

Année 2009

**TRANSMISSION VERTICALE DE
NEOSPORA SP. CHEZ LES MAMMIFÈRES :
QUELLES CONSÉQUENCES POUR
L'ÉLEVAGE CANIN ?**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MÉDECINE DE CRETEIL

le.....

par

Claire SARRAZIN

Née le 14 janvier 1985 à Reims (Marne)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Dr. Alain Fontbonne

Maître de conférences à l'ENVA

Assesseur : Dr. Bruno Polack

Maître de conférences à l'ENVA

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard
Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, CLERC Bernard

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, Maître de conférences -UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur -UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences -UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences -UNITE : BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences	- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences - UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences -DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur -UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mlle ABITBOL Marie, Maître de conférences -DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur -DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Ingénieur Professeur agrégé certifié
---	--

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Maître de conférences

- UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences - UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Melle PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel -UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mlle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Melle DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)	- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY Béangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel - UNITE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel - DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mlle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel - UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur M. POLACK Bruno, Maître de conférences* M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel Mlle HALOS Léniaïg, Maître de conférences -UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Professeur
---	--

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences

-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences -UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences - DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences	- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences* - UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences
---	---

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

Mme GIRAUDET Aude Clinique équine, Ingénieur de recherche

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur

Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux

Au Docteur Fontbonne,

Enseignant à L'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui m'a fait l'honneur de diriger ce travail et de le corriger,

Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et toute ma reconnaissance pour l'aide et le suivi qu'il m'a apportés tout au long de la rédaction de cette thèse.

Au Docteur Polack,

Enseignant à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui m'a fait l'honneur de corriger ce travail et de participer au jury de thèse.

Sincères remerciements pour l'aide apportée au cours de l'élaboration de cette thèse

Au Professeur Toma, qui m'a fait l'honneur de corriger ce travail

Sincères remerciements

A Samuel, pour tout ce qu'il m'apporte au quotidien. Merci pour tout.

A mes parents,

Parce que vous avez toujours été là pour moi et que sans vous je ne serais jamais arrivée là.
Merci pour votre soutien permanent, pour les valeurs que vous m'avez inculquées, pour votre amour quoiqu'il arrive. Je vous suis sincèrement reconnaissante pour tout.

A Sophie et Marie-Pierre, mes deux sœurs, pour leur affection et leur soutien.

Bonne chance à chacune dans leurs vies respectives.

A Nelly, Joelle, Anne et Alain

Merci pour votre soutien, votre générosité et pour m'avoir accueillie lors de mes périodes de stage

A Lauriane, Estelle et Agnieszka, mes amies de toujours.

A Claire, ma carrée

A Thomas et Baptiste, mes co-T1.

A Pierre et Adèle

A Tibo, Erwan, Laurence, Valérie, et les Julies

A Lucie et Eve

A Elodie, ma formidable colocataire.

A Jean-Philippe et Alex

A Clara, Mili, Thomas V

A mes poulottes, Chloé et Marie

A mon ancien.

A James et Nounou, pour leur fight attitude,

A Popeye, Coralie, Raph

A nos poulots, parce que vous êtes supers

Et à tous les autres que je ne peux citer mais qui ont fait de mes moments à l'Ecole des moments formidables

