3) Morphologie et structure du parasite .....	p 21
a) Tachyzoïtes .....	p 21
b) Bradyzoïtes et kystes tissulaires .....	p 23
c) Oocystes .....	p 24
<b>C - Pathogenèse .....</b>	<b>p 26</b>
1) Pénétration et évolution du parasite au sein de l'organisme .....	p 26
2) Réponse immunitaire de l'hôte .....	p 28
a) Lors de transmission verticale .....	p 28
b) Lors de transmission horizontale par les oocystes .....	p 30
3) Lésions .....	p 31
<b>D - Les conséquences cliniques .....</b>	<b>p 33</b>
1) Espèce bovine .....	p 33
a) Chez les bovins adultes .....	p 33
b) Chez le veau nouveau-né .....	p 34
2) Espèce canine .....	p 35
a) Chez le chiot .....	p 35
b) Chez l'adulte .....	p 36
3) Espèce ovine et caprine .....	p 38
4) Espèce équine .....	p 39

5) Espèce féline .....	p 41
6) Espèce humaine .....	p 42
<b>E - Le diagnostic de la néosporose chez les bovins .....</b>	<b>p 43</b>
1) Clinique et épidémiologique .....	p 43
2) Différentiel .....	p 44
a) Etiologie des avortements chez la vache .....	p 44
b) Etiologie des troubles nerveux chez le nouveau-né .....	p 48
3) De laboratoire .....	p 51
a) Méthodes directes .....	p 51
$\alpha$ - Histologie .....	p 51
$\beta$ - Immunohistochimie .....	p 52
$\delta$ - Isolement sur culture cellulaire et inoculation .....	p 52
$\gamma$ - Amplification génique .....	p 53
b) Méthodes indirectes .....	p 55
$\alpha$ - Immunofluorescence indirecte (IFI) .....	p 55
$\beta$ - Agglutination directe .....	p 55
$\delta$ - Méthode enzymatique : l'ELISA .....	p 56
c) Démarche diagnostique .....	p 59

## II - Épidémiologie et importance de la néosporose bovine ; moyens de lutte actuels .....

p 60

### **A - Caractères épidémiologiques .....**

**p 60**

1) Épidémiologie descriptive .....	p 60
a) Prévalence .....	p 60
b) Espèces sensibles .....	p 62
2) Mode de transmission .....	p 63
a) Transmission verticale .....	p 63
b) Transmission horizontale .....	p 64
$\alpha$ - Contamination de l'hôte définitif .....	p 64
$\beta$ - Contamination des hôtes intermédiaires .....	p 64
3) Facteurs de réceptivité et de sensibilité .....	p 67

### **B - Importance de la néosporose bovine .....**

**p 69**

1) Répartition géographique .....	p 69
a) Mondiale .....	p 69
b) En France .....	p 69

2) Impact économique .....	p 70
a) Type de perte .....	p 70
b) Évaluation des pertes .....	p 71
<b>C - Moyens de lutte .....</b>	<b>p 72</b>
1) Prophylaxie .....	p 72
a) Médicale .....	p 72
b) Sanitaire .....	p 73
α - Offensive .....	p 73
β - Défensive .....	p 74
2) Traitement .....	p 76
<b><u>Deuxième partie</u> : Étude rétrospective de 42 élevages des Pyrénées-Atlantiques atteints de néosporose.....</b>	<b>p 77</b>
<i><u>I- Objectifs</u></i> .....	p 78
<i><u>II- Matériel et méthodes</u></i> .....	p 78
<b>A- Description des élevages étudiés .....</b>	<b>p 78</b>
1) Adhésion au plan de lutte néosporose .....	p 78
2) Obligations des éleveurs .....	p 78
3) Sélection et description des élevages étudiés .....	p 79
a) Sélection .....	p 79
b) Description des élevages sélectionnés .....	p 79
<b>B- Modalités de prélèvement .....</b>	<b>p 80</b>
<b>C- Méthode de diagnostic sérologique : test ELISA commercialisé par IDEXX ....</b>	<b>p 80</b>
1) Description générale du test .....	p 80
2) Protocole d'utilisation, lecture et interprétation .....	p 81
3) Performances du test utilisé .....	p 81
<b>D- Recueil des résultats .....</b>	<b>p 81</b>
<b>E- Traitement des données .....</b>	<b>p 81</b>

<b><i>III- Résultats</i></b> .....	p 82
<b>A- Exhaustivité des données</b> .....	<b>p 82</b>
<b>B- Etude des statuts sérologiques</b> .....	<b>p 84</b>
1) Description des sérologies réalisées pendant la période d'observation .....	p 84
a) Nombre de sérologies par animal .....	p 84
b) Description des délais qui séparent les différentes sérologies .....	p 85
2) Age lors de la première sérologie .....	P 87
3) Description des résultats sérologiques et des séroconversions .....	p 89
α) Bovins avec un premier résultat sérologique positif .....	p 89
β) Bovins avec un premier résultat sérologique douteux .....	p 89
γ) Bovins avec un premier résultat sérologique négatif .....	p 90
4) Séroprévalence .....	p 91
a) Séroprévalence individuelle globale .....	p 91
b) Séroprévalence par élevage .....	p 92
<b>C- Etude de la transmission verticale</b> .....	<b>p 94</b>
1) Population étudiée .....	p 94
2) Résultats .....	p 94
<b>D- Etude des avortements</b> .....	<b>p 95</b>
1) Description des vaches ayant avorté pendant la période d'observation ...	p 95
a) Nombre de vaches ayant avorté et ayant été testées .....	p 95
b) Description des délais séparant les avortements des dépistages sérologiques .....	p 95
2) Risque d'avorter .....	p 97
a) Matériel et méthodes .....	p 97
b) Résultats .....	p 97
3) Description des avortements .....	P 98
a) Population étudiée .....	p 98
b) Nombre d'avortements par vache .....	p 99
c) Stade de gestation au moment de l'avortement .....	p 101
d) Age moyen au premier avortement .....	p 104

<b><i>IV- Discussion</i></b> .....	<b>p 106</b>
<b>A- Population étudiée et représentativité des résultats</b> .....	<b>p 106</b>
<b>B- Biais de l'analyse</b> .....	<b>p 106</b>
<b>C- Etude des statuts sérologiques</b> .....	<b>p 107</b>
1) Modification des statuts sérologiques au cours du temps .....	p 107
2) Etude de la séroprévalence .....	P 108
a) Séroprévalence individuelle globale .....	p 108
b) Séroprévalence par troupeau .....	p 108
<b>D- Etude de la transmission verticale</b> .....	<b>p 109</b>
<b>E- Etude des avortements</b> .....	<b>p 109</b>
1) Risque d'avorter .....	p 109
2) Récurrence des avortements chez les vaches infectées .....	P 109
3) Etude du stade de gestation au moment de l'avortement .....	p 110
4) Etude de l'âge moyen au premier avortement .....	p 110
<b>Conclusions</b> .....	<b>p 111</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>p 112</b>
Annexe 1 : Convention de lutte passée entre les éleveurs, leur vétérinaire et le GDS 64 .....	P 113
Annexe 2 : Caractéristiques des élevages étudiés .....	p 114
Annexe 3 : Protocole d'utilisation, lecture et interprétation du test Chekit Neospora (ELISA indirect) commercialisé par IDEXX .....	p 115
<b>Bibliographie</b> .....	<b>p 117</b>

# Table des illustrations

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Cycle de développement de <i>Neospora caninum</i> (Chermette et Marquer, 2000) .....	p 20
<b>Figure 2</b> : Mécanisme d'invasion cellulaire par un tachyzoïte de <i>Neospora caninum</i> (Buxton <i>et al.</i> , 2002) .....	p 27
<b>Figure 3</b> : Distribution des élevages selon le pourcentage d'animaux testés parmi les bovins présents sur les exploitations pendant la période d'observation .....	p 82
<b>Figure 4</b> : Distribution des élevages selon le pourcentage d'animaux testés parmi les bovins « réellement » présents sur les exploitations pendant la période d'observation .....	p 83
<b>Figure 5</b> : Répartition des délais entre la première et la seconde sérologie chez les bovins testés deux fois .....	p 85
<b>Figure 6</b> : a) Répartition des délais entre la seconde et la troisième sérologie chez les bovins testés trois fois .....	p 86
b) Répartition des délais entre la troisième et la quatrième sérologie chez les bovins testés quatre fois .....	p 86
<b>Figure 7</b> : Répartition des animaux selon leur âge lors de leur première sérologie .....	p 87
<b>Figure 8</b> : Répartition des animaux selon leur âge lors de la première sérologie et selon le type de production des élevages .....	p 88
<b>Figure 9</b> : Répartition des élevages en fonction du nombre de bovins testés positifs sur la période d'observation .....	p 92
<b>Figure 10</b> : Répartition des élevages en fonction du nombre de bovins testés positifs et en fonction du type de production .....	P 93
<b>Figure 11</b> : a) Distribution des délais entre la première sérologie et le premier avortement quand celui-ci est postérieur au dépistage .....	p 96
b) Distribution des délais entre la première sérologie et le premier avortement quand celui-ci est antérieur au dépistage .....	p 96
<b>Figure 12</b> : Répartition des délais entre l'avortement d'une vache et sa sortie de l'élevage selon qu'elle a avorté une ou deux fois .....	p 100
<b>Figure 13</b> : Répartition des stades de gestation au moment de l'avortement d'une vache selon son statut sérologique .....	p 102
<b>Figure 14</b> : Répartition des stades de gestation au moment de l'avortement d'une vache dans les élevages laitiers selon son statut sérologique .....	p 103
<b>Figure 15</b> : Répartition des stades de gestation au moment de l'avortement d'une vache dans les élevages allaitants selon son statut sérologique .....	p 103
<b>Figure 16</b> : Distribution des âges au premier avortement chez les vaches testées positives à la néosporose bovine .....	p 104
<b>Figure 17</b> : Distribution des âges au premier avortement chez les vaches testées négatives à la néosporose bovine .....	p 105

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Historique des découvertes sur <i>Neospora caninum</i> de 1984 à 1999 (d'après Dubey, 1999a) .....	p 15
<b>Tableau 2</b> : Espèces hôtes de <i>Neospora caninum</i> .....	p 19
<b>Tableau 3</b> : Principaux critères de diagnose différentielle de <i>Neospora caninum</i> (Chermette et Marquer, 2000) .....	p 25
<b>Tableau 4</b> : Syndrome de polyradiculonévrite-myosite lors de néosporose (Barber, 1998) .....	p 37
<b>Tableau 5</b> : Tableau clinique non nerveux de la néosporose (Barber, 1998) .....	p 37
<b>Tableau 6</b> : Différences ultra-structurales, antigéniques et génétiques entre les souches de <i>Neospora hughesi</i> (NE-1) et <i>Neospora caninum</i> (BPA-1 et CN1) (Pronost <i>et al.</i> , 2000) .....	p 40
<b>Tableau 7</b> : Diagnostic différentiel des avortements chez les bovins : maladies infectieuses à rechercher dans un premier temps (d'après Tainturier <i>et al.</i> ; 1997a ; Tainturier <i>et al.</i> , 1997b) .....	p 45
<b>Tableau 8</b> : Diagnostic différentiel des avortements chez les bovins : maladies infectieuses à rechercher dans un deuxième temps (d'après Tainturier <i>et al.</i> ; 1997a ; Tainturier <i>et al.</i> , 1997b) .....	p 46
<b>Tableau 9</b> : Diagnostic différentiel lors d'avortements chez les bovins : causes non infectieuses (d'après Tainturier <i>et al.</i> ; 1997a ; Tainturier <i>et al.</i> , 1997b) .....	p 47
<b>Tableau 10</b> : Diagnostic différentiel des troubles nerveux d'origine infectieuse chez le veau nouveau-né .....	p 49
<b>Tableau 11</b> : Diagnostic différentiel des troubles nerveux héréditaires liés à des anomalies métaboliques chez le veau nouveau-né .....	p 49
<b>Tableau 12</b> : Diagnostic différentiel des troubles nerveux congénitaux et héréditaires liés à des anomalies de développement chez le veau nouveau-né .....	p 50
<b>Tableau 13</b> : Avantages et inconvénients des techniques de mise en évidence directe de <i>Neospora caninum</i> (Journel et Pitel, 2001a) .....	p 54
<b>Tableau 14</b> : Avantages et inconvénients des techniques sérologiques utilisées pour le diagnostic de <i>Neospora caninum</i> (Marquer et Chermette, 2000) .....	p 58
<b>Tableau 15</b> : Prévalence de <i>Neospora caninum</i> chez des bovins ayant avorté dans différents pays du monde .....	p 60
<b>Tableau 16</b> : Prévalence de <i>Neospora caninum</i> parmi les bovins ayant avorté en France .....	p 61
<b>Tableau 17</b> : Description du nombre de sérologies réalisées par bovin et des résultats sérologiques obtenus sur la période d'observation dans les 42 élevages du département des Pyrénées-Atlantiques .....	P 84
<b>Tableau 18</b> : Description des délais entre les différentes sérologies réalisées sur les bovins des 42 élevages des Pyrénées-Atlantiques pendant la période d'observation .....	p 85
<b>Tableau 19</b> : Description de l'âge des bovins lors de leur première sérologie .....	p 87
<b>Tableau 20</b> : Répartition des bovins avec un premier résultat sérologique positif .....	p 89
<b>Tableau 21</b> : Répartition des bovins avec un premier résultat sérologique douteux .....	P 89
<b>Tableau 22</b> : Répartition des bovins avec un premier résultat sérologique négatif .....	p 90
<b>Tableau 23</b> : Résultats globaux des analyses réalisées sur les bovins des 42 élevages du département des Pyrénées-Atlantiques pendant la période d'observation .....	p 91
<b>Tableau 24</b> : Description de la répartition des couples mères-filles en fonction de leur statut respectif .....	p 94
<b>Tableau 25</b> : Résultats sérologiques <i>Neospora caninum</i> sur les bovins ayant avortés dans les 42 élevages .....	p 95
<b>Tableau 26</b> : Description des délais séparant la première sérologie et le premier avortement .....	p 95

<b>Tableau 27</b> : Description des vaches ayant avorté et ayant été testées autour de l'avortement.....	p 98
<b>Tableau 28</b> : Description du nombre d'avortements .....	p 99
<b>Tableau 29</b> : Description des délais entre l'avortement d'une vache et sa sortie de l'élevage selon qu'elle a avorté une ou deux fois .....	p 99
<b>Tableau 30</b> : Description du nombre de vaches ayant avorté en fonction de leur statut sérologique <i>Neospora caninum</i> et du stade de gestation au moment de l'avortement ...	p 101
<b>Tableau 31</b> : Description des âges des bovins lors de leur premier avortement en fonction de leur statut définitif .....	p 104

## **Liste des encadrés**

<b>Encadré 1</b> : Taxonomie simplifiée de <i>Neospora caninum</i> (Chermette et Marquer, 2000)	p 17
<b>Encadré 2</b> : Attitude à adopter dans un élevage où la néosporose a été mise en évidence (Journel et Pitel, 2001b) .....	p 75

## **Liste des photos**

<b>Photo 1</b> : Tachyzoïtes regroupés dans l'encéphale d'un chien (Dubey <i>et al.</i> , 2002) .....	p 21
<b>Photo 2</b> : Tachyzoïte en microscopie électronique à transmission (Speer <i>et al.</i> , 1999) ..	p 22
<b>Photo 3</b> : Kyste tissulaire contenant des bradyzoïtes issu de l'encéphale d'un chien (Dubey <i>et al.</i> , 2002) .....	p 23
<b>Photo 4</b> : Oocyste sporulé contenant deux sporozoïtes (Lindsay <i>et al.</i> , 1999b) .....	p 24
<b>Photo 5</b> : Coupe histologique d'un encéphale de fœtus bovin : lésion inflammatoire avec un centre nécrotique (Wouda, 1998) .....	p 32
<b>Photo 6</b> : Labrador retriever avec une hyperextension spastique des deux postérieurs (Wouda, 1998) .....	p 36

# *Introduction*

Quand en 1984, Bjerkas et ses collaborateurs (Bjerkas *et al.*, 1984) identifient dans le cerveau et les muscles de six chiots atteints de troubles nerveux un protozoaire ressemblant fortement à *Toxoplasma gondii* mais sans avoir développé d'anticorps anti-*Toxoplasma*, personne ne se doute alors du poids de cette découverte. En 1988, Dubey et ses collaborateurs (Dubey *et al.*, 1988) cultivent ce parasite *in vitro* et le nomment *Neospora caninum*.

Depuis la néosporose a été reconnue responsable d'avortements et de troubles nerveux chez de nombreux mammifères et notamment chez les bovins, dans le monde entier avec des pertes économiques importantes dans les élevages atteints.

Dans l'étude du parasite et de la maladie, de nombreux points restent encore non élucidés. Deux voies de transmission sont aujourd'hui connues : la voie verticale ou transplacentaire et la voie horizontale. Toutefois, le cycle de développement de *Neospora caninum* reste incomplet, ce qui se répercute sur l'efficacité des mesures de lutte. Par ailleurs, le comportement du parasite au sein de son hôte, qu'il soit définitif ou intermédiaire, est mal connu et laisse de nombreuses questions en suspens quant à la physiopathologie de la maladie qu'il induit.

Nous rapporterons dans une première partie toutes les données récentes nécessaires à une bonne compréhension de la maladie causée par *Neospora caninum*. Une seconde partie présentera les résultats de l'étude séroépidémiologique menée rétrospectivement dans 42 élevages des Pyrénées-Atlantiques. Cette enquête a pour but d'analyser certains aspects épidémiologiques de la néosporose : la séroprévalence et l'efficacité de la transmission de type verticale au sein des troupeaux atteints ainsi que les caractéristiques des avortements dus à *Neospora caninum*.

**PREMIERE PARTIE :**

*ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

## *I- Données actuelles concernant Neospora caninum, la pathogenèse et les moyens diagnostiques.*

### A - Historique

En 1984, Bjerkas et ses collaborateurs décrivent chez six chiots de race boxer atteints de paralysie progressive, un protozoaire morphologiquement très voisin de *Toxoplasma gondii*, mais dépourvus d'anticorps anti-*Toxoplasma* (Bjerkas *et al.*, 1984).

En 1988, Dubey et ses collaborateurs rapportent des cas similaires sur des chiens. Ils isolent alors le parasite en culture cellulaire et le nomment *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 1988). Après avoir inoculé des lapins avec le parasite, des méthodes de diagnostic sérologique et immunohistochimique sont développées afin de distinguer *Neospora caninum* de *Toxoplasma gondii* (Lindsay and Dubey, 1989).

Parallèlement, de nombreux avortements à « protozoaires » sont décrits chez les bovins en Californie sans qu'aucun anticorps anti-*Toxoplasma* soit détecté dans les liquides fœtaux. En 1989, Thilsted et Dubey rapportent que les protozoaires observés dans les avortons réagissent avec des anticorps anti-*Neospora* (Thilsted and Dubey, 1989).

Par la suite, la néosporose a été reconnue responsable d'une grande part d'avortements jusqu'alors inexplicables dans de nombreux pays.

Le tableau 1 décrit les étapes importantes sur l'acquisition des connaissances sur le parasite.

**Tableau 1 :** Historique des découvertes sur *Neospora caninum* de 1984 à 1999 (d'après Dubey, 1999a).

Année	Évènement
1984	La maladie est reconnue pour la première fois chez le chien en Norvège
1988	Proposition de dénomination : <i>Neospora caninum</i>
1988	Isolement de <i>Neospora caninum</i> en culture cellulaire et vérification des postulats de Koch
1988	Développement de l'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic sérologique de la néosporose
1989	Développement de l'immunohistochimie pour détecter le parasite dans les tissus
1989	Identification de <i>Neospora caninum</i> comme une cause majeure d'avortements en élevage bovin laitier
1989	Essais de transmission transplacentaire chez le chien, le chat, le mouton et le bovin.
1990	Étude expérimentale de la néosporose sur des modèles murins
1990	Essais thérapeutiques
1991	Confirmation de la présence de <i>Neospora caninum</i> chez les chiens Norvégiens (1984)
1991	<i>Neospora caninum</i> est reconnue comme une cause majeure d'avortements chez les bovins en Californie
1993	Isolement de <i>Neospora caninum</i> à partir d'avortons bovins
1994	La néosporose semble être une maladie asymptomatique fréquente en élevage laitier bovin
1995	Développement d'un test ELISA pour le diagnostic sérologique de la néosporose chez les bovins et le chien
1996	Production des premières protéines recombinantes utilisées dans le diagnostic de la néosporose
1998	Développement d'un test de séroagglutination
1998	<i>Neospora caninum</i> isolé chez le chien et les bovins est identique Description d'une nouvelle espèce chez le cheval : <i>Neospora hughesi</i>
1998	Le chien est reconnu comme hôte définitif

## B - Biologie de *Neospora caninum*

### 1) Taxonomie et classification

*Neospora caninum* est un protozoaire appartenant au phylum des **Apicomplexa**. Ce phylum regroupe un grand nombre de parasites possédant un appareil apical complexe présent à certains stades du développement et permettant la pénétration dans la cellule hôte (Chermette et Marquer, 2000 ; Losson et Bourdoiseau, 2000).

Il a été classé dans le groupe des **Coccidies** et dans la famille des **Sarcocystidés** qui comprend également les genres *Sarcocystis* et *Toxoplasma* (voir encadré 1). Cependant de nombreuses controverses sont nées à ce sujet.

*Neospora caninum* a longtemps été confondu avec *Toxoplasma gondii*. D'après une étude rétrospective, le parasite a été retrouvé sous forme de tachyzoïtes et de kystes tissulaires chez des chiens morts entre 1957 et 1958 aux Etats-Unis (Dubey *et al.*, 1990b).

Différentes recherches ont d'abord inclu *Neospora caninum* dans le groupe de *Toxoplasma gondii* sur la base d'homologie de l'ARN 16s-like. Puis ils ont été séparés dans deux groupes distincts compte tenu de leurs différences biologiques (hôtes intermédiaires et définitifs différents), morphologiques (les parois des kystes de *Neospora caninum* sont fines), moléculaires et antigéniques (Speer *et al.*, 1999). En effet, les premières études utilisant le microscope électronique ont rapporté des différences concernant leurs rhoptries (Dubey and Lindsay, 1996). Des explorations immunologiques ont encore séparé les deux parasites, les trois antigènes dominants présents chez *Toxoplasma gondii* (P30, P22 et B1) étant absents chez *Neospora caninum*. Enfin, la région 1 intertranscrite (ITS1) est différente, ce qui sera exploité dans le développement d'un test PCR (Hemphill, 1999).

Cependant, l'analogie de la séquence nucléotidique de leur petite sous unité ribosomiale (ssrRNA) est très grande, ce qui suggère une parenté phylogénique.

Dernièrement Mehlhorn et Heydorn ont regroupé à partir d'analogies concernant leurs oocystes, *Toxoplasma gondii* et *Hammondia hammondi* d'une part, et *Neospora caninum* et *Hammondia heydorni* d'autre part, assimilant ces derniers à une même espèce (Mehlhorn and Heydorn, 2000). Mais ces affirmations ont été remises en cause par Dubey et ses collaborateurs qui distinguent trois groupes différents à savoir : 1) *Toxoplasma gondii* et *Hammondia hammondi*, 2) *Neospora caninum* et *Neospora hughesi* et 3) *Hammondia heydorni* (Dubey *et al.*, 2002 ; Slapeta *et al.*, 2002).

Depuis 1998, une nouvelle espèce a été découverte chez le cheval : *Neospora hughesi*. Des différences significatives avec *Neospora caninum* ont été observées sur les plans ultrastructural, antigénique et surtout génétique (Pronost *et al.*, 2000).

### *Taxonomie simplifiée de Neospora caninum*

- **Protozoaire**

Protiste (être unicellulaire eucaryote) à paroi non cellulosique, souvent mobile, hétérotrophe.

- **Apicomplexa (Sporozoaires)**

Présence d'un appareil apical visible (microscopie électronique) dans certains stades de développement intervenant dans la pénétration du parasite.

- **Coccidea**

« Coccidies » au sens large ; production de spores, complexe apical complet (différent des *Haemazoa*, avec les plasmodiums et les piroplasmes).

- **Eimeriida**

Le microgamonte donne de nombreux microgamètes (différent des Adeleida, avec *Hepatozoon*).

- **Sarcocystidés**

Cycle avec hôte intermédiaire (HI) (différent des Eimeriidés avec *Eimeria* et *Isospora* ; des Cryptosporidés avec *Cryptosporidium*).

- **Toxoplasmatinés**

Chez l'hôte définitif (HD), reproduction asexuée suivie d'une reproduction sexuée ; sporogonie dans le milieu extérieur ; reproduction asexuée chez l'HI ; passage possible entre HI ; HI facultatif (*Toxoplasma*, *Neospora*) ou obligatoire (*Hammondia*).

**Encadré 1** : Taxonomie simplifiée de *Neospora caninum* (Chermette et Marquer, 2000).

## 2) Cycle évolutif

Longtemps resté méconnu et déduit du cycle de *Toxoplasma gondii*, le cycle évolutif de *Neospora caninum* est mieux compris depuis peu.

Les premières recherches se sont basées sur un cycle dixène faisant intervenir un carnivore comme hôte définitif (HD) en comparaison avec le cycle de *Toxoplasma gondii* (Dubey and Lindsay, 1996). Le chien a souvent été évoqué comme HD, mais dans les premières études d'infection expérimentale, les chiens rejetaient peu d'oocystes dans les fécès et une séroconversion n'était observée que dans 30% des cas (McAllister *et al.*, 1998). Pourtant un an plus tard le rôle du chien sera confirmé dans les conditions expérimentales puis naturelles (Lindsay *et al.*, 1999a).

Le cycle de type coccidien comprend donc trois grandes étapes (Chermette et Marquer, 2000) (voir figure 1) :

Une première phase chez un **hôte définitif** permet la reproduction sexuée de *Neospora caninum* ainsi que le rejet dans le milieu extérieur d'oocystes coccidiens non sporulés, par l'intermédiaire des fécès. Le chien représente le principal hôte définitif mais le renard et d'autres canidés sauvages comme le loup et le dingo sont suspectés, des anticorps anti-*Neospora caninum* ayant été retrouvés chez ces espèces (Chermette et Marquer, 2000). Quant au coyote, son rôle en tant qu'hôte définitif a été confirmé, le présentant comme un élément important en Amérique du Nord où son expansion récente augmente les risques de contacts avec les troupeaux (Gondim *et al.*, 2004) (voir figure 2).

On suppose que l'hôte définitif se contamine en ingérant les liquides foetaux, le placenta ou le fœtus provenant de vaches infectées (Dijkstra *et al.*, 2002a) et contenant des tachyzoïtes. Toutefois, les premiers chiens, qui ont excrété des oocystes dans leurs excréments, ont été nourris expérimentalement avec des cerveaux de souris contenant des kystes à bradyzoïtes (Lindsay *et al.*, 1999a).

Une deuxième phase concerne les **oocystes** qui après avoir été excrétés dans le milieu extérieur vont devoir sporuler pour devenir infectants. L'excrétion commence cinq à dix jours après l'ingestion de kystes à bradyzoïtes et dure environ dix jours (McAllister *et al.*, 1998 ; Lindsay *et al.*, 1999b). La sporulation se produit dans les 24 heures suivant l'émission des oocystes (Lindsay *et al.*, 1999b). Cependant la résistance et les conditions de vie des oocystes dans le milieu extérieur ne sont pas encore connues (Chermette et Marquer, 2000).

Une troisième phase fait intervenir les **hôtes intermédiaires** qui se contaminent en ingérant des oocystes infectants présents dans le milieu extérieur à travers l'alimentation et l'eau (Dubey, 1999b ; Dijkstra *et al.*, 2002a). Après l'infection de ces derniers, la reproduction de *Neospora caninum* se fait de façon asexuée, dans un premier temps très rapidement pour la forme tachyzoïte que l'on retrouve dans de nombreuses cellules de l'organisme et qui est susceptible d'être transmise à travers le placenta pendant la gestation. Puis face à la réponse immunitaire, les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes qui s'enkystent dans le système nerveux de l'hôte définitif et qui se multiplient plus lentement (Hemphill, 1999 ; Wouda, 2000).

De nombreuses espèces d'hôtes intermédiaires peuvent intervenir (Chermette et Marquer, 2000) (voir tableau 2). Le chien, avant d'être reconnu hôte définitif, a d'abord été étudié en tant qu'hôte intermédiaire. En effet, les premiers cas de néosporose canine ont été observés en 1984 en Norvège (Bjerkas *et al.*, 1984).

Deux situations sont observables dans cette espèce :

- une atteinte digestive asymptomatique qui correspondrait à la phase de reproduction sexuée du parasite. Le chien intervient alors en tant qu'hôte définitif.

- une atteinte disséminée dans laquelle les signes cliniques sont variés, avec en particulier des symptômes nerveux. Dans ce cas, le chien intervient en tant qu'hôte intermédiaire (Guillot *et al.*, 2000).

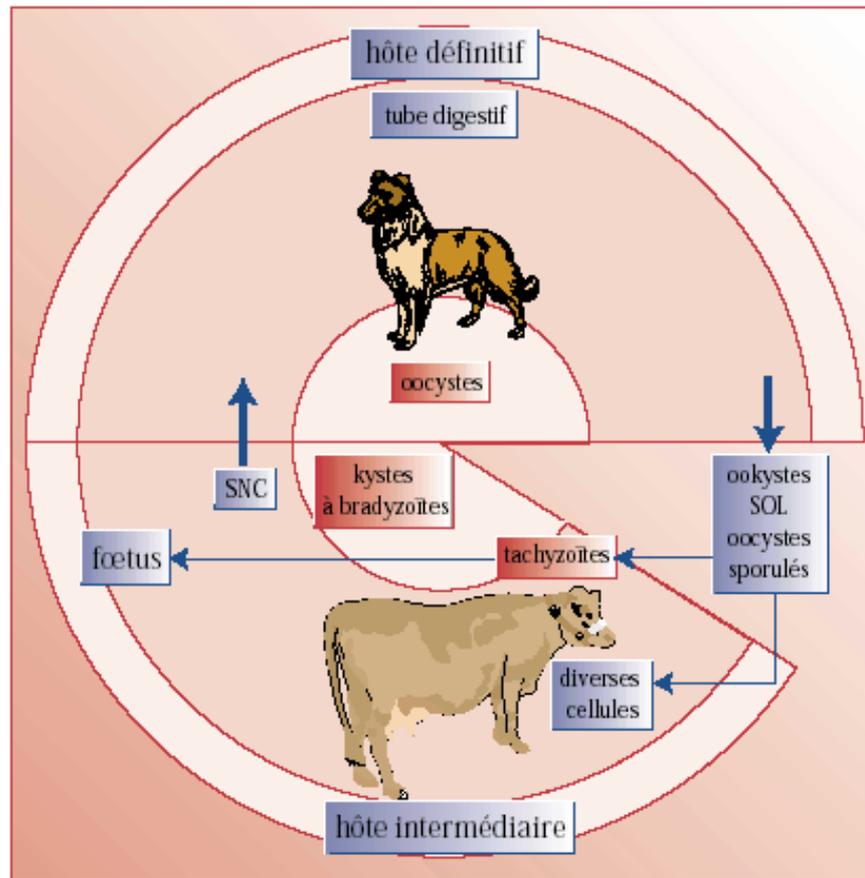
L'efficacité relative d'une infection initiée chez différentes espèces, soit par l'ingestion d'oocystes, soit par des tachyzoïtes ou par des kystes tissulaires n'est pas encore comprise.

Le cycle de *Neospora caninum* fait donc apparaître deux voies principales de transmission : une première voie horizontale entre les hôtes intermédiaires et les hôtes définitifs, et une deuxième voie verticale au sein des hôtes intermédiaires. Les recherches en cours devraient permettre une approche plus complète du cycle biologique de *Neospora caninum*.

**Tableau 2** : Espèces hôtes de *Neospora caninum* (Chermette et Marquer, 2000).

Hôte définitif	Hôte intermédiaire	
	Infection naturelle	Infection expérimentale
<b>Canidés :</b> - Chien	<b>Canidés :</b> - Chien - Renard* - Coyote* <b>Bovidés :</b> - Bovins - Ovins - Caprins <b>Cervidés :</b> - Cerfs <b>Camélidés :</b> - Chameau* <b>Equidés :</b> - Cheval	<b>Canidés :</b> - Chien - Chat - Renard* - Coyote* <b>Bovidés :</b> - Bovins - Ovins - Caprins <b>Rongeurs :</b> - Souris - Rat - Gerbille <b>Lagomorphes :</b> - Lapin <b>Suidés :</b> - Porc <b>Primates :</b> - Singe <b>Oiseaux :</b> - Pigeon

\* : Infection décelée par la présence d'anticorps



**Figure 1** : Cycle de développement de *Neospora caninum* (Chermette et Marquer, 2000).

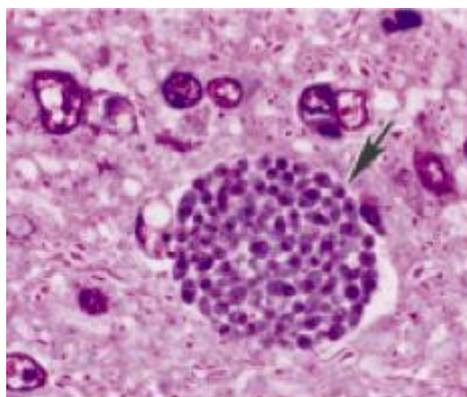
### 3) Morphologie et structure du parasite

*Neospora caninum* est morphologiquement très proche des autres genres de la famille des *Sarcocystidae*. La description précise de ses différentes formes a donc un intérêt notamment diagnostique (voir tableau 3).

Le parasite existe sous trois formes différentes : deux formes asexuées chez l'hôte intermédiaire, les tachyzoïtes et les bradyzoïtes et une forme sexuée chez l'hôte définitif, l'oocyste.

#### a) Tachyzoïtes

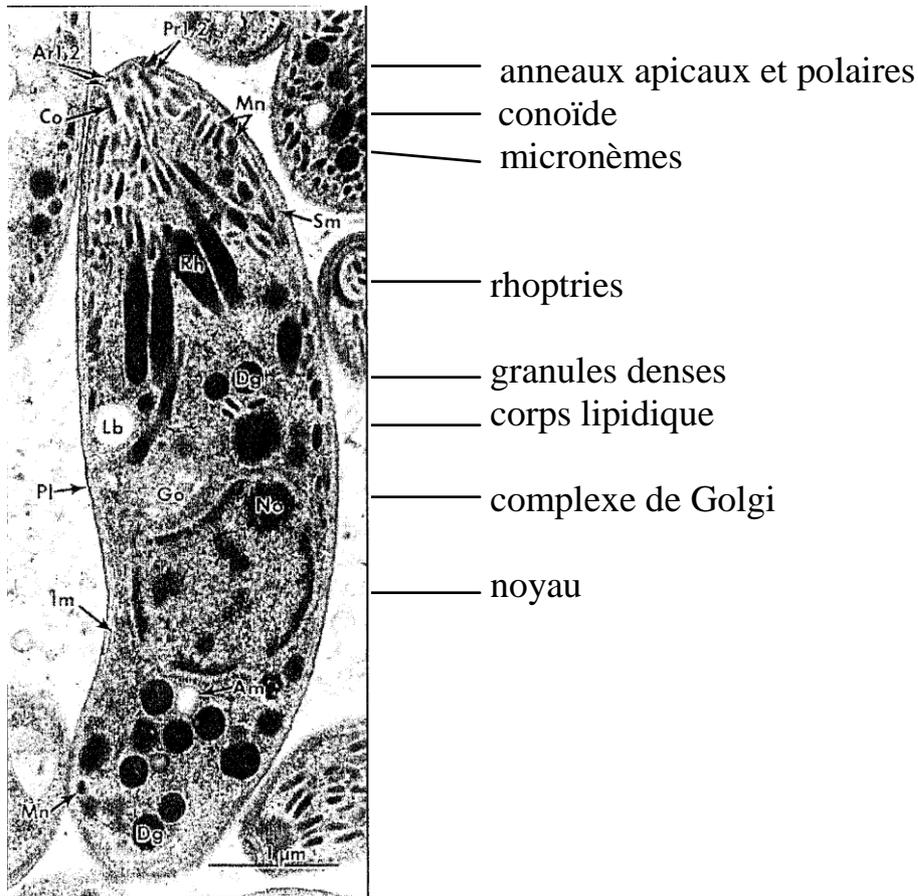
Ils représentent la forme pathogène de *Neospora caninum*. En microscopie électronique, ils apparaissent de forme ovoïde, globuleuse ou en croissant, et mesurent 3 à 7  $\mu\text{m}$  de long sur 1 à 5  $\mu\text{m}$  de large en fonction du stade de division (Dubey and Lindsay, 1996) (voir photo 1).



**Photo 1 :** Tachyzoïtes regroupés dans l'encéphale d'un chien (Dubey *et al.*, 2002).

En ultrastructure, le complexe apical est composé de vingt-deux microtubules, de deux anneaux apicaux, d'un conoïde et d'un anneau polaire. Ils possèdent aussi des rhoptries (organelles sécrétoires ; 8 à 12 antérieures et 4 à 6 postérieures), des granules denses en grand nombre postérieurement et des micronèmes présents surtout sur la partie antérieure et en nombre variable (Hemphill, 1999 ; Dubey and Lindsay, 1996). Ces derniers permettent aux tachyzoïtes d'adhérer à leur cellule hôte lors d'invasion cellulaire.

Enfin les tachyzoïtes sont aussi constitués d'une membrane plasmique à trois couches, d'un noyau et de son nucléole, de ribosomes, de centrioles, d'une à trois mitochondries, d'un complexe de Golgi, d'un réticulum endoplasmique lisse et rugueux, d'un pore postérieur et d'un corps lipidique (voir photo 2).



**Photo 2** : Tachyzoïte en microscopie électronique à transmission (Speer *et al.*, 1999).

Les tachyzoïtes sont des organismes intracellulaires, présents le plus souvent dans une vacuole parasitophore (ou parfois plusieurs) et dont la membrane dérive de la membrane cellulaire de l'hôte (Hemphill, 1999). Leur division se fait par endodyogénie, c'est-à-dire que les éléments fils se forment à l'intérieur de la vacuole parasitophore formant ainsi un pseudo-kyste qui peut se rompre quand le nombre de tachyzoïtes devient trop élevé permettant ainsi l'invasion des cellules voisines (Hemphill *et al.*, 1999).

Les tachyzoïtes envahissent de nombreux types cellulaires tels que les cellules nerveuses, les macrophages, les fibroblastes, les cellules vasculaires endothéliales, les myocytes, les cellules épithéliales des tubules rénaux et les hépatocytes (Dubey and Lindsay, 1996).

## b) Bradyzoïtes et kystes tissulaires

Les bradyzoïtes constituent la forme quiescente de la phase asexuée. Ils mesurent 6 à 8  $\mu\text{m}$  sur 1 à 2  $\mu\text{m}$ . Leur ultrastructure est très proche de celle des tachyzoïtes. Toutefois, ils ont moins de rhoptries et plus de granules d'amylopectine positives à l'acide périodique de Schiff (PAS). Leur noyau est subterminal à terminal et les micronèmes sont souvent perpendiculaires au plasmalemme. Aucun micropore n'a été décrit (Dubey and Lindsay, 1996).

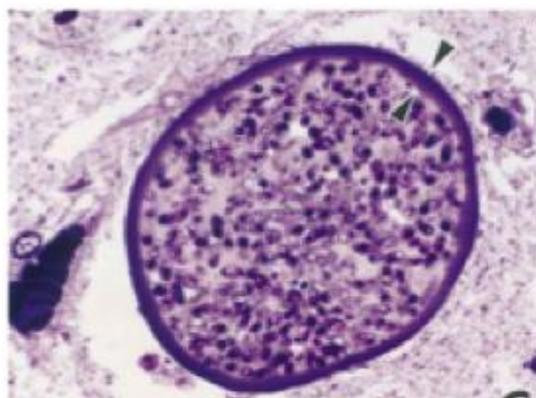
Les bradyzoïtes se divisent de manière lente par endodyogénie créant ainsi des kystes tissulaires de forme arrondie à ovale et mesurant jusqu'à 107  $\mu\text{m}$  de long.

Ces kystes possèdent une paroi de taille variable, probablement en relation avec la durée de l'infection, mais elle mesure toujours plus d'un micron ce qui constitue un critère de distinction avec *Toxoplasma gondii* dont la paroi des kystes est plus fine (Speer *et al.*, 1999).

La paroi des kystes est constituée d'une membrane externe unique et dense aux électrons ainsi que d'une membrane interne, granuleuse avec des structures tubulaires ramifiées. Elle est argentophile avec un pourtour éosinophile et est plus ou moins bien colorée au PAS.

Les kystes ne possèdent pas de cloison (septum). Ils contiennent plusieurs dizaines de bradyzoïtes (50 à 200) en forme de croissant et inclus dans une substance contenant des structures vésiculaires ramifiées, des corps denses, des électrons et des inclusions lipidiques (Hemphill, 1999) (voir photo 3).

La localisation des kystes de bradyzoïtes est limitée au tissu nerveux : encéphale, moelle épinière, nerfs et rétine (Dubey and Lindsay, 1996). Cependant, un kyste a été détecté dans un muscle oculaire de poulain (Dubey, 1999b).



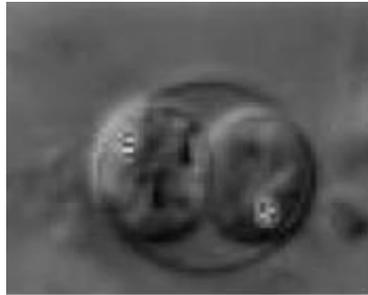
**Photo 3 :** Kyste tissulaire contenant des bradyzoïtes issu de l'encéphale d'un chien (Dubey *et al.*, 2002)

### c) Oocystes

La description de cette forme est récente et liée à l'identification du chien comme hôte définitif.

Les oocystes sont de forme sphérique à subsphérique, mesurent 10 à 11  $\mu\text{m}$ , leur paroi est lisse, non colorée et mesure 0.6 à 0.8  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Quand les oocystes sont émis, ils contiennent un sporonte central qui donnera deux sporocystes après sporulation, ces derniers contenant chacun quatre sporozoïtes et un résidu (Dubey *et al.*, 2002) (voir photo 5). Les oocystes qui n'ont pas sporulé n'ont aucun pouvoir infectant. Cependant leur résistance dans le milieu extérieur n'est pas connue (Chermette et Marquer, 2000).

L'apparence des oocystes de *Neospora caninum* est semblable à celle des oocystes de *Hammondia heydorni* retrouvés dans les fèces de chien, et à celle de *Toxoplasma gondii* et de *Hammondia hammondi* du chat. Il est difficile de les différencier morphologiquement (Lindsay *et al.*, 1999b).



**Photo 4** : Oocyste sporulé contenant deux sporozoïtes (Lindsay *et al.*, 1999b).

**Tableau 3** : Principaux critères de diagnose différentielle de *Neospora caninum* (Chermette et Marquer, 2000).

	<i>Neospora caninum</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Sarcocystis sp.</i>
<b>Structure générale</b>	Aspect identique au microscope optique		
	• PAS* négatif	• PAS* positif	
<b>Structure du kyste</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paroi plus épaisse (1-4µm) que la largeur des bradyzoïtes</li> <li>• Kyste tissulaire non septé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paroi plus fine (0,5µm) que la largeur des bradyzoïtes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paroi épaisse</li> <li>• Kyste tissulaire septé</li> </ul>
<b>Localisation des kystes tissulaires</b>	Tissu nerveux (cerveau, moelle épinière, rétine)	Nombreux tissus	Muscles squelettiques et cardiaques, SNC possible mais rare
<b>Ultrastructure des tachyzoïtes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rhoptries nombreuses</li> <li>• Micronèmes antérieurs et corps denses nombreux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rhoptries peu nombreuses</li> <li>• Micronèmes antérieurs et corps denses rares</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rhoptries absents</li> </ul>
<b>Mode de multiplication des tachyzoïtes</b>	Endodyogénie**	Endodyogénie	Endopolygénie

\*PAS : Coloration à l'Acide Périodique-Schiff

\*\* Endodyogénie : formation des éléments fils à l'intérieur de la vacuole parasitophore avec formation d'un pseudokyste.

## C - Pathogénèse

### 1) Pénétration et évolution du parasite au sein de l'organisme

Les tachyzoïtes constituent la forme infectante de *Neospora caninum*. La méthode d'invasion cellulaire par les parasites du groupe des Apicomplexa est commune et fait intervenir leur appareil apical (Hemphill, 1999). La multiplication rapide du parasite à l'intérieur des cellules crée des destructions importantes à l'origine des lésions observées.

Selon Hemphill, trois étapes se succèdent dans le processus d'invasion cellulaire (Hemphill, 1999). Une première phase concerne la reconnaissance et l'attachement du parasite à sa cellule hôte grâce à des récepteurs et des protéines libérées par les micronèmes, les rhoptries et les granules denses. La deuxième étape se rapporte à l'invasion active du parasite et la troisième à son développement intracellulaire.

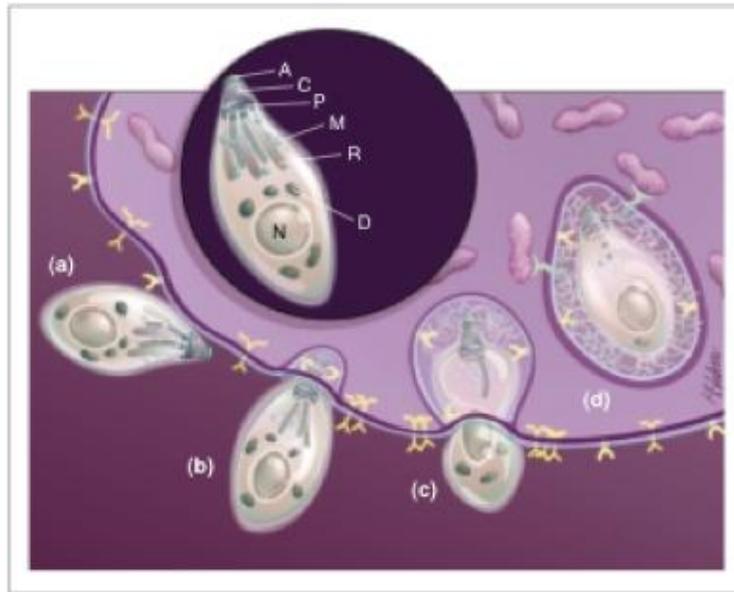
*Neospora caninum* va tout d'abord se fixer à la cellule, sans orientation particulière, par l'intermédiaire de ses antigènes de surface (*Neospora caninum* SAG-related sequence 2). Puis sous l'effet d'un gradient de distribution des récepteurs ou d'une affinité plus importante, le parasite va se réorienter de manière à présenter son pôle apical contre la membrane cellulaire. Cette réorientation provoque l'invagination de la membrane plasmique par le conoïde. Diverses protéines sont alors sécrétées dans la vacuole parasitophore formée par la membrane plasmique de la cellule hôte. Par ailleurs, les micronèmes synthétisent des adhésines qui permettent au parasite de rester attaché à la membrane de l'hôte, puis de rentrer progressivement dans la vacuole parasitophore (Buxton *et al.*, 2002) (voir figure 2).

Les granules denses sont alors libérés dans la vacuole et participent à la formation d'une membrane interne. Cependant la vacuole parasitophore ne fusionne pas avec les lysosomes car les protéines transmembranaires de la cellule hôte en sont exclues. Ainsi le processus d'invasion par les Apicomplexa est différent d'un processus phagocytique (Buxton *et al.*, 2002 ; Hemphill, 1999).

Plus d'une douzaine de protéines et deux antigènes majeurs pour l'invasion cellulaire ont été identifiés chez *Neospora caninum*. Le rôle de peu d'entre eux a été clairement élucidé ; pour les autres, les recherches continuent par analogie avec *Toxoplasma gondii* (Buxton *et al.*, 2002).

Récemment, douze anticorps monoclonaux produits expérimentalement ont permis d'établir la présence d'un antigène de surface impliqué dans l'invasion cellulaire (Uchida *et al.*, 2004) alors que jusque là, ce sont surtout des antigènes localisés à l'intérieur des granules denses, des micronèmes, de la partie postérieure des rhoptries et de la membrane de la vacuole parasitophore qui avaient été répertoriés (Hemphill, 1999). Par ailleurs, une nouvelle protéine (NcPI-S) localisée aux granules denses et sécrétée dans la vacuole parasitophore a été mise en évidence (Morris *et al.*, 2004).

Une étude plus poussée des mécanismes d'invasion cellulaire devrait permettre de comprendre pourquoi certains types de cellules sont plus touchés que d'autres et pourquoi certaines espèces comme les rongeurs sont résistants (Buxton *et al.*, 2002).



**Figure 2 :** Mécanisme d'invasion cellulaire par un tachyzoïte de *Neospora caninum* (Buxton *et al.*, 2002).

Légende :

A : anneau apical  
 C : conoïde  
 D : granules denses  
 M : micronème  
 N : nucleus  
 P : anneau polaire  
 R : rhoptries

- a) Fixation du tachyzoïte à la cellule sans orientation particulière
- b) Invasion par le conoïde et libération du contenu des organelles
- c) Pénétration du tachyzoïte à l'intérieur de la cellule
- d) Création d'une vacuole parasitophore

## 2) Réponse immunitaire de l'hôte

La présence d'une réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire a été démontrée chez des bovins à la fois infectés naturellement et expérimentalement avec des tachyzoïtes ou des oocystes.

La réponse immunitaire à médiation cellulaire semble avoir un rôle prédominant compte tenu de la localisation intracellulaire du parasite (Innes *et al.*, 2002). Les premières études réalisées sur des souris ont montré la prédominance d'une réaction de type Th1, faisant intervenir l'interleukine 12, l'interféron gamma produit par les lymphocytes T (CD4+) et le facteur TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) (Dubey, 1999b). Ces derniers inhibent la multiplication intracellulaire du parasite sous sa forme tachyzoïte (Innes *et al.*, 2000). Ainsi chez des souris inoculées avec *Neospora caninum*, la neutralisation de ces facteurs favorise la multiplication du parasite.

Des essais sur des vaches non-gravidés inoculées avec des tachyzoïtes par voie intramusculaire et intraveineuse ou sous cutanée, ont permis d'établir la présence d'une prolifération lymphocytaire et une production d'interféron gamma (Anderson *et al.*, 2000).

### a) Lors de transmission verticale

La gestation représente une situation particulière dans laquelle le système immunitaire est obligé de tolérer le fœtus qui représente un greffon étranger à l'organisme. La réponse de type Th1, dans laquelle interviennent l'interféron gamma, les cytokines pro-inflammatoires comme IL-2 et IL-12 ou encore le facteur TNF, est indispensable pour réduire la multiplication de *Neospora caninum*. Or la réponse de type Th1 est atténuée lors d'une gestation sinon elle provoquerait le rejet du fœtus (Buxton *et al.*, 2002 ; Innes *et al.*, 2002). C'est une réponse de type Th2 qui se met alors en place caractérisée par des cytokines comme l'IL-10, sécrétées par le trophoblaste, et par des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ ) produits sous l'influence hormonale de la progestérone (Quinn *et al.*, 2002). L'IL-10 est connue pour réguler la production d'interféron gamma.

Les anticorps interviendraient au moment de l'invasion cellulaire par les tachyzoïtes ainsi qu'au moment de leur passage inter-cellulaire, ces derniers étant accessibles.

Une augmentation du titre en anticorps est observée 15 jours après l'inoculation de vaches naïves à un stade précoce de leur gestation (36 jours) avec  $5.10^8$  tachyzoïtes. L'inoculation par voie intraveineuse induit une concentration plus élevée en anticorps que par voie sous-cutanée, les deux durant au moins deux mois et demi (Macaldowie *et al.*, 2004). La même dose inoculée par voie sous-cutanée à des vaches naïves gravidés de 140 jours, induit l'apparition d'anticorps au bout de 21 jours, qui dure au moins deux mois. Quant au fœtus, des IgG et IgM anti-*Neospora* apparaissent 42 jours après l'infection de leur mère (Bartley *et al.*, 2004).

La réponse de type Th2 n'intervient qu'en milieu de gestation et le devenir du fœtus dépend étroitement du stade de gestation auquel se transmet l'infection :

Si l'infection a lieu dans le premier tiers de gestation, cela induit soit un avortement, soit la naissance d'un veau infecté avec des symptômes. A ce stade, la réponse de type Th1 prédomine sur la réponse de type Th2. De plus, le système immunitaire du fœtus est immature (la rate, le thymus et les nœuds lymphatiques sont en formation).

Si l'infection a lieu dans le deuxième tiers de gestation, le système immunitaire du fœtus bien que rudimentaire, est compétent mais ne permet pas de le sauver (Buxton *et al.*, 2002). C'est à ce stade (5 mois environ) que survient la majorité des avortements (Dubey, 1999b). Pour mieux comprendre ce qui se passe à cette période-là, Bartley et ses

collaborateurs ont inoculé des vaches avec des tachyzoïtes à 150 jours de gestation. Sur tous les fœtus infectés à ce stade, la réponse immunitaire a été de type Th1 (Bartley *et al.*, 2004). La même manipulation réalisée par Anderson (Anderson *et al.*, 2000) montre qu'une réponse à médiation cellulaire de type Th1 se met en place chez les fœtus mais de façon aléatoire, alors que la réponse humorale reste élevée et constante chez tous les veaux. Elle se caractérise par l'apparition plus importante d'anticorps du type IgG1 qu'IgG2 (Anderson *et al.*, 2000). Parallèlement, une augmentation du taux d'anticorps est observée chez la mère (Innes *et al.*, 2002).

Par ailleurs, Si l'infection a lieu dans le dernier tiers de gestation, le veau qui naît est apparemment sain mais séropositif (Buxton *et al.*, 2002). En effet, à ce stade de gestation, le système immunitaire est parfaitement compétent.

Les vaches infectées avant leur gestation sont porteuses asymptomatiques du parasite. Ce dernier se retrouve généralement sous forme de kystes à bradyzoïtes dans leur système nerveux (Marquer et Chermette, 2000).

Le taux d'anticorps de six vaches gravides infectées naturellement est suivi. L'une d'entre elle avorte à 20 semaines, ce qui est corrélé à un pic d'anticorps. Une multiplication par 2 à 3 du taux d'anticorps des autres vaches est observé entre 24 et 36 semaines. Elles donneront toutes naissance à des veaux infectés (Williams *et al.*, 2003).

Par ailleurs, cinq vaches infectées naturellement sont inoculées à 70 jours de gestation avec  $10^7$  tachyzoïtes par voie intraveineuse. Leur taux d'anticorps est multiplié par 2 une semaine après l'inoculation et reste élevé pendant 6 semaines. Trois vaches donnent naissance à des veaux infectés et une augmentation du titre en anticorps est observée entre 26 et 34 semaines de gestation. Les deux autres vaches, qui ont donné naissance à des veaux sains, n'ont présenté aucun pic en anticorps (Williams *et al.*, 2003).

De même que lors d'infection exogène, les avortements se concentrent entre 120 et 170 jours de gestation. Toutefois, certains biais peuvent intervenir quant à ces observations. Il est difficile d'évaluer l'implication du parasite dans des stades de gestation plus précoces compte tenu du retour en oestrus parfois normal des vaches et de la difficulté à faire des diagnostics précoces d'avortements.

L'étiologie d'une réactivation est mal connue. On suppose que lorsqu'une gestation débute, les kystes à bradyzoïtes se réactivent libérant des bradyzoïtes puis des tachyzoïtes (Innes *et al.*, 2000). On peut penser que ces derniers ne se sont pas encore assez multipliés pour atteindre le fœtus et induire des dommages. Par ailleurs, il est très difficile d'identifier des tachyzoïtes dans le premier tiers de gestation dans le placenta ou les tissus fœtaux. Les risques d'avorter semblent être plus élevés dans le deuxième tiers de gestation et il a été démontré que le fait d'avorter à ce stade est corrélé à une augmentation du taux d'anticorps chez la mère, alors qu'une élévation du taux d'anticorps à la fin de la gestation conduit souvent à la naissance de veaux infectés chroniques (Paré *et al.*, 1997). On peut penser que le système immunitaire du veau, mature et efficace, le protège à ce stade d'une mort mais pas d'une infection.

Les bovins infectés transmettent très fréquemment et de manière efficace le parasite à leur descendance ce qui suggère que l'immunité développée suite à la primo-infection n'est pas suffisante pour protéger le fœtus (Anderson *et al.*, 2000).

Les avortements semblent faire suite à une réactivation du parasite lors de la gestation. Cependant on ne sait pas vraiment ce qui favorise ce réveil. Certains auteurs penchent vers une modification de la réponse immunitaire avec la prédominance d'une réponse immunitaire de type Th2 permettant au parasite de se multiplier (Innes *et al.*, 2000). Le devenir du fœtus résulte donc d'un équilibre entre une réponse immunitaire de type Th1 efficace pour lutter contre *Neospora caninum* et la sauvegarde de la gestation permise par une réponse de type Th2. Pourtant, on ne sait toujours pas pourquoi une majorité des vaches infectées transmettent le parasite à leurs filles alors que d'autres avortent. Le stade auquel les anticorps maternels augmentent semble jouer un rôle prépondérant quant au devenir du fœtus (Paré *et al.*, 1997), mais le déterminisme du moment de leur apparition reste méconnu.

De nombreux aspects concernant la réponse immunitaire maternelle et foetale ne sont pas encore établis et l'on peut penser que le devenir du fœtus est le résultat de différents facteurs, tels que le moment de la parasitémie pendant la gestation, l'importance et la durée de cette parasitémie, l'efficacité de la réponse immunitaire maternelle, le degré de maturité du système immunitaire du fœtus, et d'autres facteurs à ce jour inconnus (Hemphill and Gottstein, 2000).

#### b) Lors de transmission horizontale par les oocystes

Peu de données sont rapportées à ce sujet, nous nous baserons sur les résultats d'une étude expérimentale.

Sept veaux âgés de 2.5 mois sont nourris avec  $10^4$ - $10^5$  oocystes de chiens. De nombreux lymphocytes apparaissent dans le sang une semaine après l'infection. Ils persistent dans le sang, la rate et dans les noeuds lymphatiques mésentériques, inguinaux et bronchiques pendant plus de deux mois. Cependant, la proportion de lymphocytes T(CD3+) est faible comparée à la proportion de lymphocytes T(CD3+) des veaux non infectés. Le pourcentage de lymphocytes T-helper (CD4+), de lymphocytes T cytotoxiques (CD8+), de récepteurs à l'interleukine 2, de lymphocytes B, de monocytes et de macrophages est normal (De Marez *et al.*, 1999).

Les anticorps IgG1 et IgG2 apparaissent entre 2 et 4 semaines respectivement alors qu'ils apparaissent entre 3 et 5 semaines chez des veaux infectés par voie orale ou par voie sous-cutanée avec des formes tachyzoïtes. Les IgM sont détectés 2 semaines après l'infection et diminuent au bout d'un mois. Toutefois, certains veaux présentent une réponse en anticorps faible (De Marez *et al.*, 1999).

### c) Lésions

La multiplication des tachyzoïtes à l'intérieur des cellules cibles provoque des lésions du fœtus et du placenta, caractérisées par une inflammation non-suppurée associée à des foyers de nécrose (Dubey, 1999b).

Les lésions provoquées par les kystes tissulaires sont plus rares et l'inflammation non systématique. Les kystes rompus entraînent souvent une réaction granulomateuse, alors que les kystes intacts ne sont pas phlogogènes.

Les principales localisations sont le système nerveux central, le coeur, les muscles squelettiques et le foie. Les reins, le poumon et le placenta seront touchés dans une moindre mesure (Anderson *et al.*, 1991).

Les fœtus expulsés précocement sont dans la plupart des cas momifiés ou autolysés. Les lésions macroscopiques sont peu nombreuses (plages blanches dans les muscles et le cœur, foyers décolorés ou surcolorés dans l'encéphale, dilatation des cavités cardiaques) (Anderson *et al.*, 1994).

Sur le plan microscopique, les lésions cérébrales sont caractérisées par une infiltration leucocytaire multifocale ou diffuse (encéphalomyélite non-suppurée), parfois associée à des foyers de nécrose (malacie) ou encore à des foyers de gliose. Ces derniers sont souvent adjacents des capillaires dont l'endothélium est hypertrophié et entouré d'un manchon de cellules mononucléées. L'image la plus caractéristique correspond à des foyers nécrotiques, le plus souvent situés dans la substance blanche, dans le tronc cérébral, entourés de cellules mononucléées (voir photo 5). Une infiltration leucocytaire mononucléée des méninges, et des kystes parasitaires sont visibles dans certains cas. Enfin une calcification précoce des foyers nécrotiques a été décrite (Dubey and Lindsay, 1996).

Les lésions du myocarde peuvent être sévères (myocardite extensive et nécrose des myocytes).

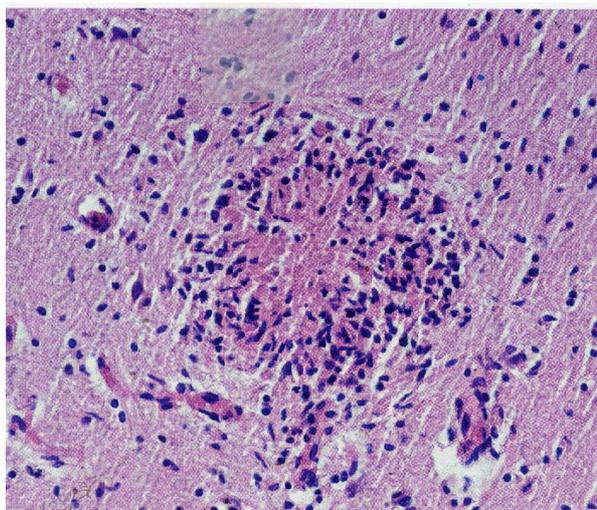
L'atteinte hépatique se traduit essentiellement par une infiltration de la zone périportale par des cellules mononucléées ainsi que des foyers de nécrose hépatocytaire. Un thrombus de fibrine est parfois présent dans les capillaires sinusoides. Les lésions hépatiques seraient plus fréquentes lors d'avortements épizootiques (Dubey and Lindsay, 1996).

*Neospora caninum* est plus souvent détecté dans l'encéphale, le coeur et le foie. Toutefois l'infiltration par des cellules mononucléées des muscles squelettiques, des reins, des poumons et du mésentère intestinal a pu être observée.

Les lésions placentaires sont plutôt rares (Dubey and Lindsay, 1996). Dans les conditions expérimentales ou naturelles, les lésions inflammatoires touchent d'abord les cotylédons pour gagner ensuite l'ensemble de l'allantochorion. En parallèle, le parasite passe dans le système sanguin du fœtus envahissant préférentiellement son système nerveux (Buxton *et al.*, 2002). Les lésions de placentite et de nécrose du mésenchyme et du trophoblaste foetal sont d'autant plus graves que le nombre de tachyzoïtes est élevé (voie intraveineuse versus voie sous-cutanée) (Macaldowie *et al.*, 2004).

Les tissus maternels et fœtaux sont tous deux atteints par *Neospora caninum*, mais les conséquences sont différentes en fonction de l'âge du fœtus. Quand celui-ci est jeune, le parasite se multiplie activement, les lésions de nécrose sont étendues avec une inflammation faible, l'infection devient alors létale. Chez les fœtus ayant acquis une certaine immunité, les lésions de nécrose sont localisées avec une réaction inflammatoire beaucoup plus intense pouvant ainsi provoquer une méningite chez le veau nouveau-né (Buxton *et al.*, 2002).

Enfin la présence de kystes à bradyzoïtes dans les tissus fœtaux est peu rapportée. Ils sont visibles uniquement dans l'encéphale, le plus souvent en dehors des lésions observées.



**Photo 5** : Coupe histologique d'un encéphale de fœtus bovin : lésion inflammatoire avec un centre nécrotique (Wouda, 1998).

## D – Les conséquences cliniques

### 1) Espèce bovine

#### a) Chez les bovins adultes

L'infection par *Neospora caninum* est asymptomatique chez les bovins adultes en dehors des périodes de gestation. L'infection exogène en période de gestation est susceptible de provoquer des avortements apyrétiques, sans rétention placentaire ni complication infectieuse avec un retour en chaleur rapide (Björkman *et al.*, 1996). Ainsi, la fertilité pour le cycle qui suit n'est pas modifiée et le taux de réussite à l'insémination suivante est bon. Des glaires translucides, liées à un oestrus, peuvent être observées dans certains cas le jour de l'expulsion du fœtus (Journel et Pitel, 2001a).

Le fœtus peut mourir *in utero*, il est parfois résorbé ou autolysé et plus fréquemment momifié. Le veau peut être mort-né, naître vivant malade ou infecté chronique (Björkman *et al.*, 1996 ; Dubey and Lindsay, 1996).

L'avortement survient à partir du troisième mois de gestation jusqu'au terme (Dubey and Lindsay, 1996). Cependant deux pics d'avortements sont fréquemment rapportés à 5,5 mois et à 7 mois. Les variations semblent nombreuses. Par ailleurs, une mortalité embryonnaire ou fœtale précoce peut passer inaperçue avec un retour en oestrus de l'animal (Losson et Bourdoiseau, 2000).

Les avortements peuvent être d'allure sporadique, épizootique (jusqu'à 30% du troupeau atteint en quelques semaines) ou enzootique avec une faible incidence. Lorsque le taux de vaches positives est relativement faible (inférieur à 10%) ou que la maladie se propage par transmission verticale uniquement, les avortements sont plutôt sporadiques. Les avortements peuvent être épizootiques dans les élevages lorsque la transmission horizontale prédomine (de nombreuses vaches se contaminent en même temps à une même source), dans les élevages où intervient un hôte définitif qui était absent auparavant du site, ou encore dans les élevages à taux de séropositivité faible ou moyen, à la suite d'un stress subi par tout le troupeau (Journel et Pitel, 2001a).

Aucun caractère saisonnier n'a pu être mis en évidence (Anderson *et al.*, 1991), cependant des différences existent d'un pays à l'autre.

Les troupeaux laitiers semblent être plus fréquemment atteints que les troupeaux allaitants (Dubey and Lindsay, 1996). Toutefois, les troubles de la reproduction sont mieux suivis dans les troupeaux laitiers.

Plusieurs études indiquent qu'une vache infectée peut avorter plusieurs fois. Cependant beaucoup d'entre elles sont réformées après le premier avortement et il est donc difficile d'évaluer la fréquence de la récurrence. Toutefois, il semble que moins de 5% (4/112) des vaches séropositives vis-à-vis de *Neospora caninum* et ayant avorté, avorteraient plus d'une fois (Anderson *et al.*, 1995).

## b) Chez le veau nouveau-né

Le veau peut naître mort-né, malade ou le plus souvent infecté chroniquement et sans symptôme. Il faut savoir qu'entre 80 et 90% des veaux nés de mères contaminés sont eux-mêmes infectés et sont séropositifs avant la prise colostrale (Paré *et al.*, 1996 ; Schares *et al.*, 1998).

Une très faible proportion des veaux nouveaux-nés infectés développe des signes cliniques. Ces derniers sont présents dès la naissance ou apparaissent entre trois jours et deux semaines après la naissance.

Les troubles sont principalement nerveux, ils se traduisent par une incapacité à se lever. L'examen neurologique met en évidence une ataxie, une diminution des réflexes patellaires et une perte des réflexes de proprioception. Un retard de croissance est possible. Les articulations, en particulier distales des membres antérieurs et/ou postérieurs peuvent être fléchies ou hypertendues (Parish *et al.*, 1987). D'autres signes comme une exophtalmie, une déviation du globe oculaire (strabisme), de l'hydrocéphalie, des déformations des membres associés à une myosite ou encore une déviation de la colonne vertébrale ont été rapportés (Bryan *et al.*, 1994 ; Dubey *et al.*, 1990a). La plupart des veaux atteints cliniquement meurent ou sont euthanasiés dans le premier mois suivant la naissance (Dubey and Lindsay, 1996).

L'intensité et la nature des signes cliniques sont variables d'un veau à l'autre selon l'âge du fœtus, la distribution des lésions au sein du système nerveux et l'immunocompétence au moment de l'exposition à *Neospora caninum* (Anderson *et al.*, 1997).

Toutefois, la physiopathologie des troubles nerveux du veau nouveau-né n'est pas connue. Deux hypothèses peuvent être émises quant à l'origine de l'infection : soit elle est anté-natale, exogène (tardive ou moyenne) ou endogène, soit elle est post-natale.

Dans la plupart des cas, les veaux naissent apparemment sains mais séropositifs. Ainsi jusqu'à 95% des veaux infectés au cours de la gestation sont cliniquement normaux mais porteurs d'anticorps à leur naissance. Ces veaux vont jouer un rôle important dans la persistance de *Neospora caninum* à travers les différentes générations (Anderson *et al.*, 2000).

## 2) Espèce canine

### a) Chez le chiot

Les chiots âgés de 2 semaines à 4 mois sont les plus fréquemment et gravement atteints, suite à une contamination pendant la gestation. Aucun avortement n'a été rapporté à ce jour mais des études expérimentales ont fait état de mortinatalité chez certains chiots, la plupart naissant normaux mais infectés (Dubey and Lindsay, 1996).

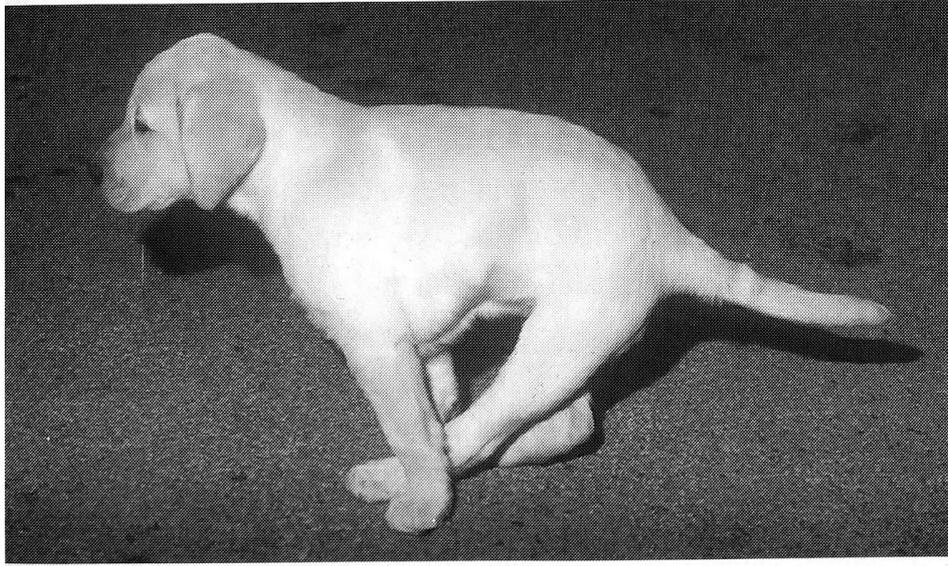
Certaines races semblent plus touchées que d'autres : le labrador retriever, le boxer, le greyhounds, le golden retriever ou le basset hounds (Dubey and Lindsay, 1996).