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	15
1. Le parasite <i>Neospora</i> , agent de la néosporose chez les mammifères.....	17
1.1. <i>Neospora caninum</i> : Première mise en évidence du parasite et historique	17
1.2. <i>Neospora caninum</i> : Position systématique	18
1.3. <i>Neospora caninum</i> : biologie générale et cycle de développement	19
1.3.1. Cycle de développement de <i>Neospora caninum</i>	19
1.3.2. Hôtes intermédiaires et hôtes définitifs de <i>Neospora caninum</i>	21
1.3.2.1. De nombreux hôtes intermédiaires sources de bradyzoïtes	21
1.3.2.1.1. Hôtes intermédiaires pour lesquels des souches viables de <i>Neospora caninum</i> ont pu être mises en évidence.	21
1.3.2.1.2. Hôtes intermédiaires naturels pour lesquels la présence du parasite a été démontrée par immuno-histochimie et/ou recherche d'ADN de <i>Neospora caninum</i>	22
1.3.2.1.3. Hôtes intermédiaires induits expérimentalement	25
1.3.2.1.4. Hôtes possibles de <i>Neospora caninum</i> pour lesquels un contact avec le parasite a été démontré par la présence d'anticorps	25
1.3.2.2. De rares hôtes définitifs sources d'oocystes	27
1.3.2.2.1. Le chien : seul hôte définitif confirmé de <i>Neospora caninum</i>	27
1.3.2.2.2. Le coyote et autres canidés sauvages : hôtes définitifs possibles de <i>Neospora caninum</i>	32
1.3.2.3. L'homme : un hôte possible de <i>Neospora caninum</i> ?.....	33
1.3.3. Modes de transmission de <i>Neospora caninum</i> , hors transmission verticale	34
1.3.3.1. Contamination horizontale par ingestion du parasite.....	34
1.3.3.2. Contamination vénérienne	35
1.3.3.3. Contamination d'hôte à hôte	35
1.4. <i>Neospora caninum</i> : Caractéristiques et localisation des différentes formes parasitaires.....	36
1.4.1. La forme bradyzoïte	36
1.4.1.1. Distribution du parasite sous forme bradyzoïte dans l'organisme.....	36

1.4.1.2.	Description en microscopie électronique du kyste à bradyzoïte.....	37
1.4.1.3.	Description en microscopie électronique du bradyzoïte.....	38
1.4.2.	La forme tachyzoïte.....	40
1.4.2.1.	Distribution du parasite sous forme tachyzoïte dans l'organisme	40
1.4.2.2.	Description en microscopie électronique.....	40
1.4.3.	Les oocystes	41
1.4.4.	Variation inter-espèces	42
1.4.4.1.	Différenciation entre <i>Neospora caninum</i> et <i>Neospora hughesi</i>	42
1.4.4.2.	Différenciation entre les souches bovines et canines de <i>Neospora caninum</i>	43
1.4.5.	Resistance du parasite	43
1.5.	<i>Neospora caninum</i> : agent de la néosporose chez les mammifères	44
1.5.1.	Pathologie générale	44
1.5.2.	Aperçu des méthodes de diagnostic de la néosporose.....	46
1.5.2.1.	Diagnostic histologique	46
1.5.2.2.	Diagnostic immuno-histochimique	46
1.5.2.3.	Démonstration de la viabilité du parasite.....	47
1.5.2.4.	Diagnostic par Polymerase Chain Reaction (PCR)	47
1.5.2.5.	Diagnostic sérologique.....	50
1.5.2.5.1.	Test IFAT	50
1.5.2.5.2.	Test ELISA	51
1.5.2.5.3.	Immunoblotting	52
1.5.2.5.4.	Agglutination directe : NAT.....	52
1.5.2.5.5.	Notion de seuil et de comparabilité	53
1.6.	<i>Neospora caninum</i> : séroprévalence générale.....	55
1.6.1.1.	Séroprévalence de <i>Neospora caninum</i> dans l'espèce bovine	55
1.6.1.2.	Séroprévalence de <i>Neospora caninum</i> dans l'espèce canine	60
1.6.1.3.	Séroprévalence de <i>Neospora hughesi</i> dans l'espèce équine	63
1.6.1.4.	Séroprévalence de <i>Neospora caninum</i> chez d'autres espèces domestiques.....	63
	Tableau 11, suite	65
1.7.	<i>Neospora caninum</i> : un impact majeur sur l'économie.....	66

2. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez les bovins, un modèle d'étude concernant l'influence du parasite sur la reproduction	67
2.1. <i>Neospora caninum</i> chez les bovins, une transmission particulièrement efficace à la descendance.....	67
2.1.1. Première mise en évidence d'une transmission verticale.....	67
2.1.2. Efficacité de la transmission de <i>Neospora caninum</i> à la descendance	68
2.1.3. Conséquences de la transmission du parasite au cours de la gestation	69
2.1.3.1. Des avortements possibles	69
2.1.3.2. Dans la majorité des cas, la naissance d'un veau cliniquement sain mais infecté persistant.....	69
2.1.3.3. Rarement, la naissance d'un veau cliniquement atteint de néosporose	70
2.2. Mode de transmission <i>Neospora caninum</i> chez les bovins : une transmission verticale complexe, exogène ou endogène	70
2.2.1. Définition des termes exogène et endogène	70
2.2.1.1. Transmission exogène du parasite durant la gestation.....	71
2.2.1.1.1. Transmission exogène du parasite : une infection primaire à l'origine d'une parasité mie	71
2.2.1.2. Transmission exogène expérimentale à partir de tachyzoïtes ou bradyzoïtes	72
2.2.1.3. Transmission exogène expérimentale à partir d'oocystes.....	73
2.2.2. Transmission endogène du parasite durant la gestation	74
2.2.2.1. Transmission endogène du parasite : une transmission répétée du parasite au cours des gestations successives.....	74
2.2.2.2. Transmission endogène du parasite : l'hypothèse d'une recrudescence de l'infection au cours de la gestation.....	75
2.2.2.3. Transmission endogène du parasite : une transmission possible uniquement par les mères infectées permanentes	76
2.3. Pathogénie des avortements liés à <i>Neospora caninum</i> chez les bovins	77
2.3.1. Hypothèses concernant les mécanismes à l'origine de l'avortement.....	77
2.3.2. Rappel immunologique : réponse immunitaire maternelle et fœtale au cours de la gestation.....	78
2.3.3. Réponse immunologique face à l'infection à <i>Neospora caninum</i> en fonction du stade de gestation.	79

2.3.4.	Dommmages placentaires et fœtaux causés par <i>Neospora caninum</i>	85
2.3.4.1.	Dommmages placentaires causés par <i>Neospora caninum</i>	85
2.3.4.2.	Dommmages fœtaux causés par <i>Neospora caninum</i>	86
2.4.	Approche épidémiologique des avortements à <i>Neospora caninum</i> chez les bovins	92
2.4.1.	<i>Neospora caninum</i> dans l'espèce bovine : premier agent à l'origine d'avortements	92
2.4.2.	Diversité des formes épidémiologiques d'avortements liés à <i>Neospora caninum</i>	93
2.4.2.1.	Epizootie d'avortements et transmission exogène du parasite	93
2.4.2.2.	Enzootie d'avortements et transmission endogène du parasite.....	94
2.4.3.	Etudes des facteurs de risques influençant les avortements chez les bovins	96
2.4.3.1.	Stade de gestation	96
2.4.3.2.	De manière expérimentale : influence de la dose et de la voie d'inoculation.....	98
2.4.3.3.	Séroprévalence individuelle.....	98
2.4.3.4.	Séroprévalence de troupeau	100
2.4.3.5.	Age et parité	100
2.4.3.6.	Présence de l'hôte définitif	101
2.4.3.7.	Autres facteurs de risques	102
2.5.	Mise en cause de <i>Neospora caninum</i> lors d'avortements, établissement d'un lien de cause à effet	102
2.6.	Autres conséquences de l'infection à <i>Neospora caninum</i> sur la reproduction chez les bovins	105
2.6.1.	Influence de <i>Neospora caninum</i> sur la fertilité.	105
2.6.2.	Influence de <i>Neospora caninum</i> sur la production laitière.	105
2.7.	Contrôle de la transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez les bovins.....	106
2.7.1.	Mesures de lutttes offensives visant à contrôler les avortements à <i>Neospora caninum</i>	106
2.7.1.1.	Chimiothérapie curative: aucune molécule efficace disponible actuellement	106
2.7.1.2.	Contrôle de l'infection par réforme préférentielle des animaux positifs ..	107
2.7.1.3.	Autres moyens de lutte offensive contre <i>Neospora caninum</i>	107