Les signes cliniques sont essentiellement nerveux et dépendent du site atteint par le parasite. Une parésie suivie d'une paralysie ascendante apparaît progressivement, affectant plus sévèrement les membres postérieurs que les membres antérieurs. La paralysie peut-être flasque ou spastique mais dans la moitié des cas, les postérieurs sont en hyperextension. L'atteinte des membres postérieurs peut être uni ou bilatérale (Barber, 1998).

Au départ, les chiots ont une démarche en « saut de lapin », une réticence à sauter ou un écartellement des membres quand ils sont couchés. Ensuite, l'animal prend la position dite du « phoque » (Guillot *et al.*, 2000) (voir photo 6). Cette hyperextension peut s'expliquer par une atteinte combinée des neurones moteurs (paralysie) et des muscles (myosite) ce qui conduit à une contracture et de la fibrose (Dubey and Lindsay, 1996). Une ankylose articulaire, une amyotrophie plus ou moins localisée ainsi qu'une myalgie peuvent venir compliquer le tableau clinique (Guillot *et al.*, 2000).

D'autres symptômes sont possibles : paralysie de la mâchoire (myosite touchant les masticateurs) entraînant des troubles de l'alimentation, dysphagie associée ou non à un mégaoesophage, ataxie, amaurose, crises convulsives, nystagmus. Des troubles du comportement sont parfois présents (Guillot *et al.*, 2000). La myocardite à *Neospora caninum* pourrait causer des mortalités néo-natales mais rien n'a été prouvé.

L'issue dépend de la gravité des symptômes. Dans les formes suraiguës, la mort intervient dans la semaine qui suit l'apparition des signes cliniques. Le plus souvent, l'évolution est lente et les chiots restent généralement en bon état général jusqu'au stade terminal (pas d'anorexie ni de fièvre). Le chiot décède des conséquences de la méningo-encéphalite, d'une défaillance cardiaque, d'une pneumonie ou est euthanasié (Barber, 1998).



**Photo 6** : Labrador retriever avec une hyperextension spastique des deux postérieurs (Wouda, 1998).

#### b) Chez l'adulte

L'infection chez l'adulte prend deux formes : une forme asymptomatique intestinale qui correspond à la phase sexuée du cycle de *Neospora caninum* (Lindsay *et al.*, 1999a ; McAllister *et al.*, 1998) et une forme clinique dans laquelle les tachyzoïtes envahissent divers organes. Il est difficile de savoir si la maladie est due à une primo-infection ou à une réactivation du parasite (Guillot *et al.*, 2000).

L'atteinte nerveuse est comparable à celle du chiot, la parésie observée étant directement causée par la radiculonévrite et la myosite.

L'atteinte cutanée est une manifestation clinique inhabituelle. Elle s'exprime par des nodules ulcéronécrotiques présents sur tout le corps. Ces nodules peuvent être très volumineux (5 cm) et sont associés à une adénomégalie satellite. Si l'atteinte est étendue, l'état général de l'animal peut être fortement altéré et conduire à l'euthanasie. À ce jour, une douzaine de cas ont été décrits, ils concernent principalement des chiens âgés. Sur l'un d'entre eux notamment, la lésion cutanée était riche en tachyzoïtes (Dubey, 1999b).

Enfin, des signes de pneumonie, d'encéphalite, de pancréatite ou d'hépatite ont été rapportés. Ces deux dernières affections conduisent à des signes cliniques tels que vomissements ou polydipsie (Barber, 1998).

Les tableaux 4 et 5 regroupent les premiers signes nerveux et non-nerveux présents lors de néosporose.

**Tableau 4 :** Syndrome de polyradiculonévrite-myosite lors de néosporose (Barber, 1998).

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Principaux signes d'appels nerveux</b></li> <li>- Réflexes proprioceptifs et spinaux modifiés</li> <li>- Atrophie musculaire</li> <li>- Myalgie des quadriceps, des muscles lombaires et plus rarement des muscles cervicaux</li> <li>- Cyphoscoliose lombaire</li> <li>- Hyperextension spastique d'un membre postérieur ou des deux</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Autres symptômes nerveux</b></li> <li>- Parésie des membres antérieurs (uni- ou bilatéral)</li> <li>- Hémiparésie/quadriparésie</li> <li>- Ataxie/hypermétrie</li> <li>- Comportement modifié</li> <li>- Cécité d'origine centrale</li> <li>- Inclinaison de la tête</li> <li>- Hochements de la tête/tremblements</li> <li>- Crises convulsives</li> </ul>

**Tableau 5 :** Tableau clinique non nerveux de la néosporose (Barber, 1998).

État général	Age des cas confirmés	Signes d'appel
Myocardite	2 jours-10 mois	Mort subite
Pneumonie	11 ans	Toux, léthargie, fièvre
Dermatite	6-15 ans	Dermatite hémorragique, ulcérate, nécrotique, pyogranulomateuse à foyers multiples.

### 3) Espèce ovine et caprine

Un cas unique a été rapporté concernant l'espèce ovine. Il s'agit d'un agneau né en bonne santé qui est décédé à une semaine d'âge après des symptômes d'ataxie. Les lésions microscopiques consistent en une encéphalomyélite non-suppurée et une réduction unilatérale de la substance grise au niveau de la corne ventrale. Le diagnostic a été établi grâce à la microscopie électronique et l'immunohistochimie (Dubey and Lindsay, 1996).

Expérimentalement, les moutons sont très sensibles à l'infection par *Neospora caninum*. Les signes cliniques et les lésions sont similaires à ceux observés chez les bovins. Ils développent par ailleurs une réponse en anticorps qui persiste plus d'un an. Les lésions induites sont proches de celles trouvées chez les brebis gravides infectées par *Toxoplasma gondii*. Il est donc nécessaire d'inclure *Neospora caninum* dans le diagnostic différentiel des avortements.

Par ailleurs, la facilité d'induction des avortements, ainsi que la reproductibilité des symptômes font des moutons un bon modèle d'étude à prix réduit (Dubey and Lindsay, 1996).

Plusieurs cas d'avortements dus à *Neospora caninum* ont été décrits dans des élevages caprins en Californie, en Pennsylvanie et au Costa Rica. Les lésions mises en évidence sont identiques à celles décrites chez les bovins (Dubey and Lindsay, 1996).

L'inoculation de *Neospora caninum* à des chèvres a permis d'étudier le lien entre le stade de gestation et l'expression clinique. En début de gestation, le fœtus meurt avec résorption embryonnaire ou avortement 30 jours plus tard ; en milieu de gestation les chevreaux sont morts-nés ou vivants et sains ; en fin de gestation ils sont sains (Lindsay *et al.*, 1995). *Neospora caninum* a pu être mis en évidence chez les chevreaux mort-nés ou les avortons mais pas chez les chevreaux nés en bonne santé. En revanche, ces derniers ainsi que les chèvres adultes ont développé des concentrations en anticorps élevées et persistantes. Aucune transmission congénitale n'a été observée lors de mise bas ultérieure (Dubey and Lindsay, 1996).

En France, une enquête sérologique dans les élevages caprins de l'Ouest a permis d'établir une séroprévalence de 8,9% à l'échelle du troupeau et de 1,4% à l'échelle individuelle, ce qui suggère une faible circulation du parasite dans les conditions naturelles d'infection (Chartier *et al.*, 2000).

#### 4) Espèce équine

La néosporose équine a été décrite principalement en France et aux Etats-unis.

Les chevaux développent une forme clinique nerveuse classique ou des formes plus rares (Pronost *et al.*, 2000).

Les cas de néosporose diagnostiqués sont pour la plupart des troubles nerveux (encéphalomyélite) et plus rarement des troubles de la reproduction (avortements) (Pronost *et al.*, 2000).

Beaucoup de cas à forme nerveuse du type encéphalomyélite (ataxie, paralysie...) ont été attribués à tort à d'autres agents infectieux et notamment à *Sarcocystis neurona*. Or la ressemblance entre les deux types d'encéphalomyélite équine à protozoaire (MEP) nécessite le recours obligatoire à des examens complémentaires (Marsch *et al.*, 1996). En effet, s'il existe un traitement contre *Sarcocystis neurona*, aucun traitement spécifique n'existe contre *Neospora caninum*.

Quant aux avortements, ils n'ont pas le même poids que chez les bovins. Cependant, la néosporose doit être incluse dans le diagnostic différentiel, notamment quand les causes classiques d'avortements ont déjà été explorées (Pronost *et al.*, 2000).

Un cas particulier a concerné un cheval âgé de 10 ans avec une forme viscérale de la néosporose, jusque-là inconnue. Suite à une perte de poids et une anémie, le cheval a été autopsié. Des lésions de nécrose, d'hémorragie et de thrombose concernant les intestins et les noeuds lymphatiques mésentériques en association avec des tachyzoïtes ont été retrouvés.

En 1998, une nouvelle espèce de *Neospora* a été découverte sur un cheval âgé de 11 ans, *Neospora hughesi*, différente de *Neospora caninum* sur les plans ultrastructural, antigénique et surtout génétique avec *Neospora caninum* (Pronost *et al.*, 2000) (tableau 6).

**Tableau 6 :** Différences ultra-structurales, antigéniques et génétiques entre les souches de *Neospora hughesi* (NE-1) et *Neospora caninum* (BPA-1 et CN-1) (Pronost *et al.*, 2000).

		<i>Neospora caninum</i>	<i>Neospora hughesi</i>
<b>Différences ultra-structurales</b>	- nombre de rhoptries - épaisseur de la paroi des kystes	8-18 1 à 4 micron	13-27 0,15 à 1 micron
<b>Différences antigéniques</b>	- reconnaissance des <i>Ac polyclonaux anti-BPA-1</i> : Ag 70 kDA Ag 33, 18 et 27 kDA	pas de réaction +++	+++ pas de réaction
	- reconnaissance des <i>Ac polyclonaux anti-NE-1</i> : Ag 65, 29 et 16 kDA Ag 45 kDA	pas de réaction +++	+++ pas de réaction
<b>Différences génétiques</b>	- comparaison de la région ITS-1 - comparaison de la séquence de la petite sous-unité de l'ARNr - comparaison des séquences des protéines de surface : SAG SRS	7 bases de différence  pas de différence  NcSAG1 6% de différence NhSAG1 NcSRS2 9% de différence NhSRS2	

## 5) Espèce féline

L'espèce féline a été une des premières espèces suspectée comme hôte définitif dans le cycle de *Neospora caninum* par analogie avec *Toxoplasma gondii*.

Cependant aucun cas d'infection naturelle n'a été décrite à ce jour bien que l'infection expérimentale des chats avec *Neospora caninum* soit aisée (Dubey *et al.*, 1990c).

C'est dans l'espèce féline qu'il a été démontré pour la première fois que la transmission verticale était possible, même lorsque l'infection avait lieu avant la gestation. Chez les chats inoculés par voie orale ou injection sous-cutanée avec des kystes ou des tachyzoïtes, les symptômes sont identiques à ceux retrouvés chez le chien : encéphalomyélite, myosite généralisée ainsi que de la mortalité embryonnaire chez les femelles gravides (Dubey and Lindsay, 1996). Les lésions sont similaires à celles observées lors de toxoplasmose chez le chat (Dubey *et al.*, 1990c).

Cependant, l'administration de kystes par voie orale ou de tachyzoïtes par voie parentérale n'aboutit pas à l'élimination d'oocystes dans les matières fécales, ce qui peut exclure le chat en tant qu'hôte définitif (Losson et Bourdoiseau, 2000). Toutefois, quelques réserves peuvent être émises car les hôtes définitifs considérés comme tels à ce jour, excrètent peu d'oocystes.

Enfin, la néosporose est incluse dans le diagnostic différentiel de certains troubles nerveux du chat. En effet, des sérologies positives élevées ont été associées à des signes nerveux (Guillot *et al.*, 2000).

## 6) Espèce humaine

Les primates non-humains constituent des hôtes intermédiaires potentiels. L'infection expérimentale de macaques par des injections intramusculaires et intraveineuses de tachyzoïtes de *Neospora caninum* d'origine bovine, à 43 jours de gestation, a mis en évidence des lésions foetales similaires à celles retrouvées chez les bovins, avec la présence de tachyzoïtes, ainsi qu'une réponse en anticorps sérique. L'infection du singe par *Neospora caninum* semble offrir de nombreuses similitudes avec la toxoplasmose congénitale de l'homme (Dubey and Lindsay, 1996).

Des études sérologiques sur deux populations humaines ont été réalisées.

La première concerne 199 sérums de donneurs de sang et 44 sérums d'agriculteurs d'Irlande du Nord (Graham *et al.*, 1999). Les anticorps spécifiques ont été recherchés par immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules Véro infectées par *Neospora caninum*, avec un seuil de positivité défini au 1/160. Aucun anticorps n'a été retrouvé alors que 43% des sérums possédaient des anticorps anti-*Toxoplasma gondii* (Graham *et al.*, 1999).

Dans la seconde étude, sur 1029 sérums de donneurs de sang aux États-Unis, soixante-neuf sérums (6,7%) se sont révélés positifs en IFI au seuil de 1/100 parmi lesquels 72% étaient négatifs vis-à-vis de *Toxoplasma gondii* (Tranas *et al.*, 1999). La spécificité de la réponse vis-à-vis de *Neospora caninum* a été confirmée par immunoblot. Plusieurs sérums reconnaissent de multiples antigènes de *Neospora caninum* de masses moléculaires semblables à celles reconnues par un sérum de singe anti-*Neospora caninum*. Des anticorps dirigés contre un antigène dominant de 35kDa ont été retrouvés dans douze sérums (Tranas *et al.*, 1999).

Les résultats des deux enquêtes sont donc contradictoires et la seconde étude est la première à mettre en évidence une séropositivité chez l'homme même si les titres d'anticorps sont très bas. Cependant la réalité de l'infection ainsi que la signification de la positivité demeurent inconnues.

## E - Le diagnostic de la néosporose chez les bovins

### 1) Clinique et épidémiologique

Deux situations doivent amener à suspecter la maladie dans un élevage.

Les avortements sont le signe d'appel le plus fréquent. Ils ont lieu plutôt en milieu et fin de gestation (entre le troisième et le neuvième mois), sont apyrétiques et sans prodrome. Aucune rétention placentaire ni infection utérine ou retour en oestrus décalé n'est observé (Journel et Pitel, 2001a). Toutefois, l'estimation des stades de gestation auxquels ont lieu les avortements dus à *Neospora caninum* présente des biais importants compte tenu de la difficulté à détecter les avortements embryonnaires et foetaux précoces, surtout si un suivi de gestation n'est pas effectué. De plus, le parasite est rarement retrouvé à ces stades-là, ce qui ne signifie pas qu'il n'est pas à l'origine de l'avortement.

Le nombre d'avortements ne constitue pas un élément de suspicion (Journel et Pitel, 2001a).

Les affections nerveuses néonatales imputables à la néosporose sont beaucoup plus rares que les avortements. Des troubles locomoteurs associés à des signes nerveux (ataxie, raideur des membres, paralysie) ou à des déficits pondéraux doivent faire penser à la néosporose (Journel et Pitel, 2001a).

Les avortements, les affections nerveuses néonatales et la mortinatalité sont des éléments essentiels pour la suspicion de la néosporose dans un élevage, mais ne sont en aucun cas pathognomoniques.

## 2) Différentiel

### a) Étiologie des avortements chez la vache

On considère généralement que la moitié des avortements sont d'origine infectieuse (bactérienne, virale ou fongique) et l'autre moitié d'origine non infectieuse (génétique, mécanique, iatrogène ou toxique) (Tainturier *et al.*, 1997a). Mais il est difficile de donner des chiffres précis, toutes les investigations n'étant souvent pas réalisées simultanément par manque de temps, de moyens ou encore de prélèvements.

Les différentes causes d'avortement sont regroupées dans les tableaux 7, 8 et 9. La néosporose fait partie des maladies difficile à diagnostiquer, elle sera à considérer dans un premier temps. Néanmoins le recours aux analyses de laboratoire paraît essentiel pour établir un diagnostic de certitude (Tainturier *et al.*, 1997a).

**Tableau 7** : Diagnostic différentiel des avortements chez les bovins : maladies infectieuses à rechercher dans un premier temps (d'après Tainturier *et al.*, 1997a ; Tainturier *et al.*, 1997b).

Étiologie	Épidémiologie	Période de l'avortement	Signes cliniques	Prélèvements	Diagnostic
<b>Brucellose</b> <i>Brucella abortus</i>	Epizootique à enzootique	Entre le 6° et le 9° mois (dernier trimestre)	- Mortinatalité et veaux chétifs - Placentite - Non délivrance - Infertilité	Fœtus, placenta, lait, sécrétions génitales et sang	- Bactérioscopie : calques et coloration - Bactériologie : culture (milieu de Farre) - Sérologie : EAT et FC ou ELISA
<b>Salmonellose</b> <i>Salmonella dublin</i> > <i>S. Typhimurium</i> > <i>S. Enteritidis</i>	Sporadique, parfois enzootique	6°, 7°, 8° mois de gestation (génisses surtout)	- Crise d'entérite avec hyperthermie et tufhos (qq jrs avant) - Hépatite avec ictère et fièvre - Veaux mort-nés - Non-délivrance	Fœtus, placenta, sang	- Bactérioscopie : calques et coloration - Bactériologie : culture - Sérologie : séroagglutination
<b>Chlamydirose</b> <i>Chlamydia abortus</i>	Sporadique	Dernier tiers de gestation	- Métrites, mammites, troubles de la reproduction - Non-délivrance - Entérites, affections pulmonaires, encéphalomyélite sporadique	Fœtus, placenta, sang	- Bactérioscopie : calque et coloration de Machiavello - PCR - Sérologie : FC ou ELISA
<b>Fièvre Q</b> <i>Coxiella burnetii</i>	Enzootique	Tous les stades (surtout dernier tiers)	- Vêlages prématurés - Non-délivrance - Métrites	Fœtus, placenta, sang	- Bactérioscopie : calque et coloration - PCR - Sérologie : FC ou ELISA
<b>Listériose</b> <i>Listeria monocytogenes</i>	Sporadique	Entre le 4° et 8° mois	- Hyperthermie, diarrhée profuse - Métrites aiguës - Non-délivrance - Vêlages prématurés - Veaux chétifs, mortinatalité	Fœtus, placenta	- Bactériologie : culture directe ou après enrichissement
<b>Mycoses</b> <i>Aspergillus</i> +++, <i>Candida</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Absidium</i>	Sporadique à épizootique	Entre le 3° et 8° mois	- Vêlage prématuré - Mortinatalité - Rétention placentaire	Fœtus (caillette), placenta	- Culture - Histologie

**Tableau 8** : Diagnostic différentiel des avortements chez les bovins : maladies infectieuses à rechercher dans un deuxième temps (d'après Tainturier *et al.*, 1997a ; Tainturier *et al.*, 1997b).

Étiologie	Épidémiologie	Période de l'avortement	Signes cliniques	Prélèvements	Diagnostic
<b>Leptospirose</b> <i>Leptospira interrogans</i> , <i>L. icterohaemorrhagiae</i> , <i>L. Grippotyphosa</i>	Sporadique, parfois enzootique	Dernier tiers de gestation	- Veaux malades - Non-délivrance, endométrites, stérilité - Lésions cutanées, entérites, ictère, mammites, lait rosé, agalaxie - Hyperthermie, anémie	Urines, lait, fœtus, placenta et sang	- Microscopie sur fond noir, coloration - Bactériologie difficile - Sérologie : microagglutination ou FC
<b>Campylobactériose</b> <i>Campylobacter fetus venerealis</i> , <i>C fetus fetus</i>	Sporadique	Entre le 30 et 45° jour	- Stérilité temporaire - Vaginite, endométrite - Mortalité embryonnaire précoce	Fœtus, placenta, mucus	- Bactérioscopie coloration et calques - Bactériologie : culture sur milieux spécifiques
<b>Rhinotracheite infectieuse (IBR)</b> Herpesvirus bovin 1	Sporadique à épizootique	Après 150 jours (5 mois)	- Vulvo-vaginite et métrites, balanoposthite - Mortinatalité, veaux chétifs - Rhinotracheite	Fœtus, sang	- IF directe (foie, reins) - Virologie : culture sur milieux cellulaires - Sérologie : ELISA
<b>BVD/MD</b> Pestivirus	Sporadique à épizootique	Avant 5 mois	- Mortinatalité, IPI, veaux chétifs - Maladie des muqueuses - Infertilité	Fœtus, sang	- Histologie - Culture sur milieux cellulaires ou recherche du virus - Sérologie : ELISA
<b>Trichomonose</b> <i>Trichomonas foetus</i>	Sporadique	Avant 3 mois	- Vaginite, endométrite, pyomètre - Stérilité chez le taureau	Fœtus, mucus (préputial ou vaginal), placenta	- Histologie - Culture sur milieux spécifiques
<b>Sarcosporidiose</b> <i>Sarcocystis cruzii</i>	Sporadique	Variable	- Fièvre, anorexie, sialorrhée, ulcères buccaux, alopecie - Hémorragie, pétéchies et anémie - Troubles nerveux	Placenta, sang	- Examen anatomopathologique - Sérologie : peu fiable

**Tableau 9** : Diagnostic différentiel des avortements chez les bovins : causes non infectieuses (d'après Tainturier *et al.*, 1997a ; Tainturier *et al.*, 1997b).

<b>Étiologie</b>	<b>Épidémiologie</b>	<b>Période de l'avortement</b>	<b>Signes cliniques</b>	<b>Prélèvements</b>
<b>Facteurs génétiques</b>	Sporadique	Précoce (souvent foetale)	Absence	Aucun
<b>Facteurs mécaniques</b>	Sporadique	Tous les stades	- Hyperthermie - Traumatismes - Interventions chirurgicales - Palpation transrectale et énucléation du corps jaune	Aucun
<b>Facteurs toxiques</b>	Sporadique à épizootique	Dépend du produit ingéré	- Phyto-oestrogènes : infertilité et prolapsus génitaux - Nitrates : anoxie foetale - Pin	- Anamnèse - Analyse du contenu ruminal.
<b>Facteurs iatrogènes</b>	Sporadique	- Oestrogènes : en début - PGF2 $\alpha$ : entre 4 et 150 jours - Corticoïdes : en fin.	Dépend du produit	- Anamnèse

## b) Etiologie des troubles nerveux chez le nouveau-né

Comme pour les avortements, les affections nerveuses peuvent être d'origine infectieuse (congénitale ou acquise) ou non-infectieuse (héréditaire ou traumatique) (Maillard *et al.*, 2003). Les tableaux 10, 11 et 12 résument les principales causes considérées.

Le recours à des examens de laboratoire est encore indispensable pour établir un diagnostic de certitude.

**Tableau 10** : Diagnostic différentiel des troubles nerveux d'origine infectieuse chez le veau nouveau-né.

Affection	Agent infectieux	Clinique	Diagnostic
<b>Méningites et méningo-encéphalite</b>	Le plus souvent bactériennes : colibacilles ( <i>E.coli</i> ), salmonelles, streptocoques, pasteurelles...	- Hyperthermie, hyperesthésie, rigidité cervicale, ataxie, cécité, parésie ou paralysie, amaurose, convulsions, opisthotonos, coma - Troubles digestifs, omphalite, polyarthrite ou lésions oculaires	- Analyses biochimiques : leucocytose, neutrophilie et lymphopénie - Cytologie et bactériologie sur LCR.
<b>Listériose</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>	- Hyperthermie, ataxie, marche en cercle, paralysie isolée, mortinatalité.	- Cytologie et bactériologie sur LCR - Anatomopathologie : microabcès au niveau de tronc cérébral
<b>Infections virales congénitales</b>	- BVD/MD (infection foetale) - Bunyavirus	- Hypoplasie cérébelleuse ou hydrocéphalie - Hydrocéphalie	- Virologie, sérologie ou histologie

**Tableau 11** : Diagnostic différentiel des troubles nerveux d'origine héréditaire liés à des anomalies métaboliques chez le veau nouveau-né.

Affection	Etiologie	Clinique	Diagnostic
<b>Gangliosidose</b>	Déficit de l'activité $\beta$ -galactosidase	Vacillement du train postérieur, rigidité des membres	Anatomopathologie : vacuolisation des neurones et démyélinisation
<b>Citrullinémie</b>	Déficit enzymatique et accumulation de citrulline dans le plasma (veaux de race Holstein et Frisonne)	Abattement, cécité, opisthotonos, convulsions, décubitus permanent	Anatomopathologie : oedème cérébro-cortical diffus, congestion, dégénérescence neuronale et oedème astroglial
<b>Mannosidose</b>	Déficit de l'activité $\alpha$ -mannosidase (Holstein, Angus et Simmental) ou $\beta$ -mannosidase (Salers)	Ataxie, tremblements, mortinatalité	Anatomopathologie : vacuolisation des neurones, des macrophages et des cellules réticuloendothéliales des noeuds lymphatiques et des cellules du pancréas exocrine

**Tableau 12** : Diagnostic différentiel des troubles nerveux congénitaux et héréditaires liés à des anomalies de développement chez le veau nouveau-né.

<b>Affection</b>	<b>Étiologie</b>	<b>Clinique</b>	<b>Diagnostic</b>
<b>Aplasia, hypoplasie, dégénérescence cérébelleuse</b>	Congénitale (infections prénatales par le virus du BVD/MD)	Ataxie, mouvements musculaires violents, tremblements, opisthotonos	Anatomopathologie : hypoplasie ou dégénérescence du cortex cérébelleux et perte de la couche des cellules de Purkinje
<b>Hydrocéphalie</b>	Congénitale et héréditaire	Mortinatalité, anomalies oculaires	Anatomopathologie : accumulation de liquide dans le système ventriculaire
<b>Atrophie du cortex cérébelleux</b>	Congénitale et génétique (veaux Holstein et Angus)	Ataxie et convulsions isolées ou répétées	Anatomopathologie : atrophie généralisée de toutes les couches du cortex cérébelleux
<b>Oedème cérébral congénital</b>	Congénitale et génétique (veaux Hereford)	Décubitus permanent, ataxie, hyperesthésie	Anatomopathologie : aspect vacuolaire spongieux du tissu cérébral
<b>Hydroanencéphalie</b>	Congénitale (infections prénatales)	Cécité, ataxie, mortinatalité	Anatomopathologie : absence complète ou presque d'hémisphères cérébraux
<b>Myélodysplasie</b>	Congénitale (anomalie de développement de la moelle épinière)	Parésie, ataxie des postérieurs, démarche en « saut de lapin »	Anatomopathologie : défaut de développement de la moelle épinière

### 3) De laboratoire

#### a) Méthodes directes

Les méthodes directes mettent en évidence le parasite ou des lésions spécifiques. L'histologie, l'immunohistochimie et l'amplification génique sont les méthodes les plus couramment utilisées.

#### α) Histologie

Les avortons sont souvent momifiés ou autolysés. Compte tenu de la répartition des lésions, les organes à prélever sont préférentiellement l'encéphale et le cœur et accessoirement le foie et les muscles (Losson et Bourdoiseau, 2000). Par contre, sur des veaux nés vivants mais malades, seul un examen de l'encéphale sera effectué. Aucune localisation préférentielle du parasite n'a été établie au sein de l'encéphale.

Les tissus sont fixés dans du formol à 10% puis inclus dans de la paraffine. Après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, les lésions sont recherchées à un grossissement de x 200.

L'examen permet de visualiser des lésions multifocales d'encéphalite ou de myocardite, non-suppurées, caractérisées par des foyers de nécrose entourées de cellules inflammatoires mononucléées.

Les kystes sont rarement observés dans le système nerveux de l'avorton mais faciles à visualiser compte tenu de leur taille importante.

Un diagnostic différentiel avec *Toxoplasma gondii* et *Sarcocystis spp* doit être réalisé (Dubey and Lindsay, 1996). Des méthodes d'examens plus poussées, comme l'immunohistochimie et l'amplification génique (PCR) permettent de différencier *Neospora caninum* des autres protozoaires (Jenkins *et al.*, 2002).

L'histologie constitue donc une méthode de référence, peu coûteuse et facile à mettre en oeuvre. Mais cet examen demande une certaine technicité. De plus, les tissus fœtaux fréquemment lysés sont un handicap. Les tachyzoïtes sont parfois observés dans l'encéphale, le cœur ou le placenta mais ils sont généralement difficiles à voir sur des coupes du fait de leur faible nombre (Lindsay and Dubey, 1989). Enfin, la sensibilité et la spécificité de cette méthode sont faibles (Otter *et al.*, 1997 ; Dubey, 1999b).

L'examen de coupes histologiques permet d'établir un diagnostic de suspicion, pourtant les lésions ne sont pas pathognomoniques et le recours à l'immunohistochimie est indispensable pour confirmer la présence de *Neospora caninum*.

## β) Immunohistochimie

Les tissus utilisés sont principalement l'encéphale, le coeur ou le foie, mais d'autres organes préparés pour l'histologie sont utilisables.

Les premiers anticorps polyclonaux ont été produits sur des lapins immunisés (Lindsay and Dubey, 1989). Cependant, ils réagissaient occasionnellement avec *Toxoplasma gondii* en raison de la présence d'un antigène commun de bradyzoïtes (BAG 5) (Dubey and Lindsay, 1996), ce qui altérerait la spécificité de manière relative car en pratique, aucun avortement à *Toxoplasma* ne semble avoir été identifié chez les bovins (Anderson *et al.*, 1991).

Par la suite, l'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis d'éviter ce problème. Obtenus à partir de souris, ils reconnaissent spécifiquement l'antigène Mab 6G7 des tachyzoïtes et bradyzoïtes de *Neospora caninum* chez différentes espèces (chiens, bovins, souris, rats, ovins et caprins) (Cole *et al.*, 1993).

Par ailleurs, l'étude d'anticorps polyclonaux réagissant contre les protéines de surface Nc-p43 et Nc-p36 de *Neospora caninum*, pourraient donner à terme des informations sur le statut de la maladie (aiguë ou chronique). En effet, les anticorps anti-Nc-p43 reconnaissent les tachyzoïtes et les bradyzoïtes alors que les anticorps anti-Nc-p36 ne réagissent qu'avec les formes tachyzoïtes (Hemphill, 1999).

L'immunohistochimie permet donc de mettre en évidence les formes tachyzoïtes principalement visibles dans l'encéphale, le foie ou le coeur ainsi que les kystes à bradyzoïtes plus rares et uniquement localisés au système nerveux. La distinction avec les autres protozoaires est donc possible. Par ailleurs, cette technique peut être utilisée si les avortons sont autolysés ou momifiés, ce qui est fréquent dans la néosporose, même si les résultats sont alors plus difficilement interprétables (Anderson *et al.*, 1994).

Mais l'immunohistochimie reste laborieuse en pratique et demande une certaine habitude de lecture. De plus, son succès dépend du nombre de sections réalisées et du temps passé à l'examen microscopique ce qui la rend peu sensible (Wouda, 2000).

## δ) Isolement sur culture cellulaire et inoculation

Cette technique ne fait pas partie des examens de laboratoire couramment utilisés dans le diagnostic de la néosporose, mais concerne la recherche fondamentale (Marquer et Chermette, 2000).

L'isolement de *Neospora caninum* est réalisé à partir du tissu nerveux des bovins. Cependant, son succès dépend directement du nombre de parasites présents dans l'organe ainsi que de son état de lyse. Or les organes des avortons sont souvent très abimés, la plupart des tachyzoïtes n'étant pas viables (Dubey and Lindsay, 1996). De plus, le temps de culture est souvent long (jusqu'à deux mois) à cause du faible nombre de parasites présents au départ.

L'inoculation est réalisée sur des souris immunodéprimées (ayant reçu des corticoïdes) par voie sous-cutanée, orale ou intra-péritonéale (Hemphill, 1999).

Les nombreuses contraintes de cette technique expliquent qu'elle ne soit pas utilisée en pratique.

### γ) Amplification génique

L'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode qui permet l'amplification des séquences d'ADN de *Neospora caninum* à partir d'amorces nucléotidiques. Elle met donc directement en évidence la présence du parasite à l'intérieur des organes prélevés. Pratiquement tous les tissus foetaux ainsi que le placenta peuvent être analysés. Les meilleurs prélèvements restent l'encéphale et le cœur frais, conservé au frais ou encore congelé. De plus, cette technique est possible sur des fœtus momifiés ou ayant subi un début de lyse (Marquer et Chermette, 2000 ; Journel et Pitel, 2001a).

Les gènes amplifiés sont nombreux. La séquence spécifique de l'ARNr de *Neospora caninum* (région 1 intertranscrite ITS1), qui se situe entre les gènes 5.8S et 16S, a l'avantage d'être présente en nombreux exemplaires. D'autres amorces nucléotidiques, telles que la séquence ITS1 présente entre les gènes 5.8S et 18S de l'ARNr, la petite sous-unité nucléaire de l'ARNr, l'hybridation d'un oligonucléotide spécifique de *Neospora caninum* (fragment du gène 14-3-3) et une séquence de l'ADN (Nc5) sont utilisées (Ellis, 1998).

Différentes techniques de PCR ont été développées : la PCR quantitative, la PCR semi-quantitative, la PCR nichée et la PCR associée à l'hybridation (Ellis, 1998).

La PCR semble être une méthode très sensible et très spécifique (Jenkins *et al.*, 2002). Cependant, si beaucoup de tests ont été mis à l'essai, peu d'entre eux sont réellement utilisés en pratique à cause des nombreux faux-positifs et faux-négatifs induits par ce type de technique. Les dernières recherches tendent à améliorer ces défauts (Ellis, 1998).

Les inconvénients de cette méthode sont liés au coût et aux difficultés d'interprétation. En effet, la présence du parasite dans les tissus ne traduit pas forcément son implication dans l'avortement, elle peut être le reflet d'une infection sans signe clinique (Jenkins *et al.*, 2002). Il est donc indispensable d'associer la PCR à d'autres techniques directes ou indirectes, un résultat de PCR ne permettant pas à lui seul d'imputer des avortements à *Neospora caninum*.

Les méthodes de détection directe de *Neospora caninum* sont indispensables mais aussi indissociables des méthodes indirectes pour un diagnostic de néosporose. Les principaux avantages et inconvénients des différentes techniques de diagnostic direct sont rapportés dans le tableau 13.

**Tableau 13** : Avantages et inconvénients des techniques de mise en évidence directe de *Neospora caninum* (Journel et Pitel, 2001a).

<b>Technique</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Prélèvements</b>	<b>Modalité de conditionnement</b>
<b>Histologie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Technique de référence</li> <li>- Coût modéré</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Très difficile si autolyse</li> <li>- Nécessité de plusieurs coupes</li> <li>- Visualisation du parasite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Encéphale</li> <li>- Coeur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formol</li> <li>- Liquide de Bouin</li> </ul>
<b>Immuno-histochimie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Distinction de <i>Neospora</i> des autres <i>Apicomplexa</i></li> <li>- Visualisation des lésions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Difficile si autolyse</li> <li>- Qualité de l'anticorps</li> <li>- Nécessité de plusieurs coupes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Encéphale</li> <li>- Coeur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formol</li> <li>- Liquide de Bouin</li> </ul>
<b>PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grandes sensibilité et spécificité</li> <li>- Compatible avec un début d'autolyse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de visualisation des lésions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Encéphale</li> <li>- Coeur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frais ou congelé sous couvert du froid</li> </ul>

## 2) Méthodes indirectes

Ces techniques permettent de détecter les anticorps spécifiques de *Neospora caninum* dans le sang (Jenkins *et al.*, 2002). Les techniques sérologiques attestent l'existence préalable d'un contact entre l'individu et le parasite et ne donnent aucune certitude sur l'imputation des symptômes à *Neospora caninum*.

Différents types de tests sérologiques ont été élaborés. L'immunofluorescence qui a été la première méthode approuvée, sert en général de référence pour valider les autres tests (Björkman and Uggla, 1999). Cependant, en l'absence de véritables techniques de références et/ou d'une véritable définition du statut d'infecté, il est difficile de comparer correctement les divers résultats obtenus. En effet, la sensibilité et la spécificité de chaque test sont obtenues à partir de seuils sélectionnés arbitrairement (Frössling *et al.*, 2003).

### α) Immunofluorescence indirecte (IFI)

L'IFI a été le premier test sérologique utilisé en 1988 pour détecter les anticorps de *Neospora caninum* chez le chien. Depuis, elle a été utilisée chez beaucoup d'autres espèces comme les bovins, les renards, les chats, les ovins, les caprins, les chevaux, les rongeurs ou encore les primates (Björkman and Uggla, 1999).

L'immunofluorescence indirecte consiste à mettre en contact des tachyzoïtes en culture cellulaire avec le sérum à évaluer puis à révéler la présence ou non d'anticorps spécifiques grâce au marquage à la fluorescéine d'anticorps antiglobuline d'espèce (Björkman and Uggla, 1999). Cette technique permet un dosage quantitatif des anticorps et est utilisable sur le sérum des bovins mais aussi sur les liquides péritonéaux ou pleuraux des fœtus.

Toutefois, les performances de ce test dépendent en partie de l'expérience du manipulateur, ce qui le rend subjectif. La visualisation de la fluorescence au microscope doit concerner toute la surface des tachyzoïtes. En effet, si elle n'est présente qu'au pôle apical du tachyzoïte, la réaction n'est pas spécifique, car cette zone contient des antigènes communs à différentes espèces d'Apicomplexa (Atkinson *et al.*, 2000).

Le seuil de positivité du test n'est pas standardisé ; il est propre à chaque laboratoire (chaque technique). Le seuil est souvent établi chez les chiens à 1 : 50 (Björkman and Uggla, 1999), chez les bovins à 1 : 80 pour les sérologies fœtales et entre 1 : 160 et 1 : 640 pour le sérum de bovin adulte (Hemphill, 1999). Un titre égal ou supérieur à 640 est habituellement considéré comme spécifique de *Neospora caninum* (Losson et Bourdoiseau, 2000).

L'IFI présente au final très peu de réactions croisées et possède l'avantage d'être rapide et peu coûteuse (Björkman and Uggla, 1999 ; Dubey and Lindsay, 1996).

### β) Agglutination directe

Le test d'agglutination directe est un outil diagnostique essentiel de la toxoplasmose humaine et animale. Son principe repose sur l'agglutination directe de tachyzoïtes intacts et prétraités au formol par les anticorps spécifiques de *Neospora caninum* présents dans le sérum. Un grand nombre de tachyzoïtes est nécessaire pour pouvoir visualiser l'agglutinat. Le test ne détecte que les IgG, les IgM étant détruits lors de la préparation. Aucune réaction croisée n'a été mise en évidence à ce jour (Björkman and Uggla, 1999).

Deux méthodes basées sur les principes de la séroagglutination directe utilisée pour le diagnostic de la toxoplasmose ont été testées en 1998. La première utilise des tachyzoïtes d'isolat canin (NC-1), alors que l'autre emploie des tachyzoïtes provenant d'isolat bovin (BPA-1). La sensibilité et la spécificité sont proches de celles de l'IFI dans plus de 16 espèces animales (Björkman and Ugglå, 1999).

Compte tenu de sa simplicité, de sa rapidité et de ses qualités intrinsèques, la technique d'agglutination directe représente un outil de diagnostic intéressant qui pourrait être utilisé dans beaucoup d'espèces. Le test a d'ailleurs été commercialisé récemment (Vétoquinol) (Björkman and Ugglå, 1999).

#### δ) Méthode enzymatique : l'ELISA

Le principe du test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) repose sur la mise en incubation d'antigènes de *Neospora caninum* avec le sérum à tester. Deux types de tests ELISA existent :

Le premier est un test « ELISA non compétition ». Il consiste à mélanger le sérum à tester avec un antigène de *Neospora caninum* et à rajouter un conjugué spécifique (enzyme) de l'anticorps puis un substrat, qui en présence du conjugué, donne une certaine couleur. Enfin, l'absorbance de la couleur est mesurée au spectrophotomètre.

L'« ELISA compétition » est un test indirect dans lequel un anticorps monoclonal (mAb) est ajouté afin d'entrer en compétition avec les anticorps présents dans le sérum à tester. Si des anticorps anti-*Neospora* sont présents dans le sérum, l'absorbance sera diminuée. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition induit par le sérum testé (Björkman and Ugglå, 1999).

Les premiers tests ELISA utilisaient un lysat cru de tachyzoïtes contenant un grand nombre d'antigènes intracellulaires ou cytoplasmiques. Or ces derniers ne sont pas très spécifiques, il a donc été proposé d'utiliser des antigènes de surface. Les antigènes candidats se sont succédés : des tachyzoïtes entiers fixés au formol, une fraction soluble de tachyzoïtes disloqués par des ultrasons de la souche NC-1 du parasite, des protéines extraites de tachyzoïtes et incorporées dans des « iscoms » (Björkman *et al.*, 1997), des protéines recombinantes (20, 29, 30 et 35 kDa) ou encore la capture d'un antigène spécifique (65 kDa) par un anticorps monoclonal (mAb) (Björkman and Ugglå, 1999).

Cette méthode est uniquement qualitative et donne un résultat objectif. Elle est rapide et automatisable ce qui facilite l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. C'est aussi la seule méthode utilisable sur le lait (voir tableau 14). En effet, les anticorps anti-*Neospora caninum* peuvent être détectés dans le lait avec une sensibilité et une spécificité comparables à celles obtenues sur sérum (90%) et avec une corrélation maximale entre les résultats sur sérum et sur lait en fin de lactation (Björkman *et al.*, 1997 ; Schares *et al.*, 2004).

Une technique ELISA, basée sur la mesure de l'affinité des anticorps IgG, a récemment été testée expérimentalement. Elle permet de différencier une infection chronique et aiguë. En effet, l'affinité des anticorps IgG augmente progressivement après la contamination puis reste très élevée lors d'infection chronique (Björkman *et al.*, 2003).

La comparaison d'un test « iscom » ELISA avec un test IFI à partir de l'analyse de sérums de 244 bovins issus de 5 troupeaux infectés par *Neospora caninum* montre que les deux tests sont très spécifiques (99%). Par contre, l'ELISA est plus sensible (96%) que l'IFI (76%). Cette étude remet par ailleurs en cause, l'utilisation de l'IFI comme test de référence (Frössling *et al.*, 2003).

La technique ELISA est facilement standardisable, rapide, peu coûteuse et utilisable sur un grand nombre de prélèvements. Sa spécificité et sa sensibilité sont excellentes. C'est pourquoi elle est la plus utilisée actuellement en routine. Le seul inconvénient étant le manque de standardisation des valeurs seuils entre les différentes trousse de diagnostic.

De nombreux tests sérologiques ont donc été commercialisés dans le cadre du diagnostic de la néosporose bovine. Chaque laboratoire a développé une trousse avec des critères d'interprétation propres, ce qui rend difficile la comparaison de résultats sérologiques. Le développement de méthodes standardisées est aujourd'hui à l'essai et devrait permettre d'améliorer l'interprétation des études séroépidémiologiques (Von Blumröder *et al.*, 2004).

Par ailleurs, tous les tests sérologiques sont capables de détecter des concentrations moyennes ou élevées d'anticorps dans le sang. Cependant leur performance diminue pour des concentrations plus faibles. Or la présence des anticorps est souvent fluctuante au cours de la vie d'une vache, les concentrations pouvant être faibles plusieurs mois après un avortement ou une gestation (Atkinson *et al.*, 2000). La plupart des animaux effectuent une séroconversion dans le mois qui suit l'inoculation, il est préférable d'effectuer deux prises de sang à un mois d'intervalle à partir de la date d'avortement (Losson et Bourdoiseau, 2000).

Le tableau 14 rassemble les principaux avantages et inconvénients des méthodes de détection indirectes de *Neospora caninum*.

**Tableau 14** : Avantages et inconvénients des techniques sérologiques utilisées pour le diagnostic de *Neospora caninum* (Marquer et Chermette, 2000).

<b>Technique</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>IFI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Méthode sérologique de référence</li> <li>- Relativement rapide et peu coûteuse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Existence de réactions croisées avec d'autres Apicomplexa dans certains tests</li> <li>- Lecture non standardisée de la fluorescence</li> <li>- Choix du seuil non standardisé</li> <li>- Intérêt surtout à l'échelle du troupeau</li> <li>- Nécessite l'entretien de cultures cellulaires infectées</li> </ul>
<b>Agglutination directe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Test très sensible et spécifique</li> <li>- Utilisable sur différentes espèces animales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Intérêt surtout à l'échelle du troupeau</li> </ul>
<b>ELISA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisable sur le lait</li> <li>- Automatisation réalisable sur un grand nombre d'échantillons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Choix des seuils non standardisés entre les différents kits</li> <li>- Intérêt surtout à l'échelle du troupeau</li> </ul>

### c) Démarche diagnostique

Lors d'avortements dans un élevage, seules les analyses de laboratoire permettent d'établir un diagnostic définitif.

L'avorton devra être envoyé entier au laboratoire accompagné de ses enveloppes. Lors de poids trop élevé, les organes essentiels pourront alors être expédiés seuls (Tainturier *et al.*, 1997b). La démarche diagnostique doit être menée de manière rigoureuse. Ainsi convient-il dans un premier temps d'effectuer une analyse histologique du placenta et de l'encéphale du fœtus. En présence de lésions évocatrices, l'infection par *Neospora caninum* pourra être spécifiquement confirmée par immunohistochimie ou par PCR.

Des analyses sérologiques maternelles ou foetales devront être réalisées en parallèle afin de conforter les résultats obtenus. Lors d'avortement, la sérologie est un élément de renforcement de la suspicion, mais ne devrait pas remplacer la mise en évidence directe du parasite (Journel et Pitel, 2001a).

Le fœtus commence à synthétiser des anticorps à partir du quatrième/cinquième mois de gestation. Le sérum et les fluides des cavités pleurale, péritonéale et péricardique peuvent être analysés afin de détecter la présence d'anticorps (Wouda, 2000). Il ne faut pas oublier que la détection d'anticorps chez le veau signifie qu'une infection congénitale a eu lieu mais ne veut pas dire que la néosporose est à l'origine de l'avortement. En effet, de nombreux veaux naissent séropositifs mais en bonne santé (Paré *et al.*, 1996).

La présence d'anticorps chez des veaux qui ont ingéré le colostrum doit être interprétée avec précaution et doit être corrélée au statut de la mère. Les concentrations des anticorps colostraux diminuent entre trois et six mois alors que les veaux infectés pendant la gestation resteront positifs pendant une longue période (Wouda, 2000).

La mère devra être prélevée deux fois à un mois d'intervalle à partir de l'avortement (Journel et Pitel, 2001a) ou une fois quinze jours après l'avortement (Wouda, 2000). Il existe une bonne corrélation entre l'histologie foetale et la sérologie de la mère. Cependant les anticorps peuvent décroître rapidement après l'avortement (moins de deux mois) rendant leur détection impossible, ou rester à un taux élevé pendant une longue période (Wouda, 2000).

Toutefois, il est plus difficile d'imputer des avortements à *Neospora caninum* en l'absence de fœtus. Le diagnostic de néosporose basé sur une seule sérologie maternelle n'est pas suffisant.

Les diagnostics réalisés à partir de prélèvements foetaux et maternels restent des diagnostics individuels. Il est intéressant de réaliser un diagnostic de troupeau suite à plusieurs avortements ou suite à une suspicion de néosporose. Dans ce cas-là, un sondage sérologique doit être réalisé sur des bovins qui ont avorté, leur ascendance, descendance et collatéraux mais aussi quelques animaux qui n'ont pas avorté. Tester tout le troupeau permet de déterminer la prévalence, le mode de transmission et éventuellement de dater le début de la maladie au sein de l'élevage. Par ailleurs, une sérologie sur les chiens de l'exploitation peut apporter un élément intéressant au diagnostic (Journel et Pitel, 2001a).

## II- Épidémiologie et importance de la néosporose bovine ; moyens de lutte actuels.

### A- Caractères épidémiologiques

#### 1) Epidémiologie descriptive

##### a) Prévalence

Depuis sa découverte en 1987 dans un troupeau laitier du Nouveau-Mexique, la néosporose a été diagnostiquée dans de nombreux pays et régions d'élevages : en Californie (Anderson *et al.*, 1991) et dans les divers états des États-Unis, en Nouvelle Zélande, en Argentine, au Canada (Paré *et al.*, 1998), en Australie (Atkinson *et al.*, 2000), en Afrique du Sud ou encore au Japon. Beaucoup de pays d'Europe comme la Belgique, l'Espagne, les Pays-bas, l'Italie, l'Irlande du Nord, le Danemark ou encore la Grande-Bretagne sont aussi concernés (Hemphill and Gottstein, 2000).

La néosporose apparaît être une cause majeure d'avortements notamment en Amérique du Nord (Anderson *et al.*, 2000). Le tableau 15 regroupe les prévalences établies dans plusieurs pays chez des bovins ayant avorté.

Par ailleurs, des résultats positifs ont été mis en évidence chez des bovins sans aucun problème d'avortement. Ainsi aux Pays-bas, 13% des bovins provenant d'une centaine d'élevages ont été testés positifs (Wouda, 2000). D'autres études ont montré que la prévalence était plus élevée dans les élevages laitiers que dans les élevages allaitants (Dubey and Lindsay, 1996).

Des études récentes font état d'une séroprévalence à l'échelle des troupeaux de 73% (16 élevages ayant au moins une vache infectée sur 22 élevages étudiés) au Canada (Paré *et al.*, 1998), et de 78% (78 élevages ayant au moins une vache infectée sur 100 élevages étudiés) aux Pays-Bas (Wouda, 2000).

**Tableau 15** : Prévalence de *Neospora caninum* chez des bovins ayant avorté dans différents pays du monde.

Pays	Année	Séroprévalence individuelle	Méthode diagnostique	Références Bibliographiques
Californie	1991	20 à 40%	Immunohistochimie	Anderson <i>et al.</i> , 1991
Nouvelle-Zélande	1991	28%	Immunohistochimie + histologie	Uggla <i>et al.</i> , 1998
Écosse	1994	9%	Sérologie (IFI)	Trees <i>et al.</i> , 1994
Pays -Bas	1997	17 %	Sérologie (IFI)	Wouda <i>et al.</i> , 1997
Canada	1998	17%	Sérologie (ELISA)	Paré <i>et al.</i> , 1998
Espagne	1999	30 à 36%	Sérologie (ELISA)	Mainar-James <i>et al.</i> , 1999
Angleterre	1999	17% (de 7 à 45%)	Sérologie (ELISA)	Davison <i>et al.</i> , 1999

En France, le tableau 16 fait état des séroprévalences chez des bovins ayant avorté, dans différents départements.

Les prévalences sont plus élevées dans le département de l'Orne ce qui peut-être corrélé à l'implantation d'élevages laitiers dans ce département alors qu'en Saône et Loire, les élevages allaitants sont dix fois plus nombreux (Klein *et al.*, 1997). De même, dans le département du Calvados, l'infection semble toucher préférentiellement les élevages laitiers (Pitel *et al.*, 2000).

L'ensemble des résultats obtenus entre 1996 et 2004 est assez homogène entre les différentes régions : la séroprévalence des bovins ayant avorté se situe entre 13 et 25%. Ces données sont inférieures à celles de la Californie, mais se rapprochent des données publiées au Canada, aux Pays-Bas ou en Angleterre.

**Tableau 16** : Prévalence de *Neospora caninum* parmi les bovins ayant avorté en France.

Région	Année	Nombre de sérums	Méthode diagnostique	Séroprévalence Individuelle	Références Bibliographiques
Orne	1996	575	ELISA	25,7%	Klein <i>et al.</i> , 1997
Saône et Loire	1996	219	ELISA	13,7%	Klein <i>et al.</i> , 1997
Calvados	1999	895	ELISA	26,5%	Pitel <i>et al.</i> , 2000
Sud-Ouest	2000	300	Agglutination directe	20 à 26%	Cotasson, 2000
Rhône	2002	444	ELISA	15,3%	Foulon, 2002
Hautes-Alpes	2003	333	Agglutination directe puis ELISA	> 25%	Peyron, 2003
Jura	1998-2003	2571	ELISA et Agglutination directe	14,8%	Bouveret, 2004

## b) Espèces sensibles

De nombreuses espèces animales se sont montrées sensibles à *Neospora caninum* mais de manière différente. Ainsi, faut-il distinguer les espèces infectées naturellement et celles infectées à la suite d'inoculation expérimentale (voir tableau 2).

Concernant les premières, beaucoup sont connues en tant qu'hôtes intermédiaires : les bovins, les caprins, les ovins, les équidés, les cervidés et les canidés (Losson et Bourdoiseau, 2000). Quant au renard, au coyote, au buffle, ou au chameau, seuls des anticorps anti-*Neospora* ont pu être mis en évidence sans jamais avoir observé de signes cliniques.

De nombreuses espèces ont pu être infectées expérimentalement en tant qu'hôtes intermédiaires, il s'agit des bovins, des ovins, des caprins, des chiens, des chats, des renards, des coyotes, des souris, des rats, des gerbilles, des lapins, des porcs, des singes ou des pigeons. Leur réponse clinique et sérologique est différente en fonction de la souche utilisée et de la voie d'inoculation (Losson et Bourdoiseau, 2000). La plupart des rongeurs sont relativement résistants à la néosporose et ne peuvent être infectés qu'à la faveur d'une diminution de l'immunité (utilisation de corticoïdes) (Dubey, 1999b).

## 2) Mode de transmission

La contamination des bovins résulte d'une transmission verticale, qui a été la première mise en évidence comme voie majeure de transmission de *Neospora caninum* au sein d'un troupeau, ou d'une transmission horizontale, post-natale.

### a) Transmission verticale

La voie transplacentaire est apparue d'emblée comme le mode majeur de contamination chez les bovins. L'étude de la répartition des vaches séropositives dans les différentes générations (Björkman *et al.*, 1996) ainsi que la forte corrélation qui existe entre la séropositivité d'une vache et de sa descendance (93% des produits issus de vaches positives sont aussi positifs (Schaes *et al.*, 1998)) ont confirmé l'importance de la contamination par voie verticale. Il est admis que les animaux restent infectés à vie (Hemphill and Gottstein, 2000).

La transmission verticale, a été décrite dans les conditions naturelles chez la chienne et la vache, puis chez la chèvre, la jument, la brebis, et a été induite expérimentalement chez les bovins, le mouton, la chèvre, la souris, le chien, le chat, le singe et le porc (Dubey, 1999b).

Cette voie de transmission est particulièrement efficace si l'on se base sur la présence d'anticorps spécifiques précolostraux chez les veaux nés de mères séropositives. Ainsi les taux de transmission de la mère au fœtus varient de 81 à 95% en fonction des études (Paré *et al.*, 1996 ; Schaes *et al.*, 1998). Dans la plupart des cas, les veaux issus de mères infectées naissent en bonne santé, ce qui est corrélé à un fort titre d'anticorps chez la mère dans le dernier tiers de gestation (Paré *et al.*, 1996).

Cependant la transmission transplacentaire n'a pas lieu dans tous les cas et les facteurs impliqués dans son déterminisme restent flous. La période de gestation où a lieu la parasitémie, son intensité et sa durée, l'efficacité de la réponse immunitaire maternelle et la capacité du fœtus à développer une réponse immunitaire semblent influencer l'infection verticale (Hemphill and Gottstein, 2000).

Le mode de contamination verticale grâce à son efficacité permet le maintien de *Neospora caninum* au sein d'un troupeau pendant des générations (Anderson *et al.*, 1997). Les élevages dans lesquels la voie de transmission verticale est prépondérante semblent caractérisés par une séroprévalence faible au sein du troupeau associée à un nombre d'avortements peu élevé (Schaes *et al.*, 1998). Le déterminisme du passage transplacentaire reste à élucider.

## b) Transmission horizontale

La confirmation de ce mode de transmission a été établie à partir de la découverte du chien comme hôte définitif dans le cycle de *Neospora caninum*. La transmission verticale ne pouvait pas, à elle seule, assurer la pérennité de la circulation parasitaire ou provoquer des épidémies d'avortements (Anderson *et al.*, 2000). En effet, dans certains cas, une source ponctuelle semble à l'origine des épisodes abortifs et les différences de séroprévalence entre les différents groupes d'âge dans des troupeaux, suggèrent l'existence d'une source d'infection post-natale (Losson et Bourdoiseau, 2000).

### α) Contamination de l'hôte définitif

Jusqu'à présent, seuls les enveloppes foetales, le liquide utérin et le fœtus sont considérés comme matériels à risque potentiel dans la contamination du chien (Dubey and Lindsay, 1996). Toutefois, des études menées sur des chiens vivant dans des fermes contaminées ont montré que les avortons ne semblaient pas être consommés (Dijkstra *et al.*, 2002a).

Par ailleurs, si l'on se réfère au cycle du parasite actuellement établi, on suppose que les matières virulentes par lesquelles le chien se contaminerait, contiennent des formes tachyzoïtes. Or, la mise en évidence d'excrétion d'oocystes après inoculation expérimentale de chiens s'est faite avec des cerveaux de souris contenant des kystes à bradyzoïtes (Lindsay *et al.*, 1999a).

Ces dernières recherches supposent aussi que les multiples hôtes intermédiaires du parasite, hébergeant des kystes à bradyzoïtes, peuvent jouer le rôle de proie pour le chien. Des observations menées sur une population vulpine ont mis en évidence des séroprévalences élevées chez des renards nourris avec des carcasses de bovins (Kramer *et al.*, 2004).

### β) Contamination des hôtes intermédiaires

La contamination des hôtes intermédiaires se fait par l'ingestion d'oocystes sporulés, à partir du milieu extérieur, comme démontré expérimentalement chez le veau (De Marez *et al.*, 1999). La principale source de parasites identifiée aujourd'hui est le chien, qui excrète des oocystes dans ses fèces (Lindsay *et al.*, 1999a), ainsi que le coyote en Amérique du Nord (Gondim *et al.*, 2004).

La sporulation, indispensable à l'acquisition des propriétés infectantes, nécessite 24 heures dans de bonnes conditions. Aucune donnée n'est établie sur la résistance des oocystes émis dans le milieu extérieur. Ils seraient émis pendant cinq à huit jours après l'infection de chiens par ingestion de kystes tissulaires, la durée d'excrétion pouvant atteindre une dizaine de jours (Lindsay *et al.*, 1999b ; MacAllister *et al.*, 1998). Toutefois, beaucoup de lacunes persistent sur la durée de la phase prépatente, la quantité d'oocystes émis ou sur la capacité du chien à réexcréter des oocystes par la suite sans recontamination (Chermette et Marquer, 2000).

Les vaches étant des herbivores stricts, on suppose que les chiens défèquent dans les aires d'alimentation ou sur les stocks d'aliment, disséminant des oocystes. Les bovins s'infectent ensuite par les aliments ou l'eau. Une étude a montré que les chiens vivants dans un élevage infecté ont davantage tendance à déféquer dans les couloirs d'alimentation ou les stocks d'ensilage (Dijkstra *et al.*, 2002a).

Par ailleurs, la présence de chiens séropositifs sur l'exploitation est un facteur de risque. Elle est associée à une forte prévalence de *Neospora caninum* dans le troupeau et le nombre de chiens vivant sur l'élevage est fortement corrélé à la survenue d'une épidémie d'avortements (Paré *et al.*, 1998). La transmission horizontale a lieu à l'occasion de l'introduction d'un nouveau chien importé dans l'élevage, qu'il soit jeune ou adulte ou provenant d'une portée née sur l'exploitation (Dijkstra *et al.*, 2002b). La séroprévalence canine est nettement plus importante chez des chiens vivant dans des fermes que chez des chiens citadins (Losson et Bourdoiseau, 2000) et chez des chiens âgés de plus de trois ans (Kramer *et al.*, 2004).

De plus, il existe une relation linéaire entre le nombre de volailles présentes dans un élevage bovin laitier et le risque d'apparition d'avortements à *Neospora* chez les vaches (Bartels *et al.*, 1999). Les oiseaux pourraient intervenir en tant qu'hôtes intermédiaires ou vecteurs mécaniques des oocystes, ces derniers étant souvent en liberté dans les élevages (Bartels *et al.*, 1999). Ainsi, des pigeons domestiques, infectés expérimentalement suite à l'inoculation de tachyzoïtes de *Neospora caninum*, ont tous présenté des résultats en culture, PCR, sérologie et histologie positifs (McGuire *et al.*, 1999).

La transmission directe du parasite de vache infectée à vache saine dans des conditions naturelles n'a pas été mise en évidence.

Des études expérimentales ont permis d'évaluer l'importance de la transmission du parasite par le lait. Ainsi, des veaux de moins de douze heures ont été nourris avec du colostrum puis du lait provenant de leur mère mais enrichi artificiellement avec une dose  $10^7$  tachyzoïtes. Un second lot de veaux âgé de un à trois jours a reçu du lait ou du colostrum provenant de mères infectées naturellement, c'est à dire séropositives avant leur gestation. Dans le premier cas, une séroconversion vis-à-vis de *Neospora caninum* a été observée en l'absence de signe clinique sur tous les veaux mais dans le deuxième cas, aucun veau n'a été infecté (Davison *et al.*, 2001). La contamination par le lait est donc possible mais ne semble pas être une voie importante de transmission.

Par ailleurs, des veaux âgés de moins de douze heures ainsi que des vaches adultes, ont reçu respectivement du colostrum et de l'ensilage contaminés par du placenta (mixé et mélangé) provenant d'une vache séropositive. Aucun des bovins n'a présenté d'infection (Davison *et al.*, 2001).

La transmission par voie sexuelle, de taureaux infectés à vaches saines, reste mal connue. *Neospora caninum* a été mis en évidence par PCR dans la semence fraîche de 5 taureaux séropositifs en IFI, prélevés une fois par semaine pendant 10 semaines consécutives. Le nombre de parasites observé dans les 8 échantillons de semence testés positifs (sur 46) variait de 1 à 2,8 parasite/ml. Par ailleurs, sur 50 échantillons de semence congelée provenant des mêmes taureaux, le parasite n'a été retrouvé que 3 fois. *Neospora caninum* a été détecté dans la fraction cellulaire des semences fraîches et congelées (Ortega-Mora *et al.*, 2003).

L'analyse de 180 échantillons de semence congelée prélevés sur 20 taureaux séropositifs en IFI, pendant une période de deux ans, a montré que la détection du parasite par PCR est rare (14 échantillons positifs sur 180) et la concentration semble faible (Caetano-Da-Silva *et al.*, 2004).

Les taureaux infectés semblent excréter peu de parasite. On peut supposer que ces excréments correspondent à des périodes de réactivation du parasite dont le déterminisme reste inconnu. Par ailleurs, même si des parasites peuvent être transmis à la vache par voie vénérienne, leur devenir au sein des bovins femelles demeure totalement inconnu. Enfin, la survie du parasite face à la congélation n'est pas connue.

La transmission de la néosporose entre bovins est aujourd'hui possible expérimentalement, mais non démontrée dans des conditions naturelles.

La transmission par voie horizontale est caractérisée par un grand nombre d'avortements au sein du troupeau, des séroprévalences plus élevées et limitées souvent à certaines classes d'âge avec des statuts sérologiques parfois différents entre les mères et les filles.

Ce mode de transmission ne semble pas être la voie principale d'infection de *Neospora caninum* et beaucoup de questions persistent quant à l'identification précise des hôtes intermédiaires et définitifs ainsi qu'à leurs modalités de contamination (oocystes, tachyzoïtes ou kystes à bradyzoïtes).

### 3) Facteurs de réceptivité et de sensibilité

L'ensilage de maïs moisi et les restes de fourrages sont en périodes d'été, un milieu propice au développement de champignons et à la mycotoxigenèse. Certaines mycotoxines peuvent provoquer une immunodépression et favoriser l'infection ou la réactivation de *Neospora caninum* (Bartels *et al.*, 1999).

De même, toute immunodépression est susceptible de favoriser une infection. C'est le cas des traitements à base de corticoïdes ou des situations de stress comme les vaccinations, l'élévation de la température extérieure et les déséquilibres alimentaires de fin d'année de pâture. Ces aspects suggérés par les éleveurs, n'ont pas été retrouvés lors d'enquêtes épidémiologiques (Bartels *et al.*, 1999).

L'utilisation de pâturages communs est un facteur de risque, notamment chez les jeunes bovins (Bartels *et al.*, 1999).

L'implication d'infections intercurrentes comme le BVD (Bovine Viral Diarrhea), est controversée. En effet, une corrélation positive a été mise en évidence entre la séroprévalence de *Neospora caninum* et du virus BVD (Thurmond and Hielata, 1995), mais Bartels et ses collaborateurs ont décrit l'absence de relation entre ces deux agents responsables d'avortements (Bartels *et al.*, 1999). Or la présence du virus du BVD peut induire une immunodépression importante, ses principales cellules cibles étant les macrophages et les lymphocytes (De Melo *et al.*, 2004).

De plus, Bartels et ses collaborateurs n'ont trouvé aucune autre relation entre les avortements à *Neospora caninum* et les infections au Bovin Herpes Virus 1 (BHV1), à *L.hardjo* et *Salmonella* Dublin (Bartels *et al.*, 1999).

L'influence de la saison sur les vagues d'avortements a été observée aux Pays-Bas ainsi qu'en Californie. Les avortements interviendraient plutôt en hiver en Californie et en été aux Pays-Bas. En effet, les hivers de Californie sont tempérés et humides ce qui peut se rapprocher des conditions extérieures des Pays-Bas en été (Hemphill and Gottstein, 2000). Ces observations peuvent s'expliquer par les conditions de survie des oocystes dans le milieu extérieur et/ou des facteurs de stress à l'origine d'une immunodépression.

De même il existe des différences régionales à l'intérieur d'un même pays comme en Espagne ou en Italie, ce qui peut être attribué à la différence de climat (Hemphill and Gottstein, 2000).

Le risque d'avorter pour une vache séropositive est deux à trois fois plus élevé que chez une vache séronégative (Davison *et al.*, 1999). Par ailleurs, une génisse infectée par l'intermédiaire de sa mère lors de son développement intra-utérin, aura 7,4 fois plus de risque d'avorter lors de sa première gestation qu'une vache séronégative (Thurmond and Hietala, 1997a). Ce risque semble cependant diminuer avec le nombre de vêlages, mais les résultats ont pu être influencés par l'abattage sélectif (Anderson *et al.*, 2000).

La race ne semble pas intervenir en tant que facteur de risque. Les différences observées entre les élevages laitiers et les élevages allaitants pourraient être liés davantage aux pratiques d'élevages qu'à une différence de réceptivité (Losson et Bourdoiseau, 2000).

Aucune prédisposition génétique ne semble influencer l'infection par *Neospora caninum* (Pan *et al.*, 2004).

Enfin, l'âge des vaches n'est pas un facteur de risque, mais peut nous renseigner sur le mode de contamination de l'élevage. Lors de transmission verticale, aucune différence de

séropositivité n'est observée entre les différentes classes d'âge. Lors de contamination horizontale, plusieurs vaches sont atteintes en même temps, la séroprévalence est souvent plus élevée pour les animaux d'une même cohorte et différente entre cohortes (Davison *et al.*, 1999 ; Paré *et al.*, 1996).

## B- Importance de la néosporose bovine

### 1) Répartition géographique

#### a) Mondiale

La maladie est décrite dans de nombreux pays des six continents : aux États-Unis, au Canada (Lindsay and Dubey, 1989), au Mexique, en Australie (Atsinkon *et al.*, 2000), en Nouvelle Zélande, en Afrique du Sud, en Argentine, au Japon, au Brésil, au Costa-Rica (Bergeron *et al.*, 2000), en Corée, en Israël, en Thaïlande, en Afrique du Sud et au Zimbabwe.

Beaucoup de pays d'Europe sont également touchés : la Grande-Bretagne les Pays-Bas, l'Italie, l'Espagne, le Danemark, l'Allemagne, l'Irlande du Nord ou encore la Belgique et la France (Hemphill and Gottstein, 2000).

Longtemps méconnue et sous-estimée, la néosporose s'est révélée être une cause majeure d'avortements dans le monde entier.

#### b) En France

La néosporose est probablement présente dans toutes les régions de France, mais les études la concernant sont récentes et seuls les départements de l'Orne, de la Saône et Loire (Klein *et al.*, 1997), du Calvados (Pitel *et al.*, 2000), du Morbihan (Joly, 2000) ainsi que dans certains départements du Sud-Ouest (Cotasson, 2000), dans le Rhône (Foulon, 2002), les Hautes-Alpes (Peyron, 2003) et le Jura (Bouveret, 2004) ont été explorés.

## 2) Impact économique

### a) Types de pertes

Les pertes engendrées par *Neospora caninum* sont multiples et l'impact économique dépendra des coûts « directs » liés aux avortements et des coûts « indirects », conséquences des avortements (Dubey, 1999c).

La valeur des avortons représente une perte considérable compte tenu de la fréquence élevée des avortements. En effet, la fraction des avortements attribuée à *Neospora caninum* (Anderson *et al.*, 1991) varie de 20 à 43% pour la Californie, 15 à 20% pour les Pays-Bas (Dubey, 1999b).

Par ailleurs, une femelle séropositive aurait deux à trois fois plus de risque d'avorter qu'une femelle séronégative et une génisse née infectée aurait jusqu'à sept fois plus de risques d'avorter lors de sa première gestation qu'une génisse saine (Thurmond and Hietala, 1997a).

Enfin, la mise à la reproduction des vaches ayant avorté représente un certain coût lié aux traitements médicaux associés (Chi *et al.*, 2002).

La mortalité embryonnaire précoce provoque des retours en chaleur répétés, de l'infertilité ainsi que l'augmentation des intervalles entre vêlages (Trees *et al.*, 1999). Cependant il est difficile de savoir si à ce stade, les pertes sont dues à la néosporose ou à une autre cause.

La naissance de veaux infectés ou malades peut induire des pertes, mais en général leur nombre est faible et l'effet d'une infection à *Neospora caninum* sur la durée de vie d'une vache n'est pas connu (Trees *et al.*, 1999).

L'impact de la néosporose sur la production de lait est complexe. Une étude réalisée en Californie a montré que le rendement était diminué de plus de 4% ce qui correspond à 2,5 litres de lait en moins par jour et par vache infectée, au moins au cours de la première lactation (Thurmond and Hietala, 1997b). Cependant, il semble que l'influence d'une infection à *Neospora caninum* sur la production de lait dépende de la présence d'avortements dans l'élevage. Ainsi, dans l'Ontario les vaches séropositives produisaient moins de lait que les vaches séronégatives uniquement dans les élevages où des avortements, quelle qu'en soit la cause, avaient été rapportés (Hobson *et al.*, 2002).

L'augmentation du nombre de réformes précoces semble dépendre de deux facteurs principaux : la diminution de la production de lait et les avortements. Ainsi une vache séropositive a deux fois plus de risque d'être réformée qu'une vache séronégative (Thurmond and Hietala, 1996). En Californie, les vaches séropositives sont réformées en moyenne 6,3 mois plus tôt que les vaches séronégatives (Dubey, 1999c). Cependant, aucune augmentation du taux de réforme n'était observée sur la seule base du statut sérologique (Cramer *et al.*, 2002). On peut en déduire que le choix des animaux à réformer dans un élevage sans avortement ne dépendait pas du statut sérologique des vaches (Cramer *et al.*, 2002).

Enfin, la valeur marchande des veaux séropositifs est réduite en raison d'une diminution du gain corporel et du poids de carcasse en postsevrage, et des coûts de traitements (Barling *et al.*, 2000). Par ailleurs, les vaches séropositives ne vont plus être acceptées dans certains pays (Hollande) pour l'élevage ce qui réduit leur valeur financière.