2.7.2.	Mesures de lutttes défensives visant à contrôler les avortements à <i>Neospora caninum</i>	107
2.7.2.1.	Prophylaxie vaccinale, un outil d'avenir en développement	107
2.7.2.2.	Mesures hygiéniques visant à limiter l'entrée du parasite	109
2.7.3.	En conclusion : contrôle de la néosporose sur le terrain	109
3.	Transmission verticale de <i>Neospora</i> sp. chez de nombreux hôtes intermédiaires autres que le bovin : un agent de plus en plus incriminé lors de troubles de la reproduction	111
3.1.	Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez les ovins : des troubles de la reproduction avérés	111
3.1.1.	Mise en évidence d'une transmission verticale chez les ovins	111
3.1.2.	Efficacité et conséquence de la transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez les Ovins.....	112
3.1.2.1.	Efficacité de la transmission verticale	112
3.1.2.2.	Conséquences de la transmission verticale	112
3.1.3.	Mécanismes à l'origine d'une transmission verticale chez les ovins.....	113
3.1.3.1.	Un mode de transmission exogène avéré.....	113
3.1.3.2.	Un mode de transmission endogène suspecté.....	113
3.1.4.	Pathogénie des avortements à <i>Neospora caninum</i> chez les ovins.....	115
3.1.4.1.	Dommmages placentaires causés par <i>Neospora caninum</i>	115
3.1.4.2.	Dommmages fœtaux causés par <i>Neospora caninum</i>	116
3.1.4.3.	Evolution de la relation hôte/parasite au cours de la gestation, influence du stade de gestation sur la survenue d'avortements à <i>Neospora caninum</i>	116
3.1.5.	Approche épidémiologique des avortements à <i>Neospora caninum</i> chez les ovins	118
3.1.6.	Autres conséquences de l'infection à <i>Neospora caninum</i> sur la reproduction dans l'espèce ovine.....	118
3.2.	Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez les caprins : des troubles de la reproduction occasionnellement observés.....	119
3.2.1.	Mise en évidence d'une transmission verticale chez les caprins.	119
3.2.2.	Pathogénie des avortements à <i>Neospora caninum</i> chez les caprins.....	119
3.2.2.1.	Dommmages placentaires causés par <i>Neospora caninum</i>	119
3.2.2.2.	Dommmages fœtaux causés par <i>Neospora caninum</i>	120

3.2.3. Approche épidémiologie des avortements à <i>Neospora caninum</i> chez les caprins	120
3.3. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez les autres ruminants : un agent à suspecter lors de troubles de la reproduction.....	121
3.3.1. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez l'antilope (<i>Tragelaphus imberis</i>) à l'origine de néomortalité	121
3.3.2. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez les ruminants sauvages, cerf (<i>Cervus eldi siamensis</i>) et daim (<i>Dama dama</i>).	122
3.3.3. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez les camélidés, Alpaga (<i>Vicugna pacos</i>) et Lama (<i>Lama glama</i>) : des avortements récemment décrits	122
3.4. Transmission verticale de <i>Neospora</i> sp. chez les équidés: un agent émergent lors de troubles de la reproduction.	123
3.4.1. Mise en évidence d'une transmission verticale chez les équidés.....	123
3.4.2. Pathogénie des avortements à <i>Neospora</i> sp. chez les équidés	124
3.4.3. Approche épidémiologique des avortements à <i>Neospora</i> sp. chez les équidés	124
3.5. Transmission verticale expérimentale de <i>Neospora caninum</i> : des troubles de la reproduction induits chez l'animal de laboratoire.....	126
3.5.1. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez les rongeurs de laboratoire et baisse de la fécondité	126
3.5.1.1. La souris, modèle de transmission verticale de <i>Neospora caninum</i>	126
3.5.1.2. Pathogénie des avortements à <i>Neospora caninum</i> chez la souris	127
3.5.1.2.1. Evolution de la relation hôte parasite au cours de la gestation, influence du stade de gestation sur la survenue d'avortements	127
3.5.1.2.2. Lésions causées par <i>Neospora caninum</i> après transmission verticale chez la souris	128
3.5.2. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez le porc et avortement	128
3.5.3. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez le chat et avortement.....	129
3.5.4. Transmission verticale expérimentale de <i>Neospora caninum</i> chez les primates et avortement	130
4. Transmission verticale de <i>Neospora</i> sp., conséquences pour l'espèce canine : un agent à suspecter lors de troubles de la reproduction ?	131
4.1. Le chien, un hôte intermédiaire multipliant le parasite sous forme tachyzoïte.....	131

4.2. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez le chien : un potentiel de transmission variable.....	133
4.2.1. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> chez le chien : naissance de chiots cliniquement atteints.....	133
4.2.2. Une transmission non systématique, pouvant se répéter sur plusieurs générations	134
4.2.3. Un potentiel de transmission corrélé au titre en anticorps	138
4.3. Des troubles de la reproduction avérés lors des expérimentations.....	139
4.3.1. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> en milieu de gestation et naissance de chiots non viables	139
4.3.2. Transmission verticale de <i>Neospora caninum</i> en début de gestation et avortements	140
4.3.3. Dommages placentaires et fœtaux causés par <i>Neospora caninum</i> lors des avortements	142
4.4. <i>Neospora caninum</i> et troubles de la reproduction chez le chien, une voie de recherche à développer.....	143
4.4.1. Les arrêts de gestation en élevage canin, un défi diagnostique.....	143
4.4.1.1. Des arrêts de gestation fréquents mais souvent non diagnostiqués	143
4.4.1.2. Diagnostic différentiel des avortements en élevage canin : une place pour <i>Neospora caninum</i>	144
4.4.2. Actuellement, le rôle de <i>Neospora caninum</i> lors de troubles de la reproduction sur le terrain est inconnu	147
4.4.3. Aucun traitement ne permet de protéger le fœtus de l'infection à <i>Neospora</i> à l'heure actuelle.	149
4.4.4. Le chien, clé épidémiologique des avortements à <i>Neospora</i> chez les bovins..	150
4.4.5. Pistes d'études possibles concernant <i>Neospora caninum</i> en élevage canin.....	150
CONCLUSION.....	153
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155
ANNEXES	173

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle évolutif de <i>Neospora caninu</i>	20
Figure 2 : image en microscopie électronique de <i>Neospora caninum</i>	39
Figure 3 : Transmission de la Néosporose bovine	71
Figure 4 : Evolution de la relation Hôte/parasite lors d'une infection par <i>Neospora caninum</i> chez l'animal non gestant (i) et en cours de gestation (ii, iii et iv).....	81
Figure 5 : Titre en anticorps (IgG et IgM) anti- <i>Neospora caninum</i> au cours de 3 gestations consécutives.	82
Figure 6 : Lésions placentaires causées par <i>Neospora caninum</i> , coupes histologiques.....	86
Figure 7 : Lésions fœtales causées par <i>Neospora caninum</i> , coupes histologiques	87
Figure 8 : Cinétique de la réponse en anticorps chez des bovins gestant infectés naturellement par <i>Neospora caninum</i> , pour 10 bovins ayant avorté et 12 bovins n'ayant pas avorté.....	99
Figure 9: Arbre diagnostic des avortements à <i>Neospora caninum</i>	104
Figure 10 : Transmission transplacentaire répétée de <i>Neospora caninum</i> à la descendance dans un élevage de Pointer	134
Figure 11 : Variabilité de transmission de <i>Neospora caninum</i> à la descendance chez 6 femelles Hamiltonsväre, d'après étude rétrospective	136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Hôtes intermédiaires et distribution de <i>Neospora caninum</i> ou <i>Neospora hughesi</i> prouvés par isolation du parasite	23
Tableau 2 : Hôtes intermédiaires pour lesquels la présence du parasite a été démontrée par immuno-histochimie (IHC) et/ou recherche d'ADN de <i>Neospora caninum</i>	24
Tableau 3 : Excrétion d'oocystes par le chien : synthèse des études réalisées	29
Tableau 4 : Production d'oocyste et titre en anticorps suite à une exposition répétée au parasite <i>Neospora caninum</i> chez le chien	31
Tableau 5: Séroprévalence de <i>Neospora caninum</i> chez l'homme	33
Tableau 6 : Comparaisons des différentes méthodes de diagnostic direct de <i>Neospora caninum</i>	49
Tableau 7 : Comparaisons des différentes méthodes de diagnostic indirect de <i>Neospora caninum</i>	54
Tableau 8 : Prévalence sérologique des anticorps de <i>Neospora caninum</i> chez les vaches laitières	56
Tableau 9 : Prévalence sérologique des anticorps de <i>Neospora caninum</i> chez les vaches allaitantes.....	59
Tableau 10 : Prévalence des anticorps de <i>Neospora caninum</i> chez le chien	61
Tableau 11 : Prévalence des anticorps de <i>Neospora caninum</i> chez les animaux domestiques en dehors des chiens et des bovins	64