## b) Évaluation des pertes

Il est difficile en pratique d'évaluer les pertes causées par *Neospora caninum* dans un élevage. En effet, le manque de données scientifiques sur les répercussions exactes de la maladie et le peu d'études réalisées ne permettent qu'une estimation des chiffres.

L'impact économique sera évalué à partir des coûts directs causés par la perte des fœtus ou des veaux et à partir des coûts indirects engendrés par les soins médicaux, l'aide professionnelle, l'augmentation du nombre d'inséminations, la réduction de la production de lait, l'augmentation de la durée des lactations, le remplacement et la diminution de la valeur de l'animal en cas de réforme (Thurmond and Hietala, 1996, 1997a, b).

L'estimation des pertes a été réalisée dans différents pays ; avec pour la production laitière, des montants annuels de 16 millions de dollars néo-zélandais en Nouvelle-Zélande, 35 millions de dollars en Californie et 85 millions de dollars en Australie (Dubey, 1999b). Ainsi chaque avortement coûterait entre 600 et 1000 dollars pour chaque éleveur Californien (Dubey, 1999c). La production allaitante est aussi touchée, avec des déficits annuels de 25 millions de dollars pour l'Australie (Dubey, 1999b). Cependant, l'estimation des pertes est encore plus difficile dans ce type de production.

Les bénéfices économiques que pourraient rapporter trois stratégies différentes de contrôle de la néosporose ont été évalués dans des troupeaux allaitants. Les deux premières stratégies consistant à réformer les femelles qui avortaient et à vendre les femelles séropositives les remplaçant par des vaches non-infectées, n'ont apporté aucun bénéfice économique. En revanche, la stratégie qui consiste à tester le troupeau entier afin d'exclure les filles nées de mères séropositives paraît être un bon choix économique (Larson *et al.*, 2004).

Dans d'autres études, la réforme des vaches sur leur seul statut sérologique n'a montré aucun intérêt. Mais si des vagues d'avortements causés par *Neospora caninum* sont présentes sur l'élevage, la réforme des vaches positives ayant avorté devient bénéfique (Hobson *et al.*, 2002 ; Cramer *et al.*, 2002).

## C- Moyens de lutte

### 1) Prophylaxie

#### a) Médicale

Aucun vaccin efficace contre *Neospora caninum* n'est commercialisé à ce jour. L'immunoprophylaxie pourrait avoir un intérêt si l'immunité ainsi développée protège le fœtus contre les avortements au cours des gestations. Si dans les conditions naturelles, cet objectif semble au moins partiellement atteint, la réponse immunitaire semble sans effet ou avec peu d'effet vis-à-vis de l'infection transplacentaire (Wouda, 2000).

Compte tenu de l'importance de la transmission verticale et des modalités de la réaction immunitaire au cours de la gestation, un bon vaccin devrait d'abord probablement stimuler une réponse immunitaire à prédominance cellulaire, mais en coexistence avec une réponse humorale (Innes *et al.*, 2002).

Quel vaccin choisir : atténué ou tué ? Le premier a l'avantage d'induire une réponse immunitaire appropriée chez l'animal. Le développement de souches atténuées pourrait être utilisé contre la néosporose de la même façon que le Toxovax (ND) utilisé contre la toxoplasmose. Mais les vaccins vivants ont aussi beaucoup d'inconvénients, liés aux conditions de stockage et au risque de réactivation de la virulence du parasite d'une inocuité partielle (Innes *et al.*, 2002).

Les vaccins tués sont généralement plus sûrs mais stimulent moins bien le système immunitaire. Les antigènes nécessaires à une réponse immunitaire efficace sont produits par les tachyzoïtes vivants (Innes *et al.*, 2002). Ces antigènes sont capables de stimuler la production d'INF $\gamma$  par les lymphocytes T CD4+ et sont constitués des antigènes de surface du parasite et des protéines de trois organelles sécrétoires : les micronèmes, les rhoptries et les granules denses. Le vaccin optimal devrait contenir une combinaison de ces antigènes (Innes *et al.*, 2002).

Le développement de vaccins recombinants utilisant un virus comme vecteur ou l'injection directe d'ADN de l'antigène ciblé induisent une réponse humorale et cellulaire de type Th1 avec la production de lymphocytes T-CD8. De plus, ces deux types de vaccins permettent la coinsertion de gènes de cytokines comme l'IL-12 qui est bénéfique à l'induction d'une réponse immunitaire de type Th1 (Innes *et al.*, 2002).

Plusieurs essais ont d'abord été réalisés sur des souris par l'inoculation de parasites vivants, atténués ou bien avec des protéines de *Neospora caninum* :

- sur les souris inoculées avec des tachyzoïtes vivants après neutralisation des cytokines IL-4 maternelles, l'infection congénitale de leur descendance diminue.

- les souris inoculées en sous-cutanée par une injection unique d'un lysat cru de tachyzoïtes associé à un adjuvant ont été protégées efficacement contre la transmission verticale de *Neospora caninum*.

- les souris inoculées avec deux injections intrapéritonéales contenant un vaccin recombinant à base d'une protéine de surface majeure de *Neospora caninum* (NcSRS2) ont été protégées efficacement.

De nombreux essais sur les bovins ont été réalisés avec des vaccins inactivés et vivants, mais aucun ne semble à ce jour assez efficace pour lutter contre la néosporose (Innes *et al.*, 2002).

Une meilleure compréhension de la relation entre le parasite et son hôte ainsi que la détermination de nouvelles particules pouvant véhiculer les protéines recombinantes (bactéries, autres virus, liposomes, complexes stimulants et immunisation génétique) ou d'autres antigènes essentiels de *Neospora caninum*, devraient permettre l'élaboration d'un vaccin efficace contre la néosporose (Nishikawa *et al.*, 2002).

## b) Sanitaire

### α) Offensive

La prophylaxie sanitaire offensive consiste à empêcher la transmission verticale et horizontale du parasite au sein d'un élevage.

Concernant la transmission verticale, certains préconisent l'élimination de tous les animaux séropositifs présents sur l'exploitation. Toutefois, en pratique, cette stratégie ne peut être appliquée que dans des élevages où la prévalence est faible. Dans les troupeaux où la prévalence est moyenne voire élevée, la réforme précoce avant la période de reproduction, des animaux issus de mères séropositives, semble plus raisonnable économiquement (Journel et Pitel, 2001b ; Wouda, 2000) ; cette mesure est d'autant plus intéressante que les génisses infectées ont des risques accrus d'avorter ou de transmettre le parasite à leur descendance durant leur première gestation (Dubey and Lindsay, 1996).

La transplantation embryonnaire pourrait constituer une voie d'avenir. En effet, un embryon de 7 jours n'est pas encore infecté même s'il est issu d'une vache séropositive et son implantation sur une vache séronégative donnera un veau négatif. En revanche, un embryon transplanté sur une vache séropositive risque de donner un veau infecté à la naissance (Baillargeon *et al.*, 2001). Cette stratégie a l'avantage de conserver le potentiel génétique des vaches séropositives, mais ne sera efficace qu'en l'absence de transmission horizontale.

Enfin, le « croisement industriel » qui consiste à inséminer des vaches ou des génisses laitières séropositives avec des semences de taureaux allaitants pourrait constituer une alternative économique intéressante. En effet, les veaux vendus sont bien valorisés et en l'absence d'avortements, la production laitière peut être maintenue. Toutefois elle n'est applicable que dans les troupeaux à faible et moyenne prévalence (Journel et Pitel, 2001b).

Les stratégies permettant de prévenir la transmission verticale du parasite doivent impérativement être associées aux mesures de prévention contre la contamination horizontale.

Il faut empêcher l'accès des chiens et de tout autre animal domestique ou sauvage aux avortons, aux veaux morts et aux placentas, ces derniers devant être conservés dans des poubelles fermées ou des containers avant de partir à l'équarrissage ou à l'incinération. Par ailleurs, l'accès des chiens et d'autres animaux aux aires de stockage et d'alimentation des bovins (ensilage, concentrés, foin, eau) doit être proscrit (Journel et Pitel, 2001b).

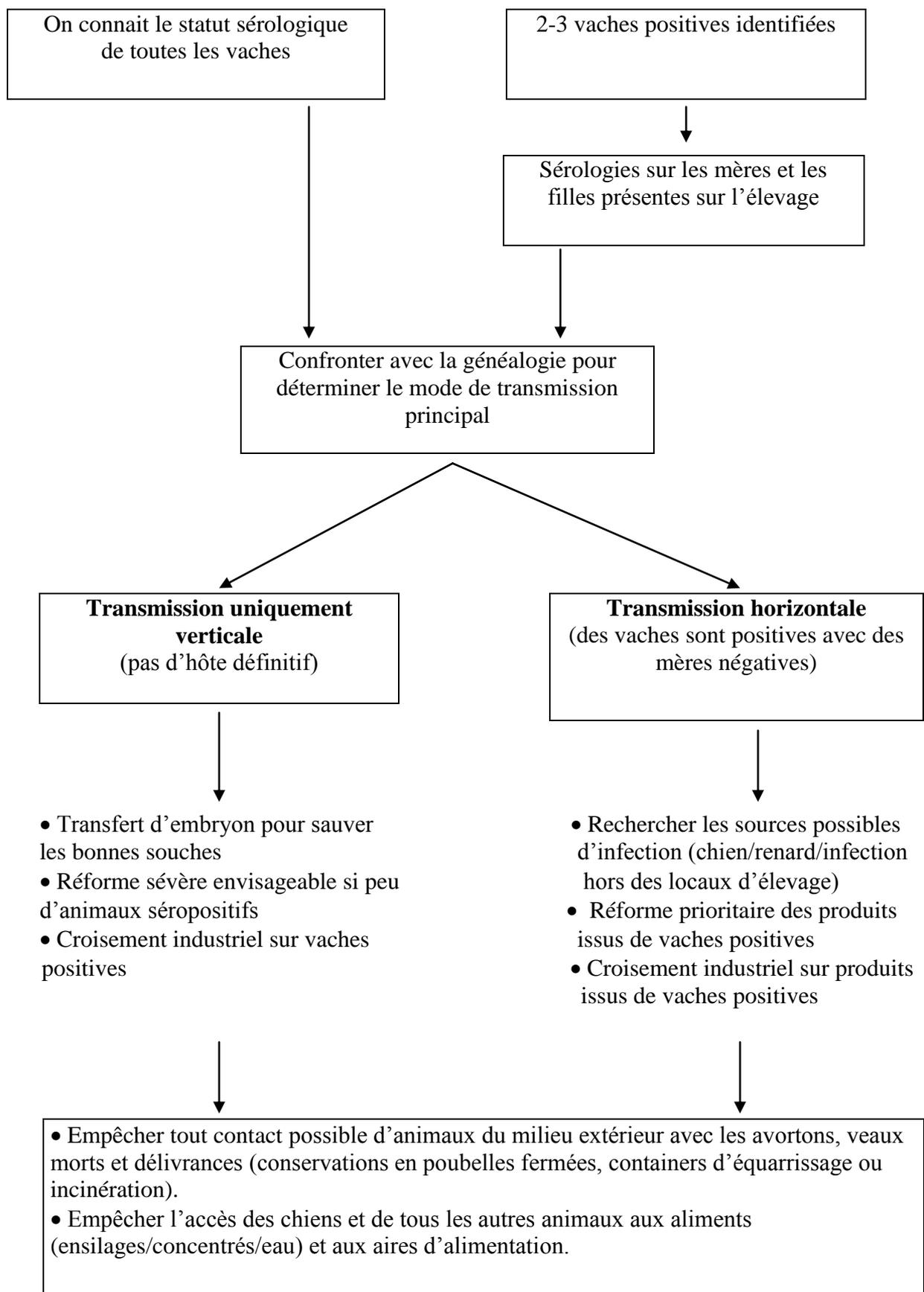
Il est préférable de se séparer des chiens sérologiquement positifs car ils ont pu intervenir en tant qu'hôtes définitifs et une réexcrétion sans recontamination n'est pas impossible. Il faut toutefois se méfier de la séronégativité d'un chien car ce dernier peut séroconvertir tardivement après l'ingestion de kystes à bradyzoïtes ou développer une concentration en anticorps trop faible pour être détectée.

Enfin, une possible réactivation du parasite doit être évitée en limitant toute situation de stress ou d'immunodépression. Ainsi tout fourrage ou ensilage moisi devra être éliminé car il peut contenir des mycotoxines et tout déséquilibre dans la ration alimentaire devra être corrigé (Wouda, 2000).

## β) Défensive

L'introduction de femelles séropositives au sein d'un troupeau indemne devrait être évitée. La réalisation de sérologies devrait alors être systématique à l'achat. Mais se pose le problème du statut des veaux de moins de six mois porteurs d'anticorps d'origine colostrale. Deux solutions sont possibles : soit refuser tous les veaux de moins de six mois séropositifs sachant que la transmission verticale est efficace à 80%, soit attendre l'âge de sept mois pour tester ces animaux avec le problème du délai par rapport à l'achat (Journel et Pitel, 2001b).

L'encadré 2 représente de manière ditochotomique l'attitude à adopter dans un élevage infecté par *Neospora caninum*. La démarche va se baser sur quatre étapes essentielles qui seront reprises dans la partie expérimentale : la réalisation de sérologies sur tout le troupeau, la construction des généalogies de chaque lignée (relation mère-fille) à partir des documents d'élevage et leur relation avec les sérologies afin de déterminer le mode de transmission présent dans l'élevage, et enfin la proposition de mesures de luttés adaptées au(x) mode(s) de transmission mis en évidence précédemment.



**Encadré 2 :** Attitude à adopter dans un élevage où la néosporose a été mise en évidence (Journel et Pitel, 2001b).

## 2) Traitement

Beaucoup de traitements antiparasitaires ont été testés avec une efficacité *in vitro* contre les tachyzoïtes de *Neospora caninum* mais pas contre les bradyzoïtes enkystés *in vivo* (Wouda, 2000).

Par ailleurs, le traitement de vaches en lactation sur une longue période n'étant pas réalisable, ce traitement a été évalué sur des génisses afin de prévenir les avortements et l'infection des veaux (Wouda, 2000). Mais aucun traitement n'est efficace sur les formes bradyzoïtes et donc sur la prévention d'une transmission verticale.

Quant au traitement des chiens, les molécules actives contre les protozoaires classiques le sont aussi pour *Neospora caninum*. Il s'agit de la clindamycine (11 à 22 mg/kg 2 à 3 fois par jour), de l'association sulfamide-triméthoprime (15 mg/kg 2 fois par jour), de la pyriméthamine (1 mg/kg/jr) ou de l'association de cette dernière molécule (à 0,25 à 0,5 mg/kg) à la sulfadiazine (30 mg/kg 2 fois par jour). La durée du traitement est longue avec un minimum de 4 à 6 semaines. De plus, le pronostic reste quand même réservé pour les chiots atteints de troubles nerveux graves avant le début du traitement (Barber, 1998).

Les dernières recherches se concentrent sur de nouvelles substances comme l'artémisinine utilisée en phytothérapie et produit à partir d'*Artemisia annua L.* (Kim *et al.*, 2002) ou la dépicidine et l'apicidine utilisées comme anti-protozoaires (Kwon *et al.*, 2003). Ces molécules ont permis l'inhibition de la multiplication des tachyzoïtes *in vitro* sans effet secondaire néfaste sur les cellules.

Par ailleurs, des études récentes concernant l'action du toltrazuril ont montré que ce dernier avait plutôt une action coccidiostatique qui nécessite la présence d'une réponse immunitaire à cellules T pour être efficace (Ammann *et al.*, 2004).

**DEUXIEME PARTIE :**

*ÉTUDE RETROSPECTIVE DE  
42 ELEVAGES DES  
PYRENEES-ATLANTIQUES  
ATTEINTS DE NEOSPOROSE*

## I- Objectifs

L'étude qui suit a pour but d'évaluer certains aspects épidémiologiques de la néosporose bovine, notamment les changements de statuts sérologiques et l'importance de la transmission verticale du parasite au sein de lignées contaminées. Par ailleurs, les caractéristiques des avortements, conséquences cliniques majeures de l'infection par *Neospora caninum*, seront aussi analysés.

## II- Matériel et méthodes

### A- Description des élevages étudiés

#### 1) Adhésion au plan de lutte néosporose

Les 42 élevages étudiés ont été inclus dans un protocole d'évaluation/assainissement de la néosporose mis en place par le Groupement de Défense Sanitaire des Pyrénées-Atlantiques (GDS 64), face à l'émergence de la néosporose dans ce département. Le protocole est constitué de deux volets: un premier volet concerne la validation du diagnostic de néosporose au sein de l'élevage concerné et le second établit « le plan de lutte ».

Le protocole est subventionné par le GDS 64. Le premier critère d'inclusion est l'adhésion de l'éleveur au GDS 64. L'éleveur doit ensuite constituer un dossier « Caisse Sanitaire » qui peut être accepté ou refusé par le comité de gestion. Les critères minimaux d'acceptation sont deux pertes avérées (2 avortements) ou 1000 euros de frais. Le diagnostic de néosporose doit être établi à partir d'une histologie positive ou évocatrice de lésions dues à *Neospora caninum* sur un avorton, ou à partir d'au moins 3 sérologies positives sur un échantillon de vaches ayant avorté.

Lorsque le comité de gestion a validé le diagnostic en écartant toute autre cause abortive, l'éleveur est libre de s'engager ou non dans le plan de lutte contre la néosporose. S'il accepte, il recevra le protocole de lutte et une convention en triple exemplaire (cf. annexe 1) qu'il devra signer et faire signer par son vétérinaire. Un exemplaire est remis à chacun des acteurs : l'éleveur, son vétérinaire et le responsable du plan au GDS 64.

#### 2) Obligations des éleveurs

Une fois le dossier « Caisse Sanitaire » accepté et la convention signée, le plan de lutte peut être mis en place. L'éleveur doit réaliser une première série de sérologies sur tous les bovins de plus de 24 mois présents sur l'exploitation.

Une seconde série de sérologies devra être réalisée un an plus tard sur tous les bovins non encore connus positifs lors de la première série d'analyses. Par ailleurs, tout bovin acheté devra être testé à son introduction dans l'élevage puis un an plus tard.

Le GDS 64 conseille d'éliminer le plus rapidement possible les animaux séropositifs, mais aucune réforme n'est imposée et aucune aide financière n'est apportée pour la réforme ou le renouvellement. Toutefois, l'éleveur a le temps d'engraisser les animaux séropositifs afin d'obtenir une meilleure valorisation bouchère.

Par ailleurs, le protocole recommande de ne pas garder les filles des vaches séropositives pour le renouvellement du troupeau.

Le GDS 64 s'engage à rembourser 50% du montant hors taxe des analyses de laboratoire et des factures vétérinaires de prélèvements, pendant deux ans à partir de la date de signature de la convention.

### 3) Sélection et description des élevages étudiés

#### a) Sélection

Sur 62 élevages ayant signé une convention de lutte contre la néosporose, 42 ont été retenus après :

- avoir réalisé au moins une série de sérologies,
- avoir établi une généalogie complète du troupeau.

Les renseignements relatifs aux bovins (numéro d'identification national, numéro de travail, date de naissance, date d'entrée et de sortie du cheptel, sexe, race) ont été fournis par l'Etablissement Départemental de l'Elevage (EDE).

Les généalogies ont été établies en collaboration avec les éleveurs, lors de visites d'élevage.

Enfin les dates et stades de gestation de chaque vache ayant avorté, ont été obtenues à partir des déclarations d'avortements par les éleveurs (déclarations de Brucellose bovine).

#### b) Description des élevages sélectionnés

Les 42 élevages de l'étude n'ont pas débuté le plan de lutte la même année. La date de dépistage initiale est différente et se situe entre 1999 et 2004 (annexe 2). Nous définirons comme « **période d'observation** », la période spécifique de chaque élevage pendant laquelle le protocole a été mis en oeuvre.

Sur les 42 élevages concernés, 27 produisent du lait, 14 de la viande et 1 est mixte (lait-viande). Les deux races principalement représentées sont la Prim'Holstein avec 49% de l'effectif bovin total (n = 4928) et la Blonde d'Aquitaine avec 38.5% de l'effectif bovin total, les 12.5% restant regroupant des vaches de race Jersiaise, Brune, Blanc Bleu Belge, Bordelaise, Limousine, Charolaise, Montbéliarde, Normande et INRA 95.

Le nombre de vaches âgées de plus d'un an et demi, présentes en 2005 sur les 42 exploitations varie de 9 à 110 par élevage (moyenne de 48 vaches par élevage).

Sur les 42 élevages, dix ont réalisé une seule série de sérologies, trente ont réalisé deux séries de sérologies et deux ont réalisé trois séries de sérologies. L'intervalle entre les premières et secondes sérologies est compris entre 7 et 41 mois (moyenne de 20 mois), alors qu'il est de 11 à 23 mois entre les secondes et troisièmes sérologies (annexe 2). Par ailleurs, quelques vaches ont été testées ponctuellement suite à des avortements ou des achats.

## B- Modalités de prélèvement

Lors du diagnostic initial, les prélèvements sanguins ont été réalisés par le vétérinaire suite à un ou plusieurs avortements. Les prélèvements pour les sérologies de troupeau ont souvent été réalisées à l'occasion de la prophylaxie annuelle pour les élevages allaitants. Pour les laitiers, le vétérinaire se déplaçait spécialement dans l'élevage. Pour les achats, le vétérinaire demandait l'analyse concernant la néosporose en même temps que celle de la brucellose. Depuis le changement de réglementation, avec arrêt des contrôles systématiques à l'achat, le vétérinaire se déplace spécifiquement pour le dépistage de la néosporose.

D'après la législation, lorsqu'un avortement a lieu, le vétérinaire sanitaire doit se rendre dans l'élevage afin d'effectuer l'examen clinique de l'animal ayant avorté ainsi que les prélèvements nécessaires pour diagnostiquer la brucellose. Un fragment de placenta ou à défaut des sécrétions utérines ainsi que l'avorton et un échantillon de sang sur tube sec doivent être prélevés.

Une déclaration d'avortement est alors rédigée et fournit les renseignements relatifs à l'identification de l'animal et l'anamnèse de l'avortement (date et stade de gestation au moment de l'avortement).

Toutefois, les déclarations ne sont pas toujours précisément renseignées, notamment en ce qui concerne le stade de gestation, soit par oubli ou négligence de la part du vétérinaire, soit par méconnaissance de l'éleveur des dates de saillie. En effet, ces dernières ne sont pas toujours répertoriées, par négligence ou à cause du mode d'élevage (saillie naturelle dans les élevages allaitants).

Les prélèvements sont ensuite envoyés au Laboratoire Départemental d'Analyses (LDA) des Pyrénées-Atlantiques pour y être analysés.

## C- Méthode de diagnostic sérologique : test ELISA commercialisé par IDEXX

Le test sérologique Neospora utilisé par le LDA des Pyrénées-Atlantiques pendant la période d'étude est le test ELISA nommé Chekit-Neospora, commercialisé par les laboratoires IDEXX et conçu par les laboratoires BOMMELI. En 2004, un changement concernant la version du test a eu lieu : le laboratoire est passé de la version 4 à la version 0, la différence entre ces deux versions concerne une modification de praticabilité (conjugué prêt à l'emploi, interprétation semi-quantitative), sans modification des performances (sensibilité, spécificité, répétabilité) du test.

### 1) Description générale du test

Le test Chekit-Neospora est basé sur une méthode de dosage immunoenzymatique permettant la détection d'anticorps dirigés contre *Neospora caninum*, de type ELISA indirect.

Les cupules de la plaque de microtitration sont sensibilisées avec un antigène inactivé qui se lie spécifiquement aux anticorps dirigés contre *Neospora caninum*. Si l'échantillon contient des anticorps anti-*Neospora caninum*, ceux-ci se combinent avec l'antigène inactivé fixé dans les cupules et forment un complexe anticorps-antigène reconnu par des antiglobulines associées à un conjugué, capable de donner en présence de son substrat une réaction colorée. La lecture se fait par mesure de l'absorbance par spectrophotométrie.

## 2) Protocole d'utilisation, lecture et interprétation

Le mode opératoire est présenté en annexe (annexe 3). Il concerne la version 0. Dans l'étude qui suit, les statuts « faiblement positif » et « fortement positif » ont été considérés comme « positif ».

## 3) Performances du test utilisé

La sensibilité et la spécificité du test par rapport au test de référence, l'IFI, sont fournies par le fabricant (BOMMELI Laboratories).

La sensibilité annoncée est de **97,1%**, calculée par rapport à une population d'échantillons positifs en immunofluorescence (IFI).

La spécificité annoncée est de **95,1%**, calculée par rapport à une population négative en immunofluorescence (IFI).

## D- Recueil des résultats

Dans le cadre des conventions signées par les éleveurs, les résultats sérologiques sont transmis au GDS 64. Dans un avenir proche, ces résultats devraient être transmis directement du LDA au GDS 64 par voie informatique.

Les déclarations d'avortements sont fournies par les éleveurs. Les déclarations d'avortements pendant le plan de lutte ne sont pas exhaustives, pour au moins deux raisons :

- les éleveurs ne déclarent pas tous les avortements,
- les éleveurs ne font pas la démarche de récupérer les déclarations chez leur vétérinaire afin de les envoyer au GDS 64.

La fréquence des avortements est donc probablement sous-estimée.

## E – Traitement des données

Les données disponibles ont été saisies sur une base de données « 4<sup>ème</sup> Dimension ». Cette dernière a été élaborée à partir de « fiches individuelles bovins » comprenant tous les renseignements fournis après extraction auprès de l'EDE (numéro national et de travail, date de naissance, sexe, race, date d'entrée et de sortie et leurs motifs respectifs), ce pour chaque élevage concerné.

Les numéros nationaux des mères, collectés auprès des éleveurs (généalogie), ainsi que les caractéristiques des sérologies (date et résultat) et des avortements (date et stade de gestation) ont été ajoutés à chaque fiche individuelle.

Le traitement numérique et statistique des données saisies auprès des 42 élevages sélectionnés a été réalisé grâce au logiciel « SAS V8 ».

### III- Résultats

#### A- Exhaustivité des données

Au total, l'étude porte sur 42 élevages qui regroupent **4928** bovins de tout âge. Parmi ces derniers, **2700** ont été testés au moins une fois.

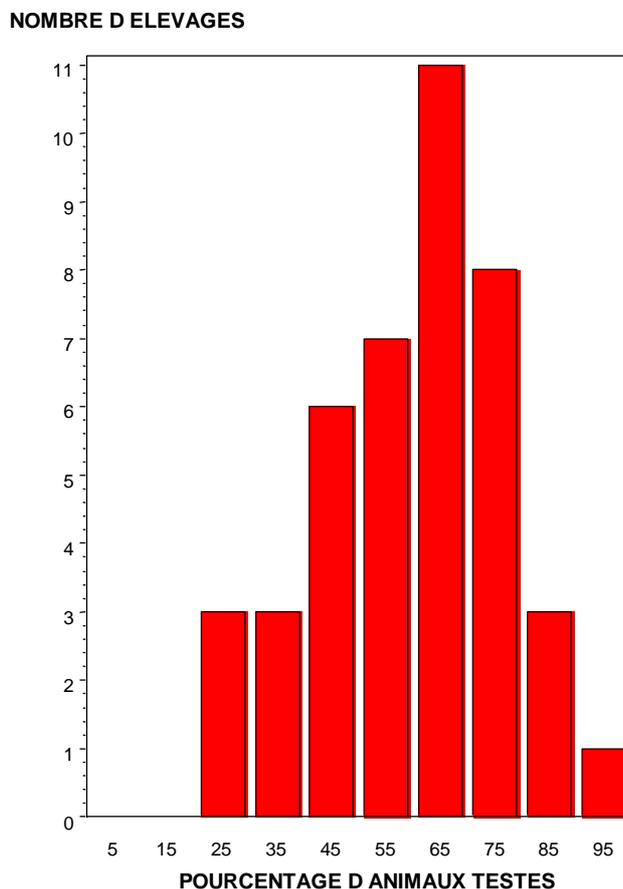


Figure 3 : Distribution des élevages selon le pourcentage d'animaux testés parmi les bovins présents sur les exploitations pendant la période d'observation.

Pour douze élevages (28,5%), moins de la moitié du troupeau a été dépisté durant la période d'observation. Ces données semblent peu exhaustives.

Toutefois, sur les **2228** bovins non testés mais présents sur les exploitations pendant la période d'observation, on peut constater, d'après la répartition par âge, qu'une grande proportion de ces animaux sont de jeunes femelles ou jeunes mâles sortis des exploitations avant l'âge de mise à la reproduction (entre six mois et un an). Quant aux bovins qui n'ont pas été sortis des exploitations, 91% sont des femelles dont les deux tiers ont moins de deux ans.

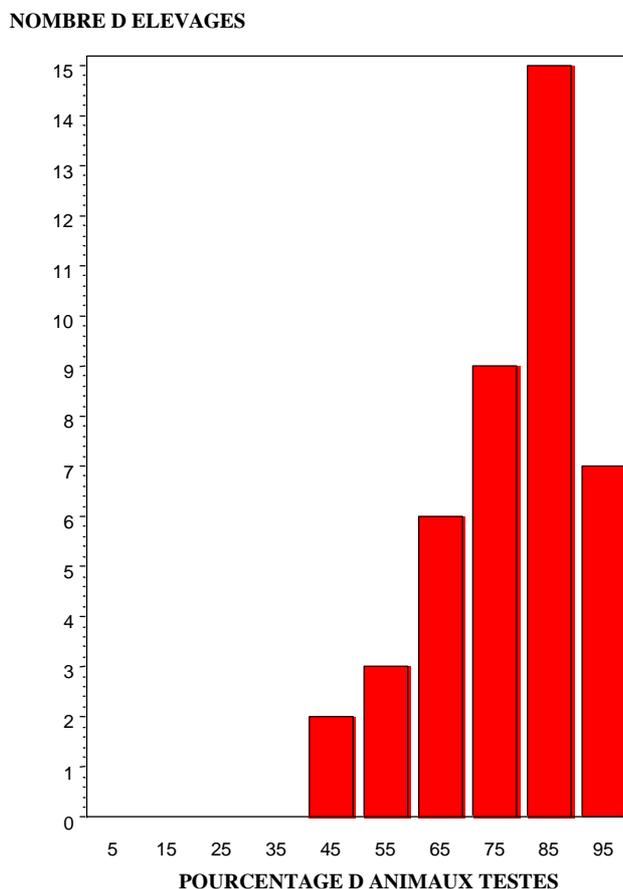
De plus, les bovins non testés sont plus jeunes (694 jours SD=993) que les bovins testés (2004 jours SD=900) ( $p < 10^{-4}$ ), ce qui concorde avec les observations citées précédemment.

Ainsi, la majeure partie des bovins non testés correspond à des animaux nés sur les exploitations, mais éliminés avant l'âge d'un an, ou conservés mais pas encore en âge de reproduire.

Finalement, si l'on exclut les jeunes mâles et femelles sortis des exploitations avant l'âge de reproduire ainsi que les jeunes femelles de moins d'un an et demi conservées tel que :

$$\text{Exhaustivité} = \frac{\text{Nombre de bovins testés}}{\text{Nbre BV total} - (\text{jeunes mâles et femelles sortis} + \text{femelles} < 1,5 \text{ ans présentes})}$$

et que l'on construit le même histogramme que celui de la figure 3, on obtient :



**Figure 4** : Distribution des élevages selon le pourcentage d'animaux testés parmi les bovins « réellement » présents sur les exploitations pendant la période d'observation.

La proportion de bovins testés parmi la population « réellement » présente sur les exploitations pendant la période d'observation est nettement plus importante. Seulement dans 2 élevages, moins de 50% des animaux a été dépisté. Les données peuvent donc être considérées comme quasi proches de l'exhaustivité.

## B- Etude des statuts sérologiques

### 1) Description des sérologies réalisées pendant la période d'observation

#### a) Nombre de sérologies par animal

Au total **2700** bovins ont été dépistés au moins une fois sur la période d'observation. Chaque animal a pu être testé une à plusieurs fois selon sa durée de vie dans l'élevage ou d'événements particuliers comme les avortements et les achats.

Tableau 17 : Description du nombre de sérologies réalisées par bovin et des résultats sérologiques obtenus sur la période d'observation dans les 42 élevages du département des Pyrénées-Atlantiques.

Nombre de sérologies réalisées par bovin	Résultat sérologique			Total
	Positif	Douteux	Négatif	
<b>1</b>	<b>823</b> 30.5%	<b>64</b> 2.4%	<b>1813</b> 67.1%	<b>2700</b> 100%
<b>2</b>	<b>227</b> 23.9%	<b>13</b> 1.4%	<b>711</b> 74.7%	<b>951</b> 100%
<b>3</b>	<b>27</b> 19.9%	<b>1</b> 0.7%	<b>108</b> 79.4%	<b>136</b> 100%
<b>4</b>	-	-	<b>6</b> 100%	<b>6</b> 100%

Un peu plus d'un tiers (35,2%) des bovins dépistés une première fois ont été retestés par la suite.

Par ailleurs, la proportion de bovins testés négatifs augmente avec le nombre de sérologies comparée à la proportion de bovins testés positifs. Cette observation est directement liée au mode de prélèvement établi dans le plan de lutte contre la néosporose. En effet, seuls les bovins testés négatifs ou douteux doivent faire l'objet d'un nouveau prélèvement annuel, ce qui diminue les chances de retrouver des vaches positives lors des deuxième ou troisième séries de sérologies.

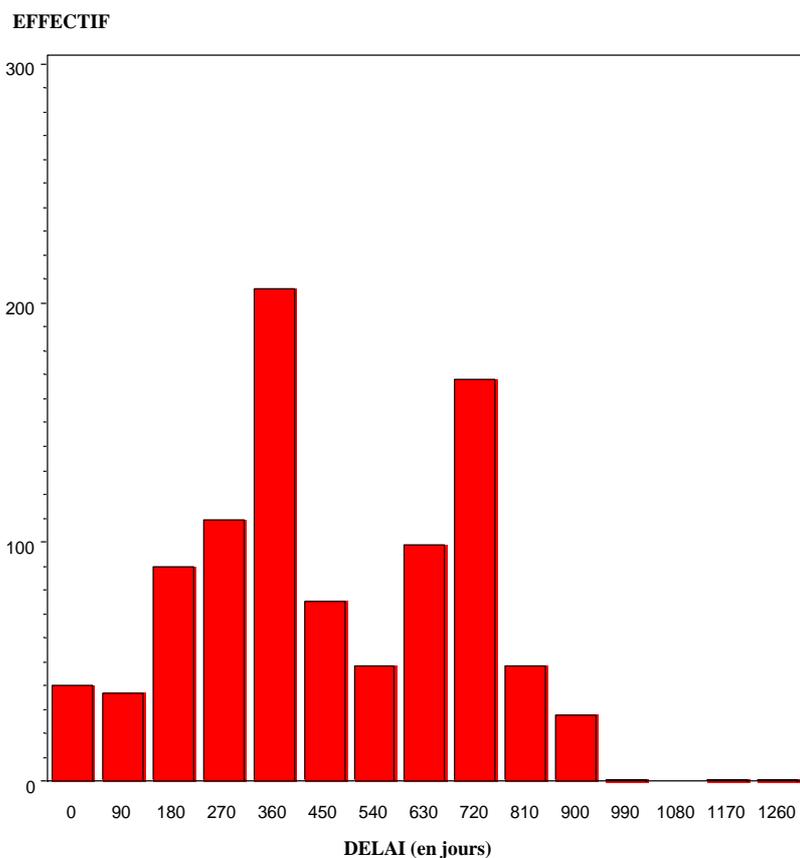
b) Description des délais qui séparent les différentes sérologies

La description des délais est basée sur la population d'animaux ayant été testés au moins deux fois, ce qui représente un échantillon de **951** bovins.

**Tableau 18 :** Description des délais entre les différentes sérologies réalisées sur les bovins des 42 élevages des Pyrénées-Atlantiques pendant la période d'observation.

	Délai (en jours)			Nombre total de bovins
	Minimum	Médiane	Maximum	
<b>1<sup>ère</sup>-2<sup>ème</sup> sérologie</b>	3	402	1280	<b>951</b>
<b>2<sup>ème</sup>-3<sup>ème</sup> sérologie</b>	7	347	793	<b>136</b>
<b>3<sup>ème</sup>-4<sup>ème</sup> sérologie</b>	347	420	716	<b>6</b>

Les médianes calculées montrent que la plupart des sérologies ont été réalisées à un intervalle supérieur à un an. Les valeurs extrêmes correspondent aux sérologies réalisées ponctuellement sur les vaches ayant avorté ou ayant été achetées.



**Figure 5 :** Répartition des délais entre la première et la seconde sérologie chez les bovins testés deux fois.

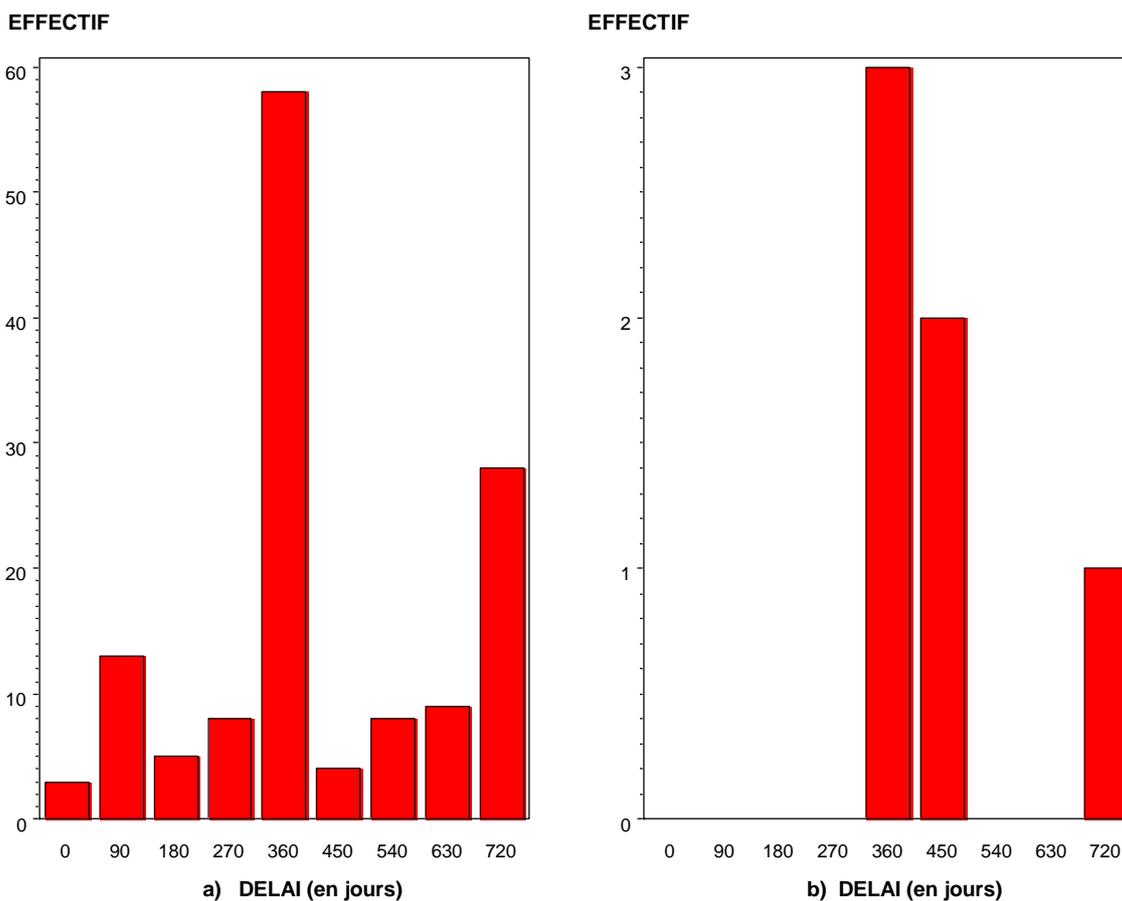


Figure 6 : a) Répartition des délais entre la seconde et la troisième sérologie chez les bovins testés trois fois.

b) Répartition des délais entre la troisième et la quatrième sérologie chez les bovins testés quatre fois.

L'observation des diagrammes fait apparaître deux pics correspondant à un an et deux ans d'intervalle entre les sérologies. Ces données sont influencées par le plan de lutte néosporose qui oblige les éleveurs à tester leur troupeau deux ou trois fois à un an d'intervalle. Cependant, on peut constater que ce délai n'est pas strictement respecté et dépasse souvent l'année imposée.

## 2) Age lors de la première sérologie

Parmi la population de bovins dépistés, il est intéressant de savoir combien ont été testés avant l'âge de 6 mois, âge minimum à partir duquel on peut considérer que les anticorps ne sont plus d'origine passive (colostrale).

Tableau 19 : Description de l'âge des bovins lors de leur première sérologie.

	Effectif		Age		
	Total	Fréquence (en %)	minimum	médiane	maximum
<b>Bovins testés avant 6 mois</b>	<b>28</b>	1	20 j	65.5 j	178 j
<b>Bovins testés après 6 mois</b>	<b>2672</b>	99	6 mois 1 jour	3 ans 3 mois	18 ans
<b>Total</b>	<b>2700</b>	100	-	-	-

Seulement 1% des bovins ont été testés avant l'âge de 6 mois, ce qui est négligeable.

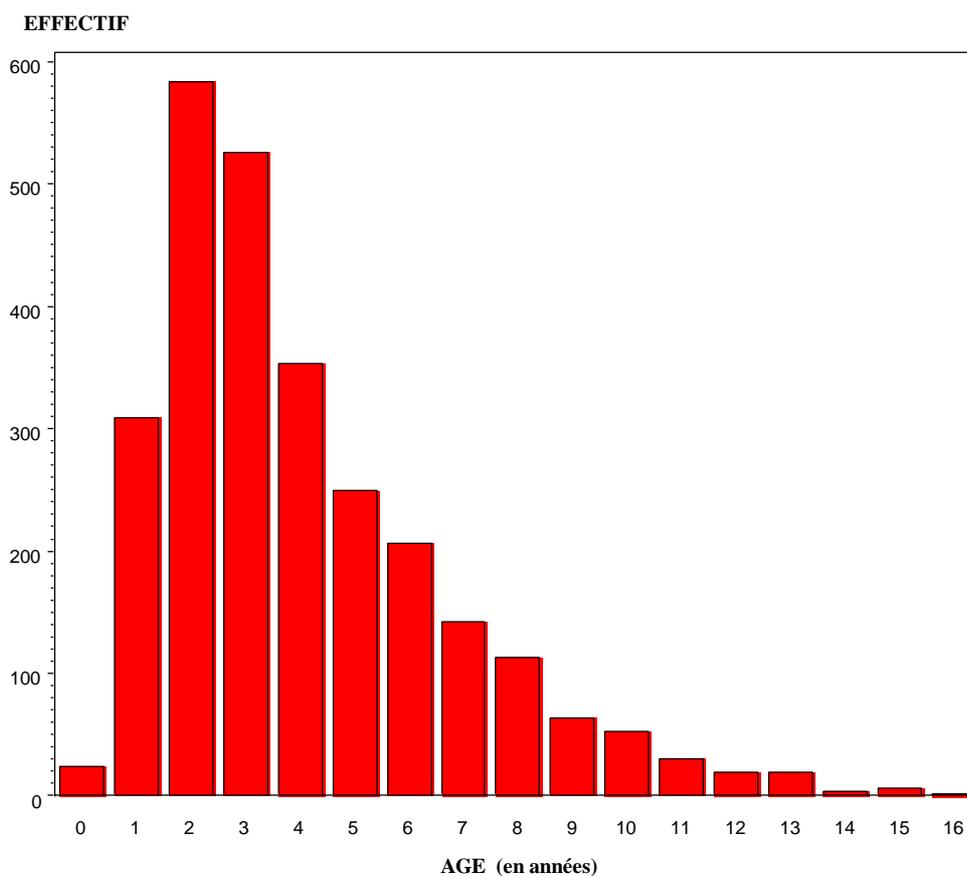
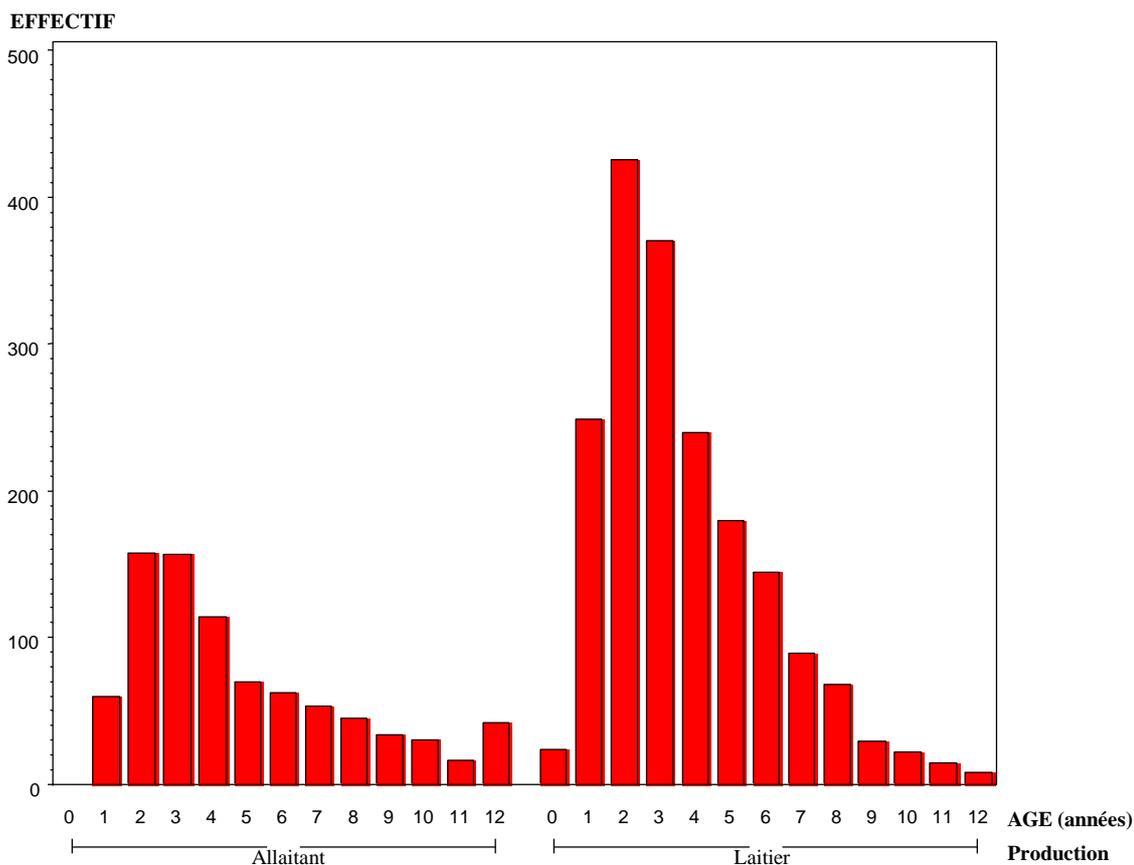


Figure 7 : Répartition des animaux selon leur âge lors de leur première sérologie.

Concernant les bovins dépistés après l'âge de six mois, plus de la moitié sont testés entre 6 mois et 5 ans, ce qui est représentatif de la structure des âges, influencée entre autres par la pratique des prises de sang collectives.

Toutefois, parmi les 42 élevages étudiés, deux tiers sont laitiers et un tiers allaitants. Or la mise à la reproduction étant généralement plus tardive chez les allaitants (25 mois en moyenne contre 15 mois pour les laitières), on peut supposer que l'âge lors de la première sérologie sera différent selon le mode de production.

L'histogramme qui suit représente l'âge lors de la première sérologie en fonction du type de production (laitier ou allaitant).



**Figure 8** : Répartition des bovins selon leur âge lors de la première sérologie et selon le type de production des élevages.

La proportion de bovins testés avant l'âge de deux ans dans les élevages laitiers (25%) est pratiquement deux fois plus importante que dans les élevages allaitants (14%). Il existe donc une différence significative de l'âge à la première sérologie selon le type de production.

De plus, l'âge moyen lors de la première sérologie est de 1324 jours (3 ans et 7 mois) chez les laitières contre 1756 jours (4 ans et 9 mois) chez les allaitantes, ce qui concorde avec les observations établies précédemment.

### 3) Description des résultats sérologiques et des séroconversions

Les tableaux suivants décrivent les différents statuts obtenus pour chaque bovin après chaque sérologie selon le premier résultat a été positif, douteux ou négatif.

#### α) Bovins avec un premier résultat sérologique positif

Tableau 20 : Répartition des bovins avec un premier résultat sérologique positif.

Résultat sérologique	+	+/+	+/+/+	+/D	+/D/D	+/-	+/-/+	+/-/-/-	Total
Nombre de bovins	675	124	10	4	1	7	1	1	823
Fréquence (en %)	82	15.1	1.2	0.5	0.1	0.9	0.1	0.1	100

Sur 148 bovins testés au moins deux fois, 134 (90,5%) resteront positifs et 14 (9,5%) changeront de statut.

Pour les bovins de statut douteux lors des deuxième et/ou troisième sérologies, il est difficile d'interpréter les résultats, même s'il est tentant de considérer ces animaux comme positifs, sachant qu'ils l'ont été une première fois.

Pour neuf bovins, les résultats sérologiques sont discordants (positif puis négatif). Trois hypothèses peuvent être émises :

- soit ils ont été testés positifs une première fois alors qu'ils ne l'étaient pas, ce sont donc des faux positifs. C'est probablement le cas pour la vache testée une fois positive puis trois fois négative par la suite.
- soit ils ont été retestés pendant une période d'immunodépression (gestation, maladie...), le taux d'anticorps anti-*Neospora* étant trop faible pour être détecté. C'est probablement le cas pour la vache dont le résultat sérologique est : +/-/+.
- soit ils ont été testés trop jeunes avec une détection d'anticorps. Après vérification, le plus jeune âge de dépistage calculé parmi ces 9 bovins est d'un an et deux mois. On peut donc abandonner cette dernière hypothèse.

#### β) Bovins avec un premier résultat sérologique douteux

Tableau 21 : Répartition des bovins avec un premier résultat sérologique douteux.

Résultat sérologique	D	D/D	D/-	D/-/+	D/+	D+/+	Total
Nombre de bovins	37	3	5	2	16	1	64
Fréquence (en %)	58	4.6	7.8	3.1	25	1.5	100

Parmi les 64 bovins avec un premier résultat sérologique douteux, seulement 27 (42%) ont été retestés par la suite. En pratique, ces bovins sont soit éliminés rapidement car considérés comme positifs, soit retestés un an plus tard.

Par ailleurs, 24 bovins sur 27 (88,9%) changent de statut par la suite. Les bovins douteux puis positifs peuvent être considérés comme positifs vis-à-vis de *Neospora caninum*. En revanche, il est plus difficile de conclure sur les animaux retestés douteux ou négatifs.

#### γ) Bovins avec un premier résultat sérologique négatif

Tableau 22 : Répartition des bovins avec un premier résultat sérologique négatif.

Résultat sérologique	-	-/-	-/-/-	-/-/-/-	-/D	-/D/-	-/+	-/-/+	-/+/+	Total
Nombre de bovins	1037	584	101	5	4	1	68	5	8	1813
Fréquence (en %)	57.2	32.2	5.6	0.3	0.2	0.1	3.7	0.3	0.4	100

Sur 1813 bovins avec un premier résultat sérologique négatif, 776 (42,8%) sont prélevés au moins deux fois dont 86 (11%) avec des résultats discordants.

Un bovin initialement testé négatif peut se séropositer suite à une contamination de type horizontale. C'est probablement le cas pour les bovins testés deux fois négatifs et une troisième fois positif. Toutefois, on ne peut pas exclure des faux négatifs dans l'échantillon de bovins positifs lors de la seconde sérologie.

Quant aux 5 bovins testés négatifs puis douteux, il est délicat de donner des interprétations.

#### 4) Séroprévalence

##### a) Séroprévalence individuelle globale

Afin de définir un statut pour les bovins testés une à plusieurs fois, nous considérerons :

- qu'un bovin est « positif » si au moins un de ses résultats sérologiques est positif ;
- qu'un bovin est « négatif » si tous ses résultats sérologiques sont négatifs ;
- et qu'un bovin sera « douteux » si tous ses résultats sérologiques sont douteux ou s'ils sont au moins une fois douteux sans jamais être positif.

Ces statuts seront considérés arbitrairement comme les « **statuts définitifs** » des bovins.

Tableau 23 : Résultats globaux des analyses réalisées sur les bovins des 42 élevages du département des Pyrénées-Atlantiques pendant la période d'observation.

<b>Statut définitif</b>	<b>Positif</b>	<b>Douteux</b>	<b>Négatif</b>	<b>Total testés</b>
<b>Nombre de bovins</b>	923	50	1727	<b>2700</b>
<b>Fréquence (en %)</b>	34.2	1.8	64	<b>100</b>

Si l'on considère les bovins au statut « douteux » comme des animaux négatifs, la séroprévalence individuelle est égale à **34.2%**.

Si l'on considère les bovins au statut « douteux » comme des animaux positifs, la séroprévalence individuelle est égale à **36%**.

Si l'on ne tient pas compte des bovins au statut « douteux », la séroprévalence individuelle est égale à **34.8%**.

Compte tenu des caractéristiques des bovins non testés (âge, sexe), il est difficile de considérer ces animaux comme identiques à ceux testés. Aucun intervalle de confiance n'a donc été établi.

En excluant les résultats douteux, l'analyse de la séroprévalence individuelle globale en fonction du type de production (allaitant/laitier), indique une séroprévalence plus élevée (**40.8%**) dans la population de bovins allaitants (n = 978) par rapport à la population de bovins laitiers (**31.3%** ; n = 1672) (p<0.001).

Ces résultats sont vérifiés par l'étude de la séroprévalence individuelle globale des vaches de race Blonde d'Aquitaine (n = 998), qui est plus élevée (40.8%) que la séroprévalence individuelle globale des vaches de race Prim'Holstein (31.4% ; n = 1529) (p<0.001).

## b) Séroprévalence par élevage

Dans l'étude qui suit, les bovins au statut « douteux » sont exclus.

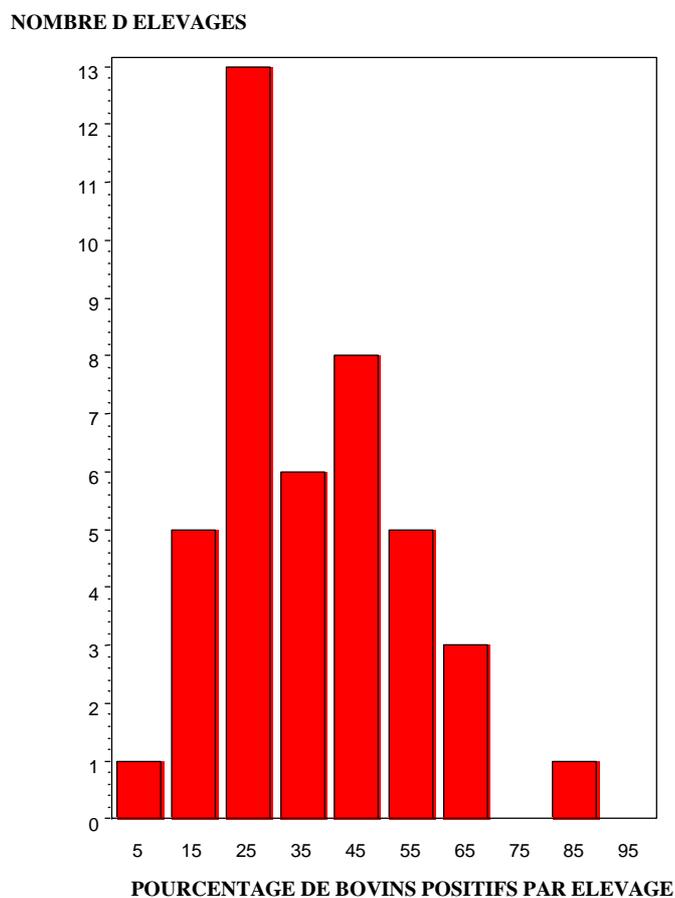
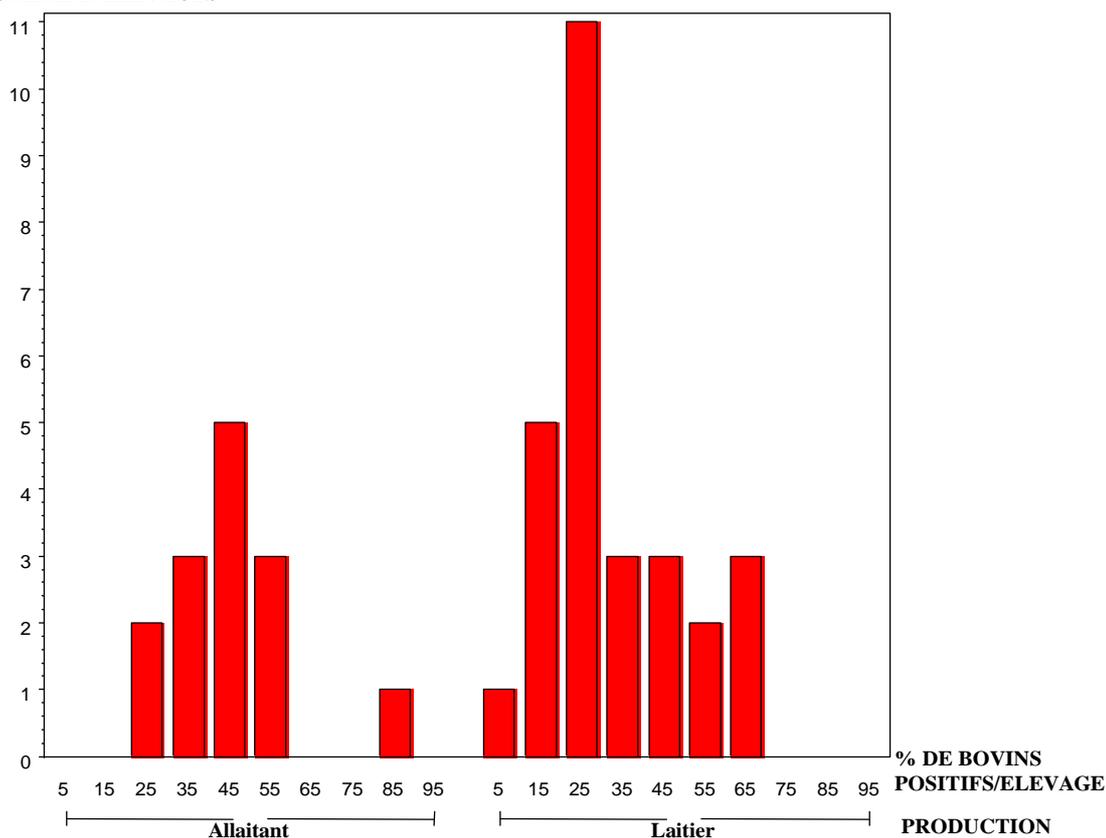


Figure 9 : Répartition des élevages en fonction du nombre de bovins testés positifs sur la période d'observation.

Si l'on considère la proportion d'animaux testés positifs par élevage, on peut constater qu'il existe une grande variabilité qui s'étend de **8.9% à 85.7%**.

Cependant, deux tiers des élevages ont moins de 50% d'animaux testés positifs, ce qui est vérifié par la médiane qui est de 33.5%.

**NOMBRE D ELEVAGES**



**Figure 10** : Répartition des élevages en fonction du nombre de bovins testés positifs et en fonction du type de production.

La variabilité est toujours importante, qu'il s'agisse des productions de type allaitant ou laitier.

Par ailleurs, la médiane est plus élevée dans les élevages allaitants (43.5 % ) que dans les élevages laitiers (32.6 %).

## C- Etude de la transmission verticale

### 1) Population étudiée

Afin d'évaluer dans quelle proportion les mères contaminées avant la gestation transmettent le parasite à leurs filles, nous avons sélectionné des couples mères-filles. Compte tenu du changement possible de statut des mères au cours du temps, nous avons restreint notre étude à des vaches de statut connu autour de la naissance de leur fille.

Les mères ont été choisies de la façon suivante :

- concernant les mères positives : leur statut doit être connu avant la naissance de leur fille et ne doit pas avoir changé par la suite, dans les cas où elles auraient été retestées.
- concernant les mères négatives : elles doivent avoir été testées négatives au moins deux fois après la naissance de leur fille et ne doivent pas avoir changé de statut sérologique.

Quant aux filles, au moins une sérologie a dû être réalisée entre 10 mois et deux ans et demi. Les génisses qui n'appartiennent pas à cette tranche d'âge ont été exclues, leur statut sérologique ayant été établi trop tôt (présence possible d'anticorps colostraux) ou trop tard.

Les couples mère-fille ainsi sélectionnés sont au nombre de 25 pour les mères testées positives et 140 pour les mères testées négatives, ce qui donne un échantillon de **165** couples.

### 2) Résultats

Tableau 24 : Description de la répartition des couples mères-filles en fonction de leur statut respectif.

	Nombre de filles testées négatives	Nombre de filles testées positives	Total
Nombre de mères testées négatives	132 94.3%	8 5.7%	140 100%
Nombre de mères testées positives	1 4%	24 94.3%	25 100%
Total	133	32	165

Ainsi, **94.3%** des mères testées positives donnent naissance à des filles positives.

Les 8 vaches séropositives et nées de mères séronégatives, ont pu se contaminer après leur naissance de façon horizontale, ou bien correspondent à de « faux positifs ».

Concernant la vache dépistée négative alors que sa mère est positive, il aurait été intéressant de la retester afin de voir si son taux d'anticorps ne fluctue pas.

## D- Etude des avortements

### 1) Description des vaches ayant avorté pendant la période d'observation

#### a) Nombre de vaches ayant avorté et ayant été testées

Sur les 316 vaches ayant avorté au moins une fois dans les 42 élevages de l'étude, **302** ont été dépistées concernant la néosporose bovine. Le nombre de sérologies réalisées par vache est compris entre 1 et 4 (tableau 27).

Tableau 25 : Résultats sérologiques *Neospora caninum* sur les bovins ayant avorté dans les 42 élevages.

Nombre de sérologies réalisées par bovin	Résultat sérologique			Total
	Positif	Douteux	Négatif	
<b>1</b>	<b>186</b> 61.6%	<b>5</b> 1.7%	111 36.7%	<b>302</b> 100%
<b>2</b>	<b>83</b> 57.6%	<b>3</b> 2.1%	58 40.3	<b>144</b> 100%
<b>3</b>	<b>15</b> 40.5%	<b>1</b> 2.7%	21 56.8	<b>37</b> 100%
<b>4</b>	<b>0</b> 0%	<b>0</b> 0%	4 100	<b>4</b> 100%

On peut constater que le nombre de vaches testées au moins deux fois est plus élevé parmi la population des vaches ayant avorté que chez les bovins tout-venants (paragraphe III-A- 1) a)).

#### b) Description des délais séparant les avortements des dépistages sérologiques

Sur les 316 vaches ayant avorté au moins une fois, **251** vaches seront retenues. En effet, outre l'absence de dépistage néosporose, la date (jour, mois et année) des avortements n'étant pas connue précisément, ils ne pourront être pris en compte.

Tableau 26 : Description des délais séparant la première sérologie et le premier avortement.

	Effectif		Délai entre la 1 <sup>ère</sup> sérologie et le 1 <sup>er</sup> avortement (en jours)		
	Total	Fréquence (en %)	minimum	médiane	maximum
<b>Sérologie1&lt;avortement1</b>	97	38.7	-714	-230	-1
<b>Sérologie1&gt;avortement1</b>	154	61.3	0	9	1236
<b>Total</b>	<b>251</b>	<b>100</b>	-	-	-

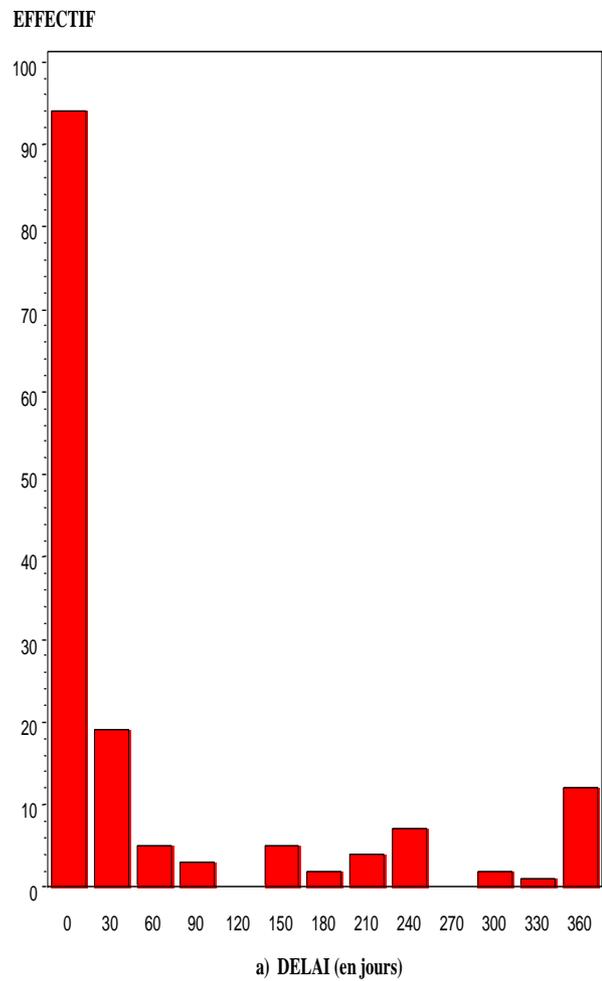
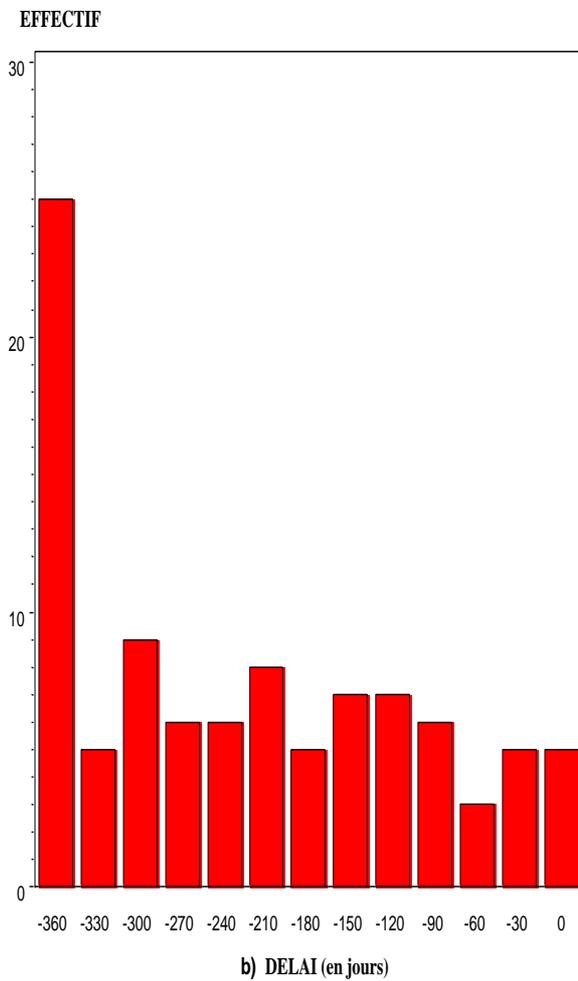


Figure 11 : a) Distribution des délais entre la première sérologie et le premier avortement quand celui-ci est postérieur au dépistage.  
 b) Distribution des délais entre la première sérologie et le premier avortement quand celui-ci est antérieur au dépistage.

La plupart des vaches ayant été dépistées après leur premier avortement, l'ont été dans une période inférieure à trois mois voire dans le mois qui suit l'événement pour plus de la moitié des vaches.

Concernant les vaches dépistées avant leur avortement, plus des deux tiers ont été testées dans l'année précédant l'événement.

## 2) Risque d'avorter

### a) Matériel et méthodes

L'incidence globale des avortements est définie comme le nombre d'avortements observés sur la période d'observation, divisé par le nombre total de gestations, quel que soit le statut sérologique (positif, douteux, négatif ou inconnu) des vaches.

Afin d'évaluer l'impact de la néosporose sur l'événement « avortement », un échantillon de vaches positives et un échantillon de vaches négatives sont sélectionnés à partir des bovins n'ayant pas changé de statut sérologique au cours de la période d'observation. L'incidence des avortements a été calculée pour chaque échantillon. Le risque relatif d'avortement pour les vaches séropositives par rapport aux vaches séronégatives est donné par le rapport des incidences des avortements sur la période d'observation.

En l'absence de données précises sur les gestations effectives, le nombre théorique de gestations a été calculé comme suit.

La durée de présence de chaque vache a été calculée sur la période d'observation. L'âge théorique de première mise bas a été fixé à 2 ans pour les vaches laitières et à 3 ans pour les vaches allaitantes. Un nombre théorique de 1 gestation par année a été fixé pour chaque vache, permettant de calculer le nombre théorique de gestations sur la période d'observation.

### b) Résultats

Sur la période d'observation, le nombre théorique de gestations est de 12931 pour 3091 vaches en âge de se reproduire, issues des 42 élevages (soit une moyenne de 4.2 gestations par vache). Sur la même période, 343 avortements ont été rapportés. L'incidence globale des avortements est donc de  $343 / 12931 * 100 = 2.65$  avortements pour 100 gestations.

L'incidence globale d'avortement pour les élevages laitiers est de 2.71 avortements pour 100 gestations théoriques (2120 vaches, 237 avortements pour 8721 gestations théoriques).

L'incidence globale d'avortement pour les élevages allaitants est de 2.52 avortements pour 100 gestations théoriques (971 vaches, 106 avortements pour 4210 gestations théoriques).

Un échantillon de 2330 vaches de statut sérologique connu (757 vaches séropositives et 1573 séronégatives) a été sélectionné parmi les 3091 vaches présentes et en âge de se reproduire.

Un total de 9889 gestations théoriques a été calculé pour l'échantillon. Sur la même période, 309 avortements sont rapportés, soit une incidence de 3.12 avortements pour 100 gestations théoriques. Ce chiffre est proche de l'incidence globale calculé précédemment.

Pour le groupe de vaches séropositives, 209 avortements sont rapportés pour 3126 gestations théoriques, soit une incidence de 6.68 avortements pour 100 gestations théoriques.

Pour le groupe de vaches séronégatives, 100 avortements sont rapportés pour 6763 gestations théoriques, soit une incidence de 1.48 avortements pour 100 gestations théoriques.

Le risque relatif d'avortement pour les vaches séropositives par rapport aux vaches séronégatives est donc de  $6.68/1.48 = 4.53$  (IC95% = 3.57 – 5.71).

En séparant les types de production, laitier et allaitant, les résultats sont les suivants :

Production allaitante (803 vaches) : 78 avortements pour 1307 gestations théoriques pour le groupe séropositif (310 vaches) (incidence = 5.97 pour 100 gestations théoriques) ; 19 avortements pour 2178 gestations théoriques pour le groupe séronégatif (493 vaches) (incidence = 0.55 avortement pour 100 gestations théoriques).

Le risque relatif d'avortement pour les vaches séropositives par rapport aux vaches séronégatives est de **6.84** (IC95% = 4.16 – 11.23).