Tableau 12: Réponse immunologique fœtale et maternelle après inoculation de souches de <i>Neospora caninum</i> chez le bovin, en fonction de la dose inoculée, de la voie d'inoculation et du stade de gestation.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 13 : Lésions fœtales et placentaires observées après inoculation de souche de <i>Neospora caninum</i> chez le bovin, en fonction de la dose inoculée, de la voie d'inoculation et du stade de gestation.	89
Tableau 14: Lésions fœtales et placentaires observées après infection naturelle par <i>Neospora caninum</i> chez le bovin.	91
Tableau 15 : Séroprévalence de <i>Neospora caninum</i> et avortement pour un troupeau de vaches laitières sur trois années consécutives	95
Tableau 16 : Naissance ou avortement pour des brebis après inoculation sur une ou deux gestations de $1,7 \cdot 10^5$ tachyzoïtes de <i>Neospora caninum</i> à 65 jours de gestation par voie intraveineuse et suivi du titre en anticorps	114
Tableau 17 : Déroulement de la gestation après inoculation de tachyzoïtes ($1,7 \cdot 10^5$ à $1,7 \cdot 10^6$) par voie intraveineuse chez des brebis à différents stades de gestation.....	117
Tableau 18: Variabilité de transmission de <i>Neospora caninum</i> à la descendance d'après étude prospective sur 17 chiennes reproductrices.....	137
Tableau 19 : Proportion de chiots séropositifs en fonction du titre en anticorps anti- <i>Neospora caninum</i> par IFAT de la mère.....	139
Tableau 20: Avortements et mort fœtales après infection expérimentale de 6 chiennes par <i>Neospora caninum</i> à 21 jours de gestation.....	141
Tableau 21 : Diagnostic différentiels des avortements dans l'espèce canine	146

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide Desoxyribo Nucléique

ARN: Acide Ribonucléique

BVD : Bovine Viral Diarrhea

DAT: Direct Agglutination Test

ELISA: Enzyme Like Immunosorbent Assay

HE : Hematoxyline Eosine

IFAT: Indirect Fluorescent Antibody Test

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

INF: Interferon

ISCOM ELISA : Immuno Stimulating COMplex Enzyme Like Immunosorbent Assay

jPI: Jours Post Infection

kg : Kilogramme

KO : knock Out

mg : Milligramme

mL : millilitre

mm³ : millimètre cube

N. caninum : *Neospora caninum*

NAT: *Neospora* Agglutination Test

ND : Non Déterminé

nm : nanomètre

PCR: Polymerase Chain Reaction

SCID: Severe Combined ImmunoDeficient

TGF: Tumour Growth Factor

TNF: Tumour Necrosis Factor

µm : micromètre

INTRODUCTION

En raison de son extrême similitude avec *Toxoplasma gondii*, tant sur le plan morphologique que sur le plan clinique, *Neospora caninum* a longtemps été confondu avec celui-ci. Ce n'est qu'en 1988 que les deux espèces ont été distinguées, notamment grâce à la microscopie électronique. Aujourd'hui, le parasite *Neospora caninum* est reconnu comme étant un agent pathogène à l'origine de troubles diverses, dont des troubles de la reproduction. De nouvelles études concernant *Neospora caninum* sont publiées très régulièrement, le parasite étant un sujet de recherche d'actualité et les connaissances ont beaucoup évolué ces dernières années. Cependant, si le parasite a été au départ mis en évidence chez le chien, c'est chez le bovin que son impact sur la reproduction a été le plus étudié. Aujourd'hui *Neospora caninum* est considéré comme le premier agent abortif en élevage bovin. S'il est évident que le parasite peut toucher le chien, son rôle en élevage canin n'a été que peu étudié. Le but de cette thèse est donc de regrouper les connaissances acquises sur la transmission verticale de *Neospora* chez les bovins tout d'abord, puis chez les autres mammifères –et en particulier le chien – afin de savoir si l'impact de cette maladie pourrait être sous-estimé en élevage canin.

Après avoir décrit le parasite *Neospora caninum*, ses conséquences cliniques – la néosporose des mammifères – et économiques, nous nous attacherons à étudier plus particulièrement sa transmission verticale. Celle-ci fait l'objet de nombreuses études chez le bovin. Cette espèce nous servira de modèle dans une deuxième partie concernant la pathogénie des troubles de la reproduction liés à *Neospora caninum*, leur épidémiologie et les mesures de lutte envisageables en élevage.

Pour appliquer les données observées chez les bovins à l'élevage canin, nous serons amenés à nous poser deux questions, à savoir si les troubles de la reproduction liés à *Neospora* sont spécifiques aux bovins – de par la biologie du parasite, le type de placentation, etc. – ou généralisables aux autres hôtes du parasite ; et ensuite si le chien peut multiplier et transmettre verticalement le parasite.