Production laitière (1527 vaches) : 131 avortements pour 1799 gestations théoriques pour le groupe séropositif (n=447) (incidence = 7.28 pour 100 gestations théoriques) ; 81 avortements pour 4585 gestations théoriques pour le groupe séronégatif (n=1080) (incidence = 1.77 avortement pour 100 gestations théoriques).

Le risque relatif d'avortement pour les vaches séropositives par rapport aux vaches séronégatives est de **4.12** (IC95% = 2.14 – 5.40).

### 3) Description des avortements

#### a) Population étudiée

Pour étudier l'effet de *Neospora caninum* sur le nombre d'avortements et les stades de gestation, les vaches testées avec un résultat positif avant leur premier avortement ou jusqu'à 2 mois après, ont été sélectionnées.

Le tableau 29 décrit le nombre de vaches testées avant et jusqu'à 60 jours après leur premier avortement ainsi que leur(s) résultat(s) sérologique(s) ultérieur(s) si elles ont été retestées par la suite.

Tableau 27 : Description des vaches ayant avorté et ayant été testées autour de l'avortement.

	Nombre de vaches testées	Résultat 1 <sup>ère</sup> sérologie	Résultat 2 <sup>ème</sup> sérologie	Résultat 3 <sup>ème</sup> sérologie	Résultat 4 <sup>ème</sup> sérologie
1 <sup>ère</sup> sérologie < 1 <sup>er</sup> avortement	29	Positif	-	-	-
	21	Positif	Positif	-	-
	6	Positif	Positif	Positif	-
Av < 1ère sérologie < 60 jours	50	Positif	-	-	-
	27	Positif	Positif	-	-
	1	Positif	Positif	Positif	-
	1	Positif	Douteux	Douteux	-
	1	Positif	Négatif	Négatif	Négatif

Sur les 302 vaches ayant avorté et ayant été testées, 136 ont été retenues dont deux animaux ont été soustraits, ayant changé de statut après leur premier avortement. L'une de ces 2 vaches a été testée trois fois négative par la suite et peut être une fausse positive. L'échantillon retenu de **134** vaches sera nommé « **vaches avP** ».

Parallèlement, **84** vaches ayant avorté, ont été testées plusieurs fois et à chaque fois négative ou une seule fois négative après l'avortement. Cet autre échantillon sera nommé « **vaches avN** ».

b) Nombre d'avortements par vache

Tableau 28 : Description du nombre d'avortements

	Nombre d'avortements			Effectif total
	1	2	3	
<b>Vaches ayant avorté</b>	<b>284</b> 89.9%	<b>29</b> 9.2%	<b>3</b> 0.9%	<b>316</b> 100%
<b>Vaches avP</b>	<b>125</b> 93.3%	<b>9</b> 6.7%	-	<b>134</b> 100%
<b>Vaches avN</b>	<b>80</b> 95.2%	<b>4</b> 4.8%	-	<b>84</b> 100%

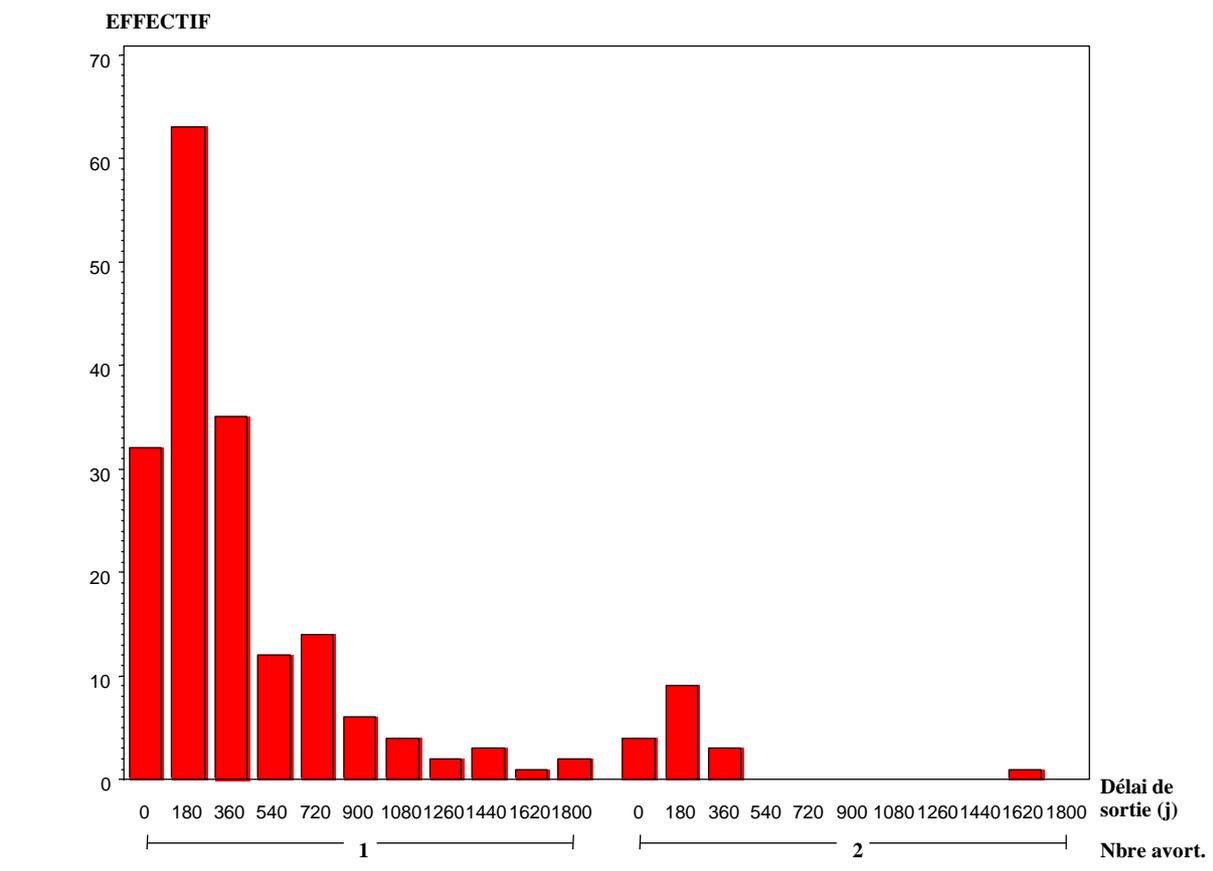
Il n'y a pas de différence significative entre les échantillons de vaches « avP » et « avN » concernant le fait d'avorter une seconde fois.

Par ailleurs, le délai entre le dernier avortement d'une vache et sa sortie de l'élevage a été calculé. Parmi les 316 vaches ayant avorté, 222 ont été réformées alors que 94 vaches ont été gardées sur les exploitations pendant la période d'observation.

Cependant certaines dates d'avortement n'étant pas connues précisément, seules 168 vaches ont été retenues parmi celles qui ont avorté une fois et 15 vaches parmi celles qui ont avorté deux fois ce qui représente un échantillon total de **183** vaches soit pratiquement 60% des vaches ayant avorté.

Tableau 29 : Description des délais entre l'avortement d'une vache et sa sortie de l'élevage selon qu'elle a avorté une ou deux fois.

	Effectif		Délai de sortie suite au dernier avortement (en jours)		
	Total	Fréquence (en %)	minimum	médiane	maximum
<b>Vaches ayant avorté une fois</b>	168	91	2	249	1866
<b>Vache ayant avorté deux fois</b>	15	9	27	221	1591
<b>Total</b>	<b>183</b>	<b>100</b>	-	-	-



**Figure 12** : Répartition des délais entre l’avortement d’une vache et sa sortie de l’élevage selon qu’elle a avorté une ou deux fois.

D’après la répartition des délais des vaches sortant de l’élevage après leur dernier avortement, on peut constater que plus de la moitié sont éliminées avant 365 jours c’est à dire dans l’année suivant leur avortement. Ces chiffres sont nettement vérifiés après le second avortement.

Si l’on réalise la même étude sur l’échantillon de vaches « avP » c’est à dire pour lesquelles le statut positif est connu avant l’avortement ou jusqu’à deux mois après, on se rend compte que le phénomène décrit précédemment est exacerbé. En effet, les bovins sortent en moyenne à 274 jours après leur premier avortement (contre 358 jours pour l’échantillon de vaches toutes confondues) et à 132 jours après leur second avortement.

Les éleveurs ont tendance à éliminer les vaches qui avortent, d’autant plus rapidement si elles sont séropositives. Il est donc difficile d’analyser dans ces conditions, la récurrence des avortements dus à *Neospora caninum*.

c) Stade de gestation au moment de l’avortement

Cette étude est réalisée sur les échantillons de vaches « avP » et « avN ».

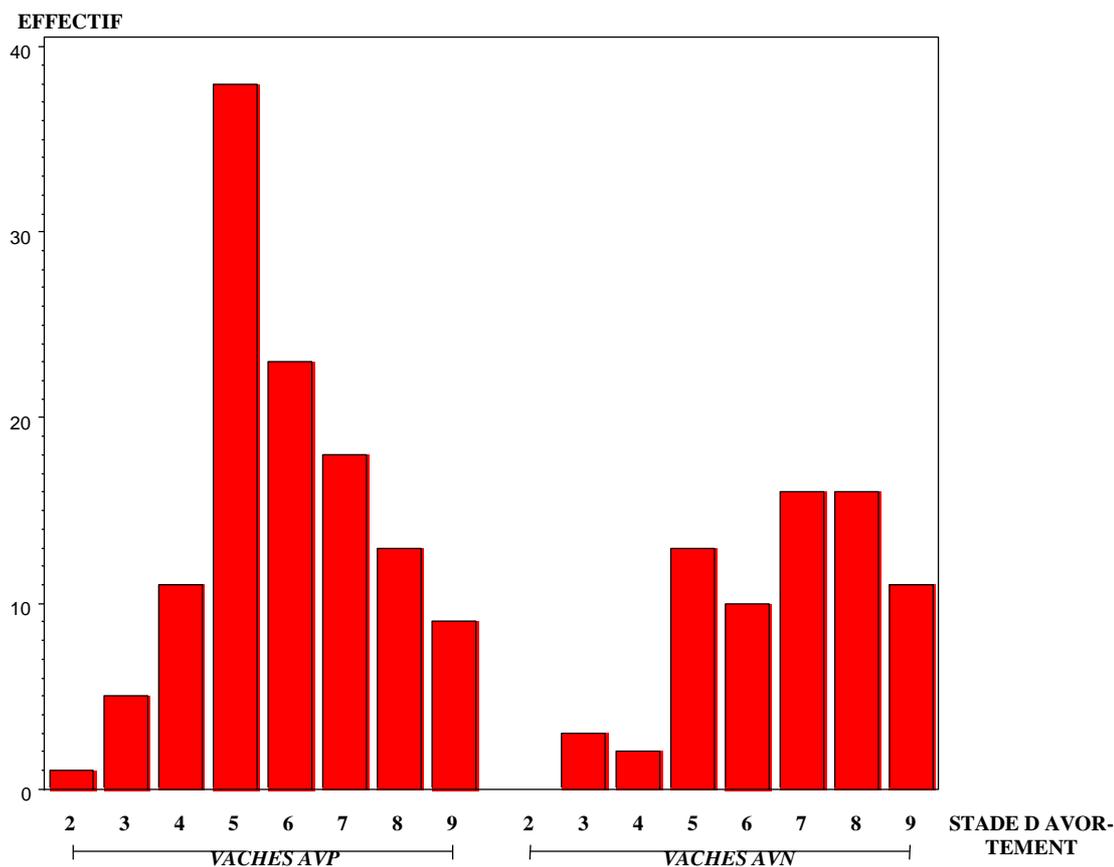
**Tableau 30** : Description du nombre de vaches ayant avorté en fonction de leur statut sérologique *Neospora caninum* et du stade de gestation au moment de l'avortement.

Stade de gestation	Effectif		
	avP	avN	Total
Inconnu	<b>25</b> 17.4%	<b>17</b> 19.3%	<b>42</b> 18.2%
< 3 mois	<b>1</b> 0.7%	<b>0</b> 0%	<b>1</b> 0.4%
3-4 mois	<b>5</b> 3.5%	<b>3</b> 3.4%	<b>8</b> 3.5%
4-5 mois	<b>11</b> 7.7%	<b>2</b> 2.3%	<b>13</b> 5.6%
5-6 mois	<b>38</b> 26.6%	<b>13</b> 14.8%	<b>51</b> 22.1%
6-7 mois	<b>23</b> 16.1%	<b>10</b> 11.3%	<b>33</b> 14.3%
7-8 mois	<b>18</b> 12.6%	<b>16</b> 18.2%	<b>34</b> 14.7%
8-9 mois	<b>13</b> 9.1%	<b>16</b> 18.2%	<b>29</b> 12.5%
> 9 mois	<b>9</b> 6.3%	<b>11</b> 12.5%	<b>20</b> 8.7%
<b>Total</b>	<b>143</b> 100%	<b>88</b> 100%	<b>231</b> 100%

La plupart des avortements associés à une séropositivité vis-à-vis de *Neospora caninum* semblent survenir entre les cinquième et septième mois de gestation.

Cependant il est fort probable que la plupart des avortements survenus avant le troisième mois ne sont pas déclarés. En effet, compte tenu de sa faible taille, l'avorton n'est généralement pas retrouvé par les éleveurs. De plus, si un contrôle de gestation n'est pas réalisé comme c'est le cas dans un bon nombre d'élevages, on ne sait pas si le retour en chaleur est dû à une non fécondation ou à une mortalité embryonnaire ou foetale précoce.

Par ailleurs, environ 18% des stades de gestation ne sont pas rapportés.



**Figure 13** : Répartition des stades de gestation au moment de l'avortement d'une vache selon son statut sérologique.

Concernant la répartition des stades d'avortements en fonction du statut sérologique, le pourcentage d'avortements est plus élevé entre le cinquième et septième mois pour les vaches séropositives alors qu'il restera élevé du cinquième au neuvième mois pour les vaches séronégatives.

Un pic d'avortement à 5 mois de gestation est observé chez les vaches séropositives qu'elles soient en élevage laitier ou allaitant (figures 14 et 15).

Les mêmes conclusions peuvent être tirées, quand on étudie les vaches de race Blonde d'Aquitaine et Prim'Holstein.

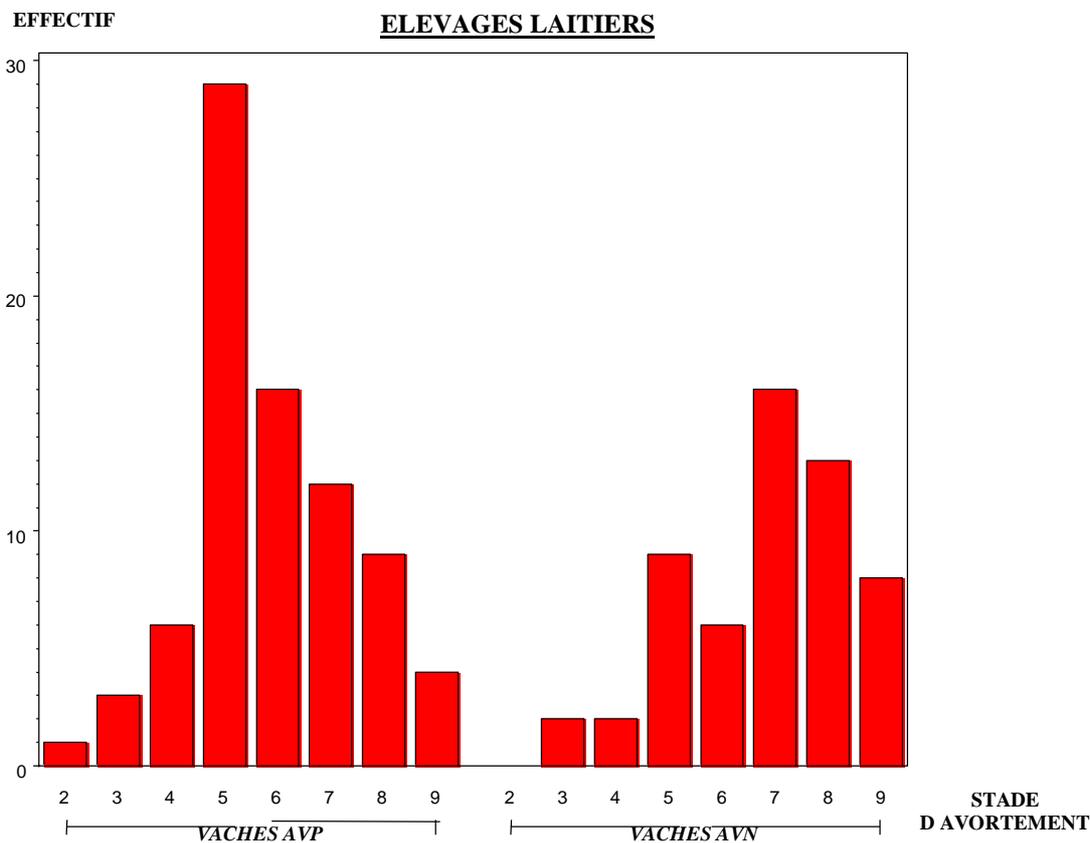


Figure 14 : Répartition des stades de gestation au moment de l'avortement d'une vache dans les élevages laitiers selon son statut sérologique.

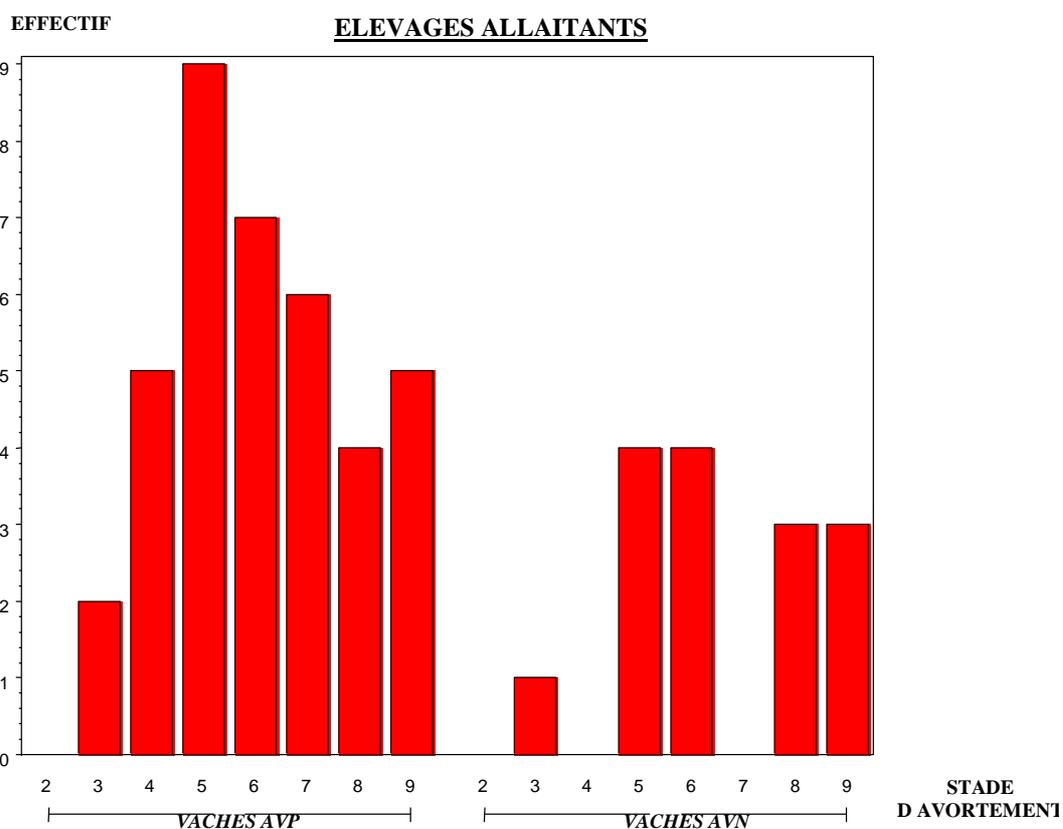


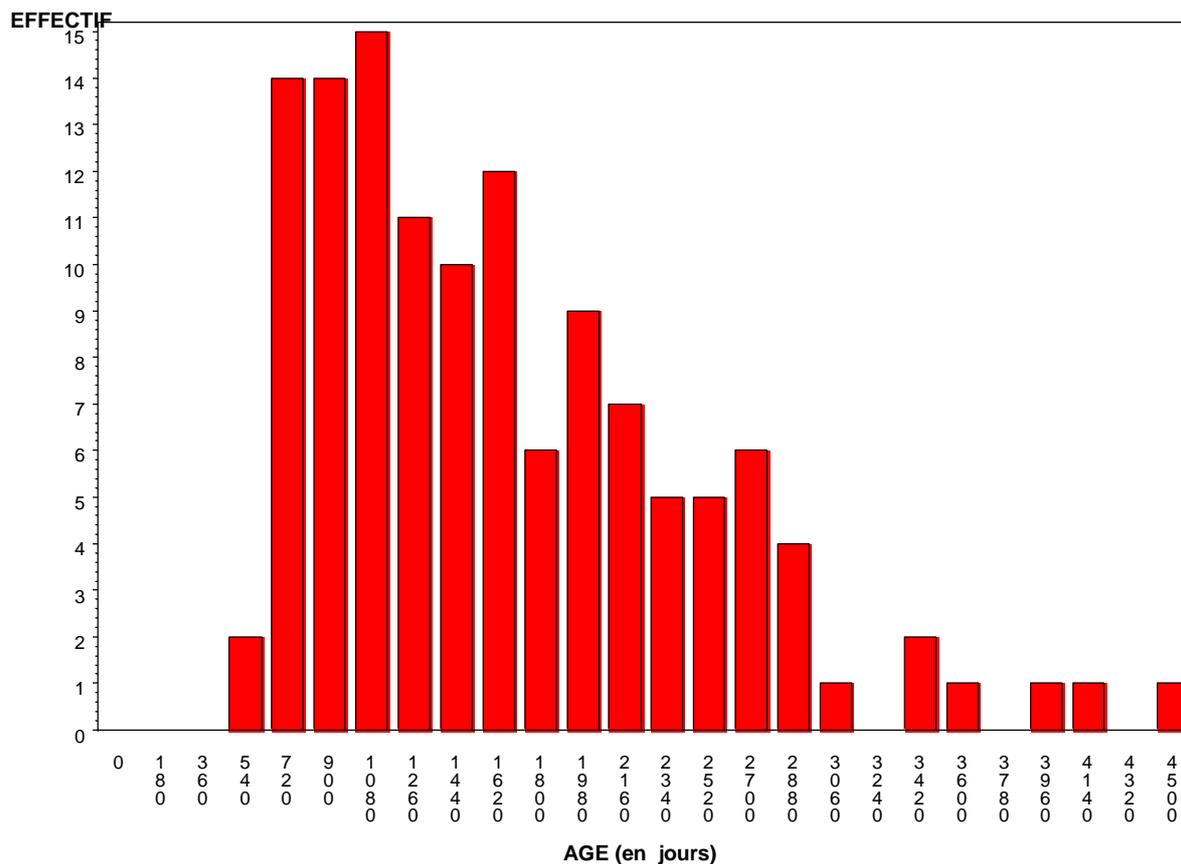
Figure 15 : Répartition des stades de gestation au moment de l'avortement d'une vache dans les élevages allaitants selon son statut sérologique.

d) Age moyen au premier avortement

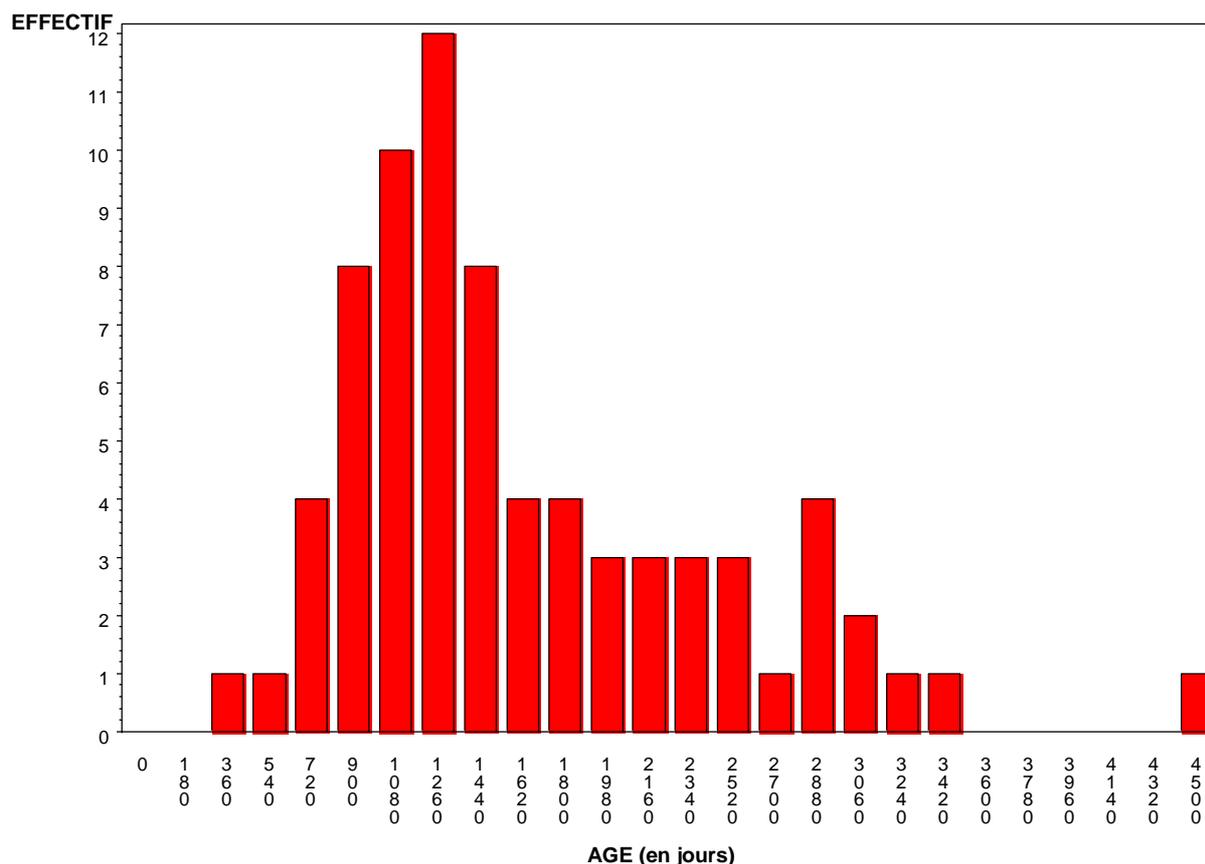
Afin d'évaluer l'impact de la néosporose bovine sur les avortements, l'âge moyen au premier avortement est calculé à partir des échantillons de vaches «avP» et «avN». Cependant les dates d'avortements n'étant pas toujours précisées, seules **200** vaches ont été sélectionnées.

**Tableau 31** : Description des âges des bovins lors de leur premier avortement en fonction de leur statut définitif.

	Effectif total	Age au 1 <sup>er</sup> avortement (en jours)		
		minimum	moyenne	maximum
Vaches «avP »	127	548	1650	4980
Vaches «avN »	73	447	1623	4623
<b>Total</b>	<b>200</b>	-	-	-



**Figure 16** : Distribution des âges au premier avortement chez les vaches testées positives à la néosporose bovine.



## *IV- Discussion*

### A- Population étudiée et représentativité des résultats

La population de bovins étudiés a été sélectionnée de manière rétrospective au sein d'élevages atteints de néosporose. Elle ne sera donc pas représentative de l'ensemble des bovins du département des Pyrénées-Atlantiques.

Afin d'analyser aux mieux les données recueillies et dans un souci de rigueur, nous nous sommes attardés à décrire au maximum les résultats obtenus. Par la suite, nous avons sélectionné des échantillons bien définis pour chaque paramètre étudié.

Enfin, certaines données ont été jugées insuffisantes pour permettre l'analyse des paramètres d'intérêt.

### B- Biais de l'analyse

L'étude étant rétrospective, différents types de biais sont apparus.

L'analyse des avortements est particulièrement délicate dans la mesure où ces derniers ne sont pas tous répertoriés. Ils peuvent passer inaperçus, notamment dans les élevages allaitants où les suivis de reproduction sont en général beaucoup moins rigoureux et précis qu'en élevage laitier.

Par ailleurs, même quand les avortements sont détectés par l'éleveur, ils ne sont pas toujours déclarés malgré le caractère obligatoire de la déclaration. Ainsi, d'après les données nationales, seulement 20% des avortements seraient déclarés. Dans notre étude, les éleveurs n'envoient pas toutes leurs déclarations d'avortements au GDS 64.

Ces éléments entraînent une **sous-estimation importante du nombre d'avortements**.

L'intervention de nombreux vétérinaires praticiens implique des différences de précision dans la rédaction des déclarations d'avortements. De plus, les formulaires ne sont pas toujours correctement remplis soit par négligence, soit par méconnaissance des dates de saillie ou d'insémination. C'est pourquoi, les stades de gestation doivent être considérés avec prudence, en particulier dans tous les élevages où un suivi de reproduction n'est pas réalisé.

Enfin, le changement de version concernant Chekit *Neospora* (IDEXX) ne semble pas, d'après le laboratoire BOMMELI, s'accompagner de modifications des qualités intrinsèques du test. On peut donc considérer ce biais comme négligeable.

## C- Etude des statuts sérologiques

### 1) Modification des statuts sérologiques au cours du temps

Même si seulement un tiers de la population étudiée a été testée plusieurs fois, les observations permettent de constater que les modifications des statuts sérologiques au cours du temps ne sont pas rares. En effet si l'on écarte le statut douteux, 10,5% des bovins testés au moins deux fois se séroconvertissent alors que 6,3% se séroconvertissent. L'analyse des résultats sérologiques des bovins testés au moins trois fois, démontre la possibilité de résultats discordants au cours d'une période donnée, pour les mêmes bovins.

Concernant les vaches qui se séroconvertissent, il serait intéressant de disposer des données relatives au stade physiologique des vaches lors du dépistage, afin d'en étudier l'influence sur la sérologie.

De plus, la proportion de vaches qui se séroconvertissent est probablement sous-estimée, compte tenu du principe général retenu dans la convention, de non prélèvement consécutif à un résultat positif.

Les causes des modifications des statuts sérologiques restent peu connues.

Les qualités intrinsèques du test utilisé peuvent être insuffisantes et conduire à des faux positifs ou faux négatifs. La sensibilité du test Chekit *Neospora* est plus élevée (97,1%) que la spécificité (95,1%).

Par ailleurs, les fluctuations des concentrations d'anticorps peuvent être inhérentes au stade physiologique et/ou pathologique des vaches au moment du prélèvement. À certaines périodes critiques, les concentrations d'anticorps diminueraient et passeraient ainsi en dessous du seuil de détection.

D'autres études ont pu mettre en évidence un changement de statut au sein de la population de vaches atteintes de néosporose. Lors d'observations réalisées sur des bovins ayant avorté dans le département de l'Orne, 43% des vaches testées positives se séroconvertissent deux mois plus tard. Ce chiffre élevé ne semble pas lié à une mauvaise qualité du réactif ELISA qui, dans cette expérience a montré une bonne répétabilité (Klein *et al.*, 2000).

Ces résultats sont nettement plus élevés que dans notre étude (6,3%), ce qui peut s'expliquer :

- par la différence de délais séparant les deux séries de sérologies (2 mois contre un an en moyenne pour notre étude)
- mais aussi par les tests utilisés différents,
- par l'absence en principe de nouveau prélèvement suite à un premier résultat positif.

## 2) Etude de la séroprévalence

### a) Séroprévalence individuelle globale

La séroprévalence individuelle globale se situe entre **34.2% et 34.8%** selon que l'on considère ou non les bovins de statut « douteux ».

Dans une étude menée sur 35 élevages contaminés du Morbihan, la prévalence individuelle était de 30%, ce qui est très proche de nos résultats (Joly, 2000).

Par ailleurs, si l'on considère les bovins de race Blonde d'Aquitaine ou les bovins appartenant à un élevage allaitant, la séroprévalence individuelle globale s'avère plus élevée (**40.8%**) que celle calculée chez les bovins de race Prim'Holstein ou appartenant à un élevage laitier (**31.3%**).

Ces observations sont en contradiction avec plusieurs publications établies dans différents pays. En Espagne, la séroprévalence obtenue dans les élevages laitiers est de 35.9% contre 17.9% dans les élevages allaitants (Anderson *et al.*, 2000). En France, l'étude menée sur les avortements des bovins normands et charolais, indique une séroprévalence de 26% dans l'Orne, département au profil essentiellement laitier, contre 14% en Saône-et-Loire, département où la majorité des cheptels sont de type allaitant (Klein *et al.*, 1997).

Nous avons décidé de ne pas étudier la prévalence individuelle des bovins ayant avorté sur les 42 élevages, considérant qu'il fallait analyser un échantillon de vaches possédant un même nombre de lactations sur une même période pour avoir des résultats interprétables.

### b) Séroprévalence par troupeau

Il existe une grande variabilité de séropositivité entre les 42 élevages étudiés qui va de **8.9% à 85.7 %**. La même étude menée en France dans le département du Morbihan donne une variabilité comprise entre 2 et 63% sur 35 élevages contaminés (Joly, 2000). Par ailleurs, la prévalence obtenue au Québec à partir de l'analyse de 23 troupeaux, varie de 4.3 à 61.8% (Bergeron *et al.*, 2000).

Pour deux tiers des troupeaux, la séropositivité est inférieure à 50%. Même si la néosporose semble atteindre certains élevages de manière importante, elle ne concerne généralement qu'une partie du troupeau.

Une explication peut être émise à partir du mode de contamination du parasite. Tant que la transmission reste verticale au sein du troupeau, seules certaines lignées de bovins sont atteintes et la prévalence restera faible ou moyenne. Mais dès que la transmission devient horizontale, une plus grande partie du cheptel peut être infectée et la prévalence augmentera en conséquence. Une voie de contamination horizontale majoritaire, expliquerait une prévalence supérieure à 50% dans moins d'un tiers des troupeaux.

## D- Etude de la transmission verticale

Vingt cinq mères de statut positif à la néosporose ont donné naissance à 1 fille négative et 24 filles positives. La transmission verticale est donc efficace à **94.3%**.

Ces résultats sont proches de ceux obtenus précédemment. L'analyse des produits de 15 vaches testées positives a conduit à 93% d'efficacité de la transmission verticale (Schares *et al.*, 1998). Une efficacité de 81% a été observée à partir de l'analyse des produits de 115 vaches testées positives (Paré *et al.*, 1996).

Ces résultats confirment que la transmission de type verticale joue un rôle prépondérant dans la pérennisation du parasite au sein des lignées de vaches.

## E- Etude des avortements

### 1) Risque d'avorter

L'incidence globale des avortements est de **2.65** avortements pour 100 gestations, que l'on considère les élevages de type laitier ou allaitant. Toutefois, ces résultats sont certainement sous-estimés compte tenu du biais important concernant les déclarations d'avortements.

Les vaches infectées par *Neospora caninum* ont **4.5** fois plus de risque d'avorter que des vaches indemnes.

Ce résultat se rapproche de ceux établis dans des études menées en France et à l'étranger. Dans le Morbihan, 14.8% des vaches séropositives avortent contre 4.3% des vaches séronégatives (Joly, 2000). En Angleterre et au Pays de Galles, les vaches séropositives (n= 633) ont 3.5 fois plus de risque d'avorter que les vaches séronégatives (n=418) (Davison *et al.*, 1999).

Par ailleurs, les vaches séropositives appartenant aux élevages allaitants ont **6.8** fois plus de risque d'avorter que des vaches séronégatives, ce qui est plus élevé que dans les élevages laitiers.

Il aurait été intéressant d'évaluer le risque pour des génisses infectées congénitalement d'avorter lors de leur première gestation, mais les données disponibles n'étaient pas suffisantes.

### 2) Récurrence des avortements chez les vaches infectées

Les résultats obtenus ne sont pas significatifs et il est difficile de conclure sur un risque accru de récurrence d'avortement pour les vaches positives à *Neospora caninum* comparés aux vaches négatives. Le plan de lutte néosporose conseille aux éleveurs d'éliminer les vaches séropositives, ce phénomène étant souvent accéléré suite à un avortement.

Par ailleurs, l'analyse des délais de sortie des vaches après leur premier avortement démontre qu'elles sont réformées dans l'année qui suit l'avortement. Ce phénomène est très net chez les vaches dont le statut positif est connu autour de l'avortement, et chez les vaches avortant une seconde fois.

Il est donc difficile dans ces conditions d'évaluer l'impact du parasite sur une récurrence d'avortement et seul un protocole spécifiquement établi pour cet objectif pourrait apporter des informations.

### 3) Etude du stade de gestation au moment de l'avortement

Le stade de gestation auquel survient l'avortement est différent selon que les animaux sont positifs ou négatifs vis-à-vis de la néosporose. Ainsi la fréquence des avortements est maximale entre le **5ème et 7ème mois** de gestation dans l'échantillon de vaches positives, alors qu'elle reste élevée jusqu'à neuf mois dans l'échantillon de vaches négatives.

Il ne semble pas y avoir de différence sur le stade de gestation selon que l'on considère les élevages de type laitier ou allaitant.

Ces résultats sont proches de ceux obtenus dans d'autres pays. En Californie, les avortements dus à *Neospora caninum* sont plus nombreux entre le cinquième et le sixième mois de gestation (Anderson *et al.*, 1991). De même en France, 85% des vaches séropositives avortent entre 5 et 8 mois, cette période étant généralement plus précoce que chez les vaches séronégatives (Foulon, 2002).

Pourtant la fiabilité de ces observations reste relative. En effet chez peu d'éleveurs, les stades de gestation sont précisément connus. Quant aux veaux expulsés momifiés, on ne sait pas à quel stade précis ils sont réellement morts, ce qui peut fausser les dates d'avortements « réelles ».

Ces résultats, même s'ils se rapprochent de ceux obtenus dans des études préalables, doivent être interprétés avec précaution. Seule une expérimentation sur des vaches dont les dates de saillie ou d'insémination ainsi que les dates précises d'avortement sont connues et pour lesquelles un suivi échographique a été réalisé, peut conduire à des résultats objectifs.

### 4) Etude de l'âge moyen au premier avortement

L'âge moyen au premier avortement diffère peu que les vaches soient séropositives ou séronégatives vis-à-vis de *Neospora caninum*. Or Thurmond et ses collaborateurs constatent qu'une vache infectée a plus de risques d'avorter dès sa première gestation qu'une vache saine (Thurmond, 1997a).

Par contre, l'âge moyen au premier avortement (4 ans et 4 mois et demi) concerne plutôt les premières gestations.

Les différences d'âges observées lors du premier avortement entre vaches laitières et allaitantes peuvent être attribuées aux différences d'âge de mise à la reproduction.

# Conclusions

La néosporose bovine est une maladie connue depuis peu d'années. Son rôle dans les avortements des bovins est de mieux en mieux évalué. Cependant, de nombreux points concernant le cycle évolutif de *Neospora caninum*, son mode de transmission ou ses conséquences cliniques et les pertes financières associées doivent être approfondis.

Notre étude a porté sur l'analyse rétrospective de 42 élevages bovins des Pyrénées-Atlantiques atteints de néosporose.

Les modifications de statut sérologique des bovins dépistés ne sont pas rares au sein des troupeaux contaminés. Elles peuvent être inhérentes aux qualités intrinsèques du test de dépistage et/ou à l'état physiologique ou pathologique de l'animal au moment du prélèvement et/ou aux fluctuations naturelles des concentrations en anticorps spécifiques.

La prévalence individuelle globale reste moyenne (34,2%). Elle semble plus élevée dans les élevages de type allaitant (40,8%). La prévalence par troupeau est très variable, ce qui peut être mis en relation avec les deux modes de contamination du parasite, vertical ou horizontal.

Une vache séropositive a 4,5 fois plus de risque d'avorter qu'une vache séronégative. Ce risque semble accru pour une vache allaitante comparé à une vache laitière.

Le risque de récurrence de l'avortement n'a pu être déterminé. Les vaches qui avortent sont pour la plupart sorties de l'exploitation dans l'année qui suit. Les mesures prophylactiques proposées aux éleveurs ont pour objectif d'éliminer les vaches de statut sérologique positif ainsi que leurs produits, sachant que la transmission de type vertical est très élevée (94,3%). En complément doivent être prises des mesures de prévention d'une contamination horizontale (collecter et brûler les placentas, éviter l'accès des chiens aux stocks et aires d'alimentation).

Les stades de gestation au moment de l'avortement sont différents selon que les vaches sont séropositives ou séronégatives vis-à-vis de *Neospora caninum*. Le maximum d'avortements se situe entre le 5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> mois pour les vaches séropositives, alors que la fréquence d'avortements reste élevée jusqu'au neuvième mois pour les vaches séronégatives. Ces résultats sont à considérer avec précaution compte tenu du mode de recueil des données.

Enfin lors du premier avortement, il ne semble pas y avoir de différence d'âge selon le statut sérologique. Les avortements se situent plutôt en première gestation quel que soit le statut sérologique vis-à-vis de *Neospora caninum*.

La collecte de données concernant le statut physiologique des bovins inclus devraient permettre d'approfondir les résultats obtenus. Ainsi, la prévalence individuelle des vaches ayant avorté, la relation entre les modifications de statut sérologique et le stade physiologique des vaches au moment du prélèvement, pourront être évalués.

# *ANNEXES*

**Annexe 1 : Convention de lutte passée entre les éleveurs, leur vétérinaire et le GDS 64.**

## Annexe 2 : Caractéristiques des élevages étudiés.

N° élevage	Type production	Année de dépistage	Série de sérologies	Intervalles entre sérologies	Nombre de Bv total*	Nombre de Bv testés
<b>1</b>	Laitier	09/05/01	2	13 mois	60	43
<b>2</b>	Laitier	18/05/02	2	28 mois	113	53
<b>3</b>	Laitier	18/06/01	2	17 mois	109	51
<b>4</b>	Laitier	11/10/02	1	-	105	22
<b>5</b>	Allaitant	21/01/03	1	-	68	65
<b>6</b>	Laitier	17/07/01	2	28 mois	265	78
<b>7</b>	Laitier	03/08/01	2	41 mois	90	57
<b>8</b>	Allaitant	14/02/00	2	20 mois	92	68
<b>9</b>	Laitier	30/09/03	1	-	140	72
<b>10</b>	Laitier	21/05/01	2	13 mois	123	72
<b>11</b>	Laitier	24/07/02	2	27 mois	93	82
<b>12</b>	Laitier	06/06/00	2	16 mois	76	44
<b>13</b>	Laitier	01/08/03	2	16 mois	89	46
<b>14</b>	Allaitant	25/01/02	1	-	79	50
<b>15</b>	Laitier	14/10/02	1	-	58	38
<b>16</b>	Allaitant	10/11/03	1	-	132	43
<b>17</b>	Mixte	08/01/02	2	24 mois	85	66
<b>18</b>	Allaitant	22/04/03	2	12 mois	150	62
<b>19</b>	Allaitant	21/02/02	2	24 mois	206	160
<b>20</b>	Allaitant	24/10/03	2	12 mois	135	58
<b>21</b>	Laitier	30/07/04	1	-	85	58
<b>22</b>	Laitier	16/06/00	2	23 mois	171	86
<b>23</b>	Laitier	30/09/99	2	22 mois	158	79
<b>24</b>	Laitier	03/01/01	1	-	83	32
<b>25</b>	Laitier	09/07/01	2	12 mois	117	88
<b>26</b>	Laitier	14/12/01	2	17 mois	147	99
<b>27</b>	Allaitant	04/05/00	3	23-11 mois	196	125
<b>28</b>	Allaitant	24/08/01	1	-	321	87
<b>29</b>	Laitier	10/01/01	2	23 mois	110	66
<b>30</b>	Laitier	12/09/01	2	26 mois	126	79
<b>31</b>	Laitier	09/05/03	2	20 mois	84	53
<b>32</b>	Laitier	08/12/00	2	15 mois	153	75
<b>33</b>	Laitier	24/10/00	1	-	79	48
<b>34</b>	Allaitant	10/02/03	2	18 mois	42	33
<b>35</b>	Allaitant	12/03/04	2	8 mois	110	60
<b>36</b>	Laitier	07/12/02	2	23 mois	88	70
<b>37</b>	Allaitant	17/01/02	2	8 mois	209	70
<b>38</b>	Allaitant	14/05/01	3	7-23 mois	114	90
<b>39</b>	Laitier	07/01/03	2	27 mois	121	56
<b>40</b>	Laitier	02/07/02	2	19 mois	55	46
<b>41</b>	Laitier	13/01/03	2	14 mois	49	42
<b>42</b>	Allaitant	07/05/01	2	24 mois	42	28

\* : sur la période d'observation

### **Annexe 3 : Protocole d'utilisation, lecture et interprétation du test Chekit Neospora (ELISA indirect) commercialisé par IDEXX (version 0).**

#### **Protocole :**

Les instructions à suivre sont les suivantes :

- Equilibrer à leur température optimale le nombre de microplaques et les quantités adéquates de réactifs que l'on désire utiliser.
- Préparer le volume nécessaire de solution de lavage et de dilution à partir du liquide CHEKIT-10x-concentré. Cette solution doit être fraîchement préparée avant chaque utilisation.
  
- Diluer 90µl de solution de dilution d'échantillons CHEKIT-NEOSPORA dans chaque cupule prévue pour les échantillons et les contrôles.
- Ajouter 10µl d'échantillon ou de contrôle dans les cupules respectives afin d'obtenir une dilution finale de 1 :10.
- Agiter brièvement la microplaque pour homogénéiser les échantillons.
- Couvrir la microplaque et incuber pendant 60 minutes (+/- 5 minutes) en chambre humide à 37°C (+/- 2°C).
  
- Après l'incubation, la microplaque est lavée trois fois avec la solution de lavage et de dilution CHEKIT.
- Distribuer 100µl de conjugué CHEKIT-NEOSPORA-Anti-Ig-Ruminant prêt à l'emploi, **non dilué**, dans chaque cupule.
- Couvrir la microplaque et incuber pendant 60 minutes (+/- 5 minutes) en chambre humide à 37°C (+/- 2°C).
- Après l'incubation, la microplaque est lavée trois fois avec la solution de lavage et de dilution CHEKIT.
  
- Distribuer dans chaque cupule 100µl de solution de substrat CHEKIT-TMB, prêt à l'emploi, préalablement équilibré à température ambiante (entre +18°C et +25°C). Incuber à température ambiante (entre +18°C et +25°C) durant 15 minutes (+/- 5 minutes).
- Ajouter dans chaque cupules 100µl de solution d'arrêt CHEKIT-TMB préalablement équilibré à température ambiante. La distribution de la solution d'arrêt CHEKIT devrait se faire dans le même ordre et à la même vitesse que la distribution du substrat CHEKIT-TMB.

#### **Lecture des résultats :**

L'ajout de la solution d'arrêt CHEKIT dans les cupules conduit à un changement de couleur du substrat de bleu à jaune.

Les résultats des réactions colorimétriques sont lus sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de **450 nm**.

Pour la validation de la manipulation, la densité optique (DO) du témoin négatif ne devrait pas dépasser 0.5. La DO du témoin positif ne devrait pas dépasser 2.0. La différence entre la DO du témoin positif et négatif doit être supérieur ou égal à 0.3.

La mesure de la densité optique doit impérativement être effectuée dans les 2 heures après arrêt de la réaction.

### **Interprétation des résultats :**

Si les échantillons et/ou les témoins sont testés en double, il faut calculer la moyenne des valeurs des densités optiques.

Les valeurs de densité optique des échantillons et du contrôle positif sont corrigés par soustraction de la valeur moyenne de densité optique du contrôle négatif. Puis les valeurs corrigées des échantillons sont exprimés en pourcentage de la valeur corrigée du contrôle positif (fixée à 100%). Enfin, l'interprétation se fait indépendamment du type d'échantillon tel que :

<b>Valeur de l'échantillon</b>	<b>&lt; 40%</b>	<b>40-50%</b>	<b>50-80%</b>	<b>&gt; 80%</b>
<b>Interprétation</b>	négatif	douteux	faiblement positif	fortement positif

# Bibliographie

- AMMANN P., WALDVOGEL A., BREYER I., ESPOSITO M., MULLER N., GOTTSTEIN B.**  
The role of B- and T-cell immunity on toltrazuril-treated C57BL/6WT, microMT and nude mice experimentally infected with *Neospora caninum*.  
*Parasitol. Res.*, 2004, **93**, 3, 178-187.
- ANDERSON M.L., ANDRIANARIVO A.G., CONRAD P.A.**  
Neosporosis in cattle.  
*Anim. Reprod. Sci.*, 2000, **60-61**, 417-431.
- ANDERSON M.L., BARR B.C., CONRAD P.**  
Protozoal causes of reproductive failure in domestics ruminants.  
*Vet. Clin. North Am. : Food Anim. Pract.*, 1994, **10**, 3, 439-461.
- ANDERSON M.L., BLANCHARD P.C., BARR B.C., DUBEY J.P., HOFFMAN R.L., CONRAD P.A.**  
*Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle.  
*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1991, **198**, 2, 241-244.
- ANDERSON M.L., PALMER CH.W., THURMOND M.C., PICANSON J.P., BLANCHARD P.C., BREITMEYER R.E., LAYTON A.W., MCALLISTER M., DAFT B., KINDE H., READ D.H., DUBEY J.P., CONRAD P., BARR B.C.**  
Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California.  
*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1995, **207**, 9, 1206-1210.
- ANDERSON M.L., REYNOLDS J.P., ROWE J.D., SVERLOW K.W., PACKHAM A.E., BARR B.C., CONRAD P.A.**  
Evidence of vertical transmission of *Neospora sp.* infection in dairy cattle.  
*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1997, **210**, 8, 1169-1172.
- ATKINSON R., HARPER P.A.W., REICHEL M.P., ELLIS J.T.**  
Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle.  
*Parasitol. Today*, 2000, **16**, 3, 110-114.
- BAILLARGEON P. FECTEAU G., PARE J., LAMOTHE P., SAUVE R.**  
Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle.  
*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 2001, **218**, 11, 1803-1806.
- BARBER J.S.**  
Néosporose canine.  
*Waltham Focus*, 1998, **8**, 1, 25-29.
- BARLING K.S., MCNEILL J.W., THOMPSON J.A., PASCHAL J.C., MCCOLLUM F.T., CRAIG T.M., ADAMS L.G.,**  
Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves.  
*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 2000, **217**, 9, 1356-1360.
- BARTELS C.J.M., WOUDA W., SCHUKKEN Y.H.**  
Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997).  
*Theriogenology*, 1999, **52**, 247-257.

- BARTLEY P.M., KIRVAR E., WRIGHT S., SWALES C., ESTEBAN I., BUXTON D., MALEY, S.W., SCHOCK A., RAE A.G., HAMILTON C., INNES E.A.**  
Maternal and fetal immune response of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation.  
*J. Comp. Pathol.*, 2004, **130**, 81-91.
- BERGERON N, FECTEAU G., PARE J., MARTINEAU R., VILLENEUVE A.**  
Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec.  
*Can. Vet. J.*, 2000, **41**, 464-467.
- BJERKAS I., MOHN S.F., PRESTHUS J.**  
Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs.  
*Z. Parasit.*, 1984, **70**, 271-274.
- BJÖRKMAN C., HOLMDAHL O.J.M., UGGLA A.**  
An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle.  
*Vet. Parasitol.*, 1997, **68**, 251-260.
- BJÖRKMAN C., JOHANSSON O., STENLUND S., HOLMDAHL O.J.M., UGGLA A.**  
*Neospora* species infection in a herd of dairy cattle.  
*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1996, **208**, 9, 1441-1444.
- BJÖRKMAN C., MILTON M., MCALLISTER, FRÖSSLING J., NÄSLUND K., LEUNG F., UGGLA A.**  
Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle.  
*J. Vet. Diagn. Invest.*, 2003, **15**, 3-7.
- BJÖRKMAN C., UGGLA A.**  
Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection.  
*Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 10, 1497-1507.
- BOUVERET M.**  
Approche séro-épidémiologique des avortements à *Neospora caninum* chez les bovins dans le département du Jura.  
Th. : Med.vet. : Lyon : 2004-Université Claude Bernard LYON 1, 217.
- BRYAN L.A., GAJADHAR A.A., DUBEY J.P., HAINES D.M.**  
Bovine neonatal encephalomyelitis associated with *Neospora sp* protozoan.  
*Can Vet. J.*, 1994, **35**, 111-113.
- BUXTON D., McALLISTER M.M., DUBEY J.P.**  
The comparative pathogenesis of neosporosis.  
*Trends Parasitol.*, 2002, **18**, 12, 546-552.
- CAETANO-DA-SILVA A., FERRE I, COLLANTES-FERNANDEZ E., NAVARRO V., ADURIZ G., URGATE-GARAGALZA C., ORTEGA-MORA L.M.**  
Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls.  
*Theriogenology*, 2004, **62**, 7, 1329-1336.
- CHARTIER C., BAUDRY C., LOSSON B., DE MEERSCHMAN F., ROMAND S., THULLIEZ P.**  
La néosporose chez la chèvre : résultats de deux enquêtes sérologiques dans l'ouest de la France.  
*Le Point Vétérinaire*, 2000, **31**, 209, 65-69.
- CHERMETTE R., MARQUER A.**  
*Neospora caninum* : un nouveau parasite ?  
*Le Point vétérinaire*, 2000, **31**, 208, 9-14.
- CHI J., VANLEEUEWEN J.A., WEERSINK A., KEEFE G.P.**  
Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*.

*Prev. Vet. Med.*, 2002, **55**, 137-153.

**COLE RA., LINDSAY DS., DUBEY JP., BLAGBURN BL.**

Detection of *Neospora caninum* in tissue sections using a murine monoclonal antibody.

*J. Vet. Diagn. Invest.*, 1993, **5**, 579-584.

**COTASSON S.**

*Neospora caninum* chez les bovins : enquête sérologique chez les bovins ayant avorté dans le sud-Ouest.

Th. : Med. vet. : Toulouse : 2000– Université Paul Sabatier, 45.

**CRAMER G., KELTON D., DUFFIELD T.F., HOBSON J.C., LISSEMORE K., HIETALA S.K., PEREGRINE A.S.**

*Neospora caninum* serostatus and culling of Holstein cattle.

*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 2002, **221**, 8, 1165-1168.

**DAVISON H.C., GUY C.S., MCGARRY J.W., GUY S., WILLIAMS D.J.L., KELLY D.F., TREES A.J.**

Experimental studies of the transmission of *Neospora caninum* between cattle.

*Res. Vet. Sci.*, 2001, **70**, 163-168.

**DAVISON H.C., OTTER A., TREES A.J.**

Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle.

*Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1189-1194.

**DE MAREZ T., LIDDELL S., DUBEY J.P., JENKINS M.C., GASBARRE L.**

Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs : humoral and cellular immune responses.

*Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1647-1657.

**DE MELO C.B., LEITE R.C., LOBATO Z.I.P.**

Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil.

*Vet. Parasitol.*, 2004, **119**, 97-105.

**DIJKSTRA TH., BARKEMA H.W., EYSKER M., HESSELINK J.W., WOUDA W.**

Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle.

*Vet. Parasitol.*, 2002a, **105**, 99-104.

**DIJKSTRA TH., BARKEMA H.W., HESSELINK J.W., WOUDA W.**

Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog.

*Vet. Parasitol.*, 2002b, **105**, 89-98.

**DUBEY J.P.**

Neosporosis-the first decade of research

*Int. J. Parasitol.*, 1999a, **29**, 1485-1488.

**DUBEY J.P.**

Recent advances in *Neospora* and neosporosis.

*Vet. Parasitol.*, 1999b, **84**, 349-367.

**DUBEY J.P.**

Neosporosis in cattle : biology and economic impact.

*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1999c, **214**, 8, 1160-1163.

**DUBEY J.P., BARR B.C., BARTA J.R., BJERKAS I., BJÖRKMAN C., BLAGBURN B.L., BOWMAN D.D., BUXTON D., ELLIS J.T., GOTTSTEIN B., HEMPHILL A., HILL D.E., HOWE D.K., JENKINS M.C., KOBAYASHI Y., KOUDELA B., MARSH A.E., MATTSSON J.G., MCALLISTER M.M., MODRY D., OMATA Y., SIBLEY L.D., SPEER C.A., TREES A.J., UGGLA A., UPTON S.J., WILLIAMS D.J.L., LINDSAY D.S.**

Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian.

*Int. J. Parasitol.*, 2002, **32**, 8, 929-946.

**DUBEY J.P., CARPENTER J.L., SPEER C.A., TOPPER M.J., UGGLA A.**

Newly recognized fatal protozoan disease of dogs.

*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1988, **192**, 9, 1269-1285.

**DUBEY J.P., HARTLEY W.J., LINDSAY D.S.**

Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly.

*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1990a, **197**, 8, 1043-1044.

**DUBEY J.P., KOESTNER A., PIPER R.C.**

Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs.

*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1990b, **197**, 857-860.

**DUBEY J.P., LINDSAY D.S.**

A review of *Neospora caninum* and neosporosis.

*Vet. Parasitol.*, 1996, **67**, 1-59.

**DUBEY J.P., LINDSAY D.S., LIPSCOMB T.P.**

Neosporosis in cats.

*Vet. Pathol.*, 1990c, **27**, 335-339.

**ELLIS J.T.**

Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.

*Int. J. Parasitol.*, 1998, **28**, 7, 1053-1060.

**FOULON G.**

Étude de la prévalence de la néosporose dans les avortements bovins du département du Rhône.

Th. : Med vet : Lyon : 2002 –Université Claude Bernard- Lyon 1, 112.

**FRÖSSLING J., BONNETT B., LINDBERG A., BJÖRKMAN C.**

Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard.

*Prev. Vet. Med.*, 2003, **57**, 141-153.

**GONDIM L.F.P., MAC ALLISTER M.M., PITT W.C., ZEMLICKA D.E.**

Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*.

*Int. J. Parasitol.*, 2004, **34**, 159-161.

**GRAHAM D.A., CALVERT V., WHYTE M., MARKS J.**

Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection.

*Vet. Rec.*, 1999, **144**, 672-673.

**GUILLOT J., ESCRIOU C., FRITZ D.**

La néosporose canine.

*Le Point Vétérinaire*, 2000, **31**, 208, 29-35.

**HEMPHILL A.**

The host-parasite relationship in neosporosis.

*Adv. Parasitol.*, 1999, **43**, 47-104.

**HEMPHILL A., FUCHS N., SONDA S., HEHL A.**

The antigenic composition of *Neospora caninum*.

*Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1175-1188.

**HEMPHILL A., GOTTSTEIN B.**

An European perspective on *Neospora caninum*.

*Int. J. Parasitol.*, 2000, **30**, 8, 877-924.

**HOBSON J.C., DUFFIELD T.F., KELTON D., LISSEMORE K., HIETALA S.K.,**

**LESLIE K.E., MCEWEN B., CRAMER G., PEREGRINE A.S.**

*Neospora caninum* serostatut and milk production of Holstein cattle.

*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 2002, **221**, 8, 1160-1164.

**INNES E.A., ANDRIANARIVO A.G., BJÖRKMAN C., WILLIAMS D.J.L., CONRAD P.A.**

Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination.  
*Trends Parasitol.*, 2002, **18**, 11, 497-504.

**INNES E.A., BUXTON D., MALEY S., WRIGHT S., MARKS J., ESTEBAN I., RAE A., SCHOCK A., WASTLING J.**

Neosporosis : Aspects of epidemiology and host immune response  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, **916**, 93-101.

**JENKINS M., BASZLER T., BJÖRKMAN C., SCHARES G., WILLIAM D.**

Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion.  
*Int. J. Parasitol.*, 2002, **32**, 5, 631-636.

**JOLY A.**

Néosporose bovine : observation dans 162 élevages et suivi de 35 élevages contaminés.  
*Bull. GTV.*, 2000, **7**, 115-120.

**JOURNEL C., PITEL P.H.**

Diagnostic de la néosporose en élevage bovin.  
*Le Point Vétérinaire*, 2001a, **213**, 42-43.

**JOURNEL C., PITEL P-H.**

La lutte contre la néosporose en élevage bovin.  
*Le Point Vétérinaire*, 2001b, **214**, 38-39.

**KIM J.T., PARK J.Y., SEO H.S., OH H.G., NOH J.W., KIM J.H., KIM D.Y., YOUN H.J.**

In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*.  
*Vet. Parasitol.*, 2002, **103**, 53-63.

**KLEIN F., OULD AMROUCHE A., OSDOIT C., TOURATIER A., SANAA M.**  
*Neospora caninum* : une enquête séroépidémiologique dans l'Orne.

*Bull. GTV.*, 2000, **7**, 121-125.

**KLEIN F., HIETALA S.K., BERTHET H., VERY P., GRADINARU D.**

*Neospora caninum* : enquête sérologique sur les avortements des bovins normands et charolais.

*Le Point Vétérinaire*, 1997, **28**, 183, 65-68.

**KRAMER L., DE RISO L., TRANQUILLO V.M., MAGNINO S., GENCHI C.**

Analysis of risk factors associated with seropositivity to *Neospora caninum* in dogs.  
*Vet. Rec.*, 2004, **154**, 22, 692-693.

**KWON H.J., KIM J.H., KIM M., LEE J.K., HWANG W.S., KIM D.Y.**

Anti-parasitic activity of depudecin on *Neospora caninum* via the inhibition of histone deacetylase.

*Vet. Parasitol.*, 2003, **112**, 269-276.

**LARSON R.L., HARDIN K.D., PIERCE V.L.**

Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle.  
*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 2004, **224**, 10, 1597-1604.

**LINDSAY D.S., DUBEY J.P.**

Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections.  
*Am. J. Vet. Res.*, 1989, **50**, 11, 1981-1983.

**LINDSAY D.S., DUBEY J.P., DUNCAN R.B.**

Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*.  
*Vet. Parasitol.*, 1999a, **82**, 4, 327-333.

**LINDSAY D.S., RIPPEY N.S., POWE T.A., SARTIN E.A., DUBEY J.P., BLAGBURN B.L.**

Abortions, fetal death and stillbirths in pregnant pigmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*.

*Am. J. Vet. Res.*, 1995, **56**, 1176-1180.

**LINDSAY D.S., UPTON S.J., DUBEY J.P.**

A structural study of the *Neospora caninum* oocyst.

*Int. J. Parasitol.*, 1999b, **29**, 10, 1521-1523.

**LOSSON B., BOURDOISEAU G.**

*Neospora caninum* : un nouvel agent abortif chez les bovins.

*Bull. GTV.*, 2000, **7**, 107-114.

**MACALDOWIE C., MALEY S.W., WRIGHT S., BARTLEY P., ESTEBAN-REDONDO I., BUXTON D., INNES E.A.**

Placental Pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy.

*J. Comp. Pathol.*, 2004, **131**, 142-146.

**MAILLARD R., FONTAINE J.J., ARCANGIOLI M.A., DOUART A., MILLEMAN Y.**

Neuropathologie du veau en période néonatale.

*Bull. GTV.*, 2003, hors-série neuropathologie des ruminants, 117-126.

**MAINARD-JAME R.C., THURMOND M.C., BERZAL-HERRANZ B., HIETALA S.K.**

Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain.

*Vet. Rec.*, 1999, **145**, 3, 72-75.

**MARQUER A., CHERMETTE R.**

La néosporose chez les bovins.

*Le Point Vétérinaire*, 2000, **31**, 208, 17-22.

**MARSH A.E., BARR B.C., MADIGAN J., LAKRITZ J., NORDHAUSEN R., CONRAD P.**

Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis.

*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1996, **209**, 11, 1907-1913.

**MCALLISTER M.M., DUBEY J.P., LINDSAY D.S., JOLLEY W.R., WILLS R.A., MCGUIRE A.M.**

Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*.

*Int. J. Parasitol.*, 1998, **28**, 9, 1473-1479.

**MCGUIRE A.M., MCALLISTER M.M., WILLS R.A., TRANAS J.D.**

Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columba livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora* tachyzoites.

*Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1525-1529.

**MEHLHORN H., HEYDORN A.O.**

*Neospora caninum* : is it really different from *Hammondia Heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii* ? An opinion.

*Parasitol. Res.*, 2000, **86**, 169-178.

**MORRIS M.T., CHENG W.C., ZHOU X.W., BRYDGES S.D., CARRUTHERS V.B.**

*Neospora caninum* expresses an unusual single-domain Kazal protease inhibitor that is discharged into the parasitophorous vacuole.

*Int. J. Parasitol.*, 2004, **34**, 693-701.

**NISHIKAWA Y., MIKAMI T., NAGASAWA H.**

Vaccine development against *Neospora caninum* infection.

*J. Vet. Med. Sci.*, 2002, **64**, 1, 1-4.

**OTTER A., JEFFREY M., SCHOLE S.F.E., HELMICK B., WILESMITH J.W., TREES A.J.**

Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnostic of abortion due to bovine neosporosis.

*Vet. Rec.*, 1997, **141**, 487-489.

**ORTEGA-MORA L.M., FERRE I., DEL-POZO I., CAETANO-DA-SILVA A., COLLANTES-FERNANDEZ E., REDIGOR-CERRILLO J., URGATE-GARAGALZA C., ADURIZ G.**

Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls.

*Vet. Parasitol.*, 2003, **117**, 301-308.

**PAN Y., JANSEN G.B., DUFFIELD D.F., HIETALA S., KELTON D., LIN C.Y., PEREGRINE A.S.**

Genetic susceptibility to *Neospora caninum* infection in Holstein cattle in Ontario.

*J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 11, 3967-3975.

**PARE J., FECTEAU G., FORTIN M., MARSOLAIS G.**

Seroepidemiology study of *Neospora caninum* in dairy herds.

*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1998, **213**, 1595-1598.

**PARE J., THURMOND M.C., HIETALA S.K.**

Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality.

*Can. J. Vet. Res.*, 1996, **60**, 133-139.

**PARE J., THURMOND M.C., HIETALA S.K.**

*Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion.

*J. Parasitol.*, 1997, **83**, 82-83.

**PARISH S.M., MAAG-MILLER L., BESSER T.E., WEIDNER J.P., McELWAIN T., KNOWLES P., LEATHERS C.W.**

Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves.

*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1987, **191**, 12, 1599-1600.

**PEYRON F.**

Enquête séro-épidémiologique sur la néosporose bovine dans le département des Hautes-Alpes.

Th. : Med. Vet. : Lyon : 2003- Université Claude Bernard – Lyon 1, 120.

**PITEL P-H., PRONOST S., LEGENDRE M.F., CHATAGNON G., TAINURIER D., FORTIER G.**

Infection des bovins par *Neospora caninum* : deux années d'observations dans l'Ouest de la France.

*Le Point Vétérinaire*, 2000, **31**, 205, 53-58.

**PRONOST S., PITEL P-H., FOUCHER N., COLLOBERT C., FORTIER G.**

La néosporose équine.

*Le Point Vétérinaire*, 2000, **31**, 208, 23-27.

**QUINN H.E., ELLIS J.T., SMITH N.C.**

*Neospora caninum* : a cause of immune-mediated failure of pregnancy ?

*Trends Parasitol.*, 2002, **18**, 9, 391-394.

**SCHARES G., BARWALD A., STAUBACH C., WURM R., RAUSER M., CONRATHS F.J.**

Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk.

*Vet. Parasitol.*, 2004, **120**, 1-2, 55-63.

- SCHARES G., PETERS M., WURM R., BÄRWALD A., CONRATHS F.J.**  
The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques.  
*Vet. Parasitol.*, 1998, **80**, 87-98.
- SLAPETA J.R., MODRY D., KYSELOVA I., HOREJS R., LUKES J., KOUDELA B.**  
Dog shedding oocysts of *Neospora caninum* : PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach.  
*Vet. Parasitol.*, 2002, **109**, 157-167.
- SPEER C.A., DUBEY J.P., McALLISTER M.M., BLIXT J.A.**  
Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.  
*Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 10, 1509-1519.
- TAINTURIER D., FIENI F., BRUYAS J.F., BATTUT I.**  
Étiologie des avortements chez la vache.  
*Le Point Vétérinaire*, 1997a, **28**, 183, 13-20.
- TAINTURIER D., FIENI F., BRUYAS J.F., BATTUT I.**  
Conduite à tenir devant un avortement dans un élevage bovin  
*Le Point Vétérinaire*, 1997b, **28**, 183, 21-25.
- THILSTED J.P., DUBEY J.P.**  
Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle.  
*J. Vet. Diagn. Invest.*, 1989, **1**, 205-209.
- THURMOND M.C., HIETALA S.K.**  
Strategies to control *Neospora* infection in cattle.  
*Bovine Pract*, 1995, **29**, 60-63.
- THURMOND M.C., HIETALA S.K.**  
Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows.  
*Am. J. Vet. Res.*, 1996, **57**, 1559-1562.
- THURMOND M.C., HIETALA S.K.**  
Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle.  
*Am. J. Vet. Res.*, 1997a, **58**, 12, 1381-1385.
- THURMOND M.C., HIETALA S.K.**  
Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows.  
*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1997b, **210**, 5, 672-674.
- TRANAS J.D., HEINZEN R.A., WEISS L.M., McALLISTER M.M.**  
Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*.  
*Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1999, **6**, 5, 765-767.
- TREES A.J., DAVISON H.C., INNES E.A., WASTLING J.M.**  
Toward evaluating the economic impact of bovine neosporosis.  
*Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 8, 1195-2000.
- TREES A.J., GUY F., LOW J.C., ROBERTS L., BUXTON D., DUBEY J.P.**  
Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle.  
*Vet. Rec.*, 1994, **134**, 405-407.
- UCHIDA Y., IKE K., KUROTAKI T., ITO A., IMAI S.**  
Monoclonal antibodies preventing invasion of *Neospora caninum* Tachyzoites into hosts cells.  
*J. Vet. Med. Sci.*, 2004, **66**, 11, 1355-1358.
- UGGLA A., STENLUND S., HOLMDAHL O.J.M., JAKUBEK E.B., THEBO P., KINDAHL H., BJÖRKMAN C.**  
Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves.  
*Int. J. Parasitol.*, 1998, **28**, 1467-1472.

**VON BLUMRÖDER D., SCHARES G., NORTON R., WILLIAMS D.J.L., ESTEBAN-REDONDO I., WRIGHT S., BJÖRKMAN C., FRÖSSLING J., RISCO-CASTILLO V., FERNANDEZ-GARCIA A., ORTEGA-MORA L.M., SAGER H., HEMPHILL A., VAN MAANEN C., WOUDA W., CONRATHS F.J.**

Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines.

*Vet. Parasitol.*, 2004, **120**, 11-22.

**WILLIAMS D.J.L., GUY C.S., SMITH R.F., GUY F., McGARRY J.W., MCKAY J.S., TREES A.J.**

First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection.

*Int. J. Parasitol.*, 2003, **33**, 1059-1065.

**WOUDA W.**

Neospora abortion in cattle, aspects of diagnosis and epidemiology.

Utrecht, 1998. 176p.

**WOUDA W.**

Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis : a review.

*Vet. Q.*, 2000, **22**, 71-74.

**WOUDA W., DUBEY J.P., JENKINS M.C.**

Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis

*J. Parasitol.*, 1997, **83**, 3, 545-547.