Dans une troisième partie une revue de l'impact de *Neospora caninum* lors de troubles de la reproduction chez différentes espèces sera alors présentée. Enfin, la transmission verticale de *Neospora caninum* chez le chien sera étudiée, afin de savoir si *Neospora caninum* peut être considéré comme un pathogène émergent en élevage canin.

1. Le parasite *Neospora*, agent de la néosporose chez les mammifères

1.1. *Neospora caninum* : Première mise en évidence du parasite et historique

Historiquement, une infection pouvant être attribuée à *Neospora caninum* fut initialement décrite par Bjerkas en 1984 en Norvège, sur trois portées successives de chiots de race Boxer (23). Ces chiens avaient présenté des troubles neurologiques divers entre l'âge de 2 et 6 mois. Un parasite semblable à *Toxoplasma gondii* en microscopie optique avait été observé sur des coupes histologiques de cerveaux, alors que les sérologies visant à mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre *Toxoplasma* étaient toutes négatives. Le parasite trouvé se différenciait cependant de *Toxoplasma gondii* par l'épaisseur de sa paroi. En 1988, aux Etats-Unis, lors d'une étude rétrospective portant sur 23 chiens présumés atteints de toxoplasmose, le même parasite inconnu avait été retrouvé pour 10 de ces animaux (47). Il fut finalement décrit grâce à la microscopie électronique et nommé *Neospora caninum* en 1988 par Dubey et son équipe (Dubey *et al.* (47)). Un test immuno-histochimique fut mis au point la même année par Dubey *et al.* (50), permettant l'identification spécifique du parasite. En 1991, la structure et les antigènes des parasites conservés sur des coupes histologiques des chiens Boxer de Norvège et ceux présents sur les 10 chiens américains ont pu être comparés, et le parasite initialement observé en 1984 fut officiellement reconnu comme étant *Neospora caninum* (Bjerkas et Dubey (21)). Des infections à *Neospora caninum* ont depuis été démontrées dans de nombreuses espèces et des études rétrospectives ont démontré son existence aux Etats-Unis dès 1957.

1.2. *Neospora caninum* : Position systématique

Tout comme *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* est un protozoaire du phylum des Apicomplexa (sporozoaires), caractérisé par la présence d'un appareil apical complexe visible en microscopie électronique (voir annexe 1).

Il est de plus classé au sein de la famille des Sarcocystidés. *Neospora caninum* était jusqu'en 1998 le seul représentant de son genre. Un autre parasite, *Neospora hughesi*, très peu différent génétiquement a été mis en évidence dans l'espèce équine.

Les études récentes de phylogénétique ont comparé l'ARN ribosomal de *Neospora caninum* avec d'autres protozoaires du groupe des apicomplexes, ce qui a révélé un très haut degré d'homologie entre *Neospora sp.* et *Toxoplasma gondii*, ce qui laisse suggérer que ces deux espèces sont très proches et ont divergé très récemment. Cependant, d'autres études ont prouvé que *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum* différaient sur le plan morphologique et que les deux espèces possédaient des antigènes distincts. Si une réaction croisée lors des tests immunologiques est possible, celle-ci peut donc être en grande partie évitée par l'utilisation d'antigènes spécifiques.

La différenciation avec d'autres coccidies est assez difficile. Les oocystes de *Neospora caninum* et ceux auparavant attribués à *Isospora bigemina*, *Isospora Bahiensis* et *Hammondia heydorni* étant indifférenciables morphologiquement, ils ont été confondus dans les premières études. A présent, *Isospora bigemina*, *Isospora bahiensis* et *Hammondia heydorni* sont considérées comme étant une unique espèce de parasite. Pour les études menées avant 1998, il est donc impossible de savoir si les oocystes s'apparentant à des *Isospora* étaient en fait des oocystes de *Neospora caninum* ou *Hammondia heydorni*. Ainsi, une souche considérée comme appartenant à l'espèce *Hammondia*, la souche *Hammondia heydorni* 1996, s'est finalement révélée être une souche de *Neospora caninum* (Rapporté par Dubey (51)).

En conclusion, s'il est indiscutable que *Neospora caninum* est une espèce distincte génétiquement et immunologiquement de *Toxoplasma gondii* et de *Hammondia heydorni*, la différenciation morphologique est parfois difficile.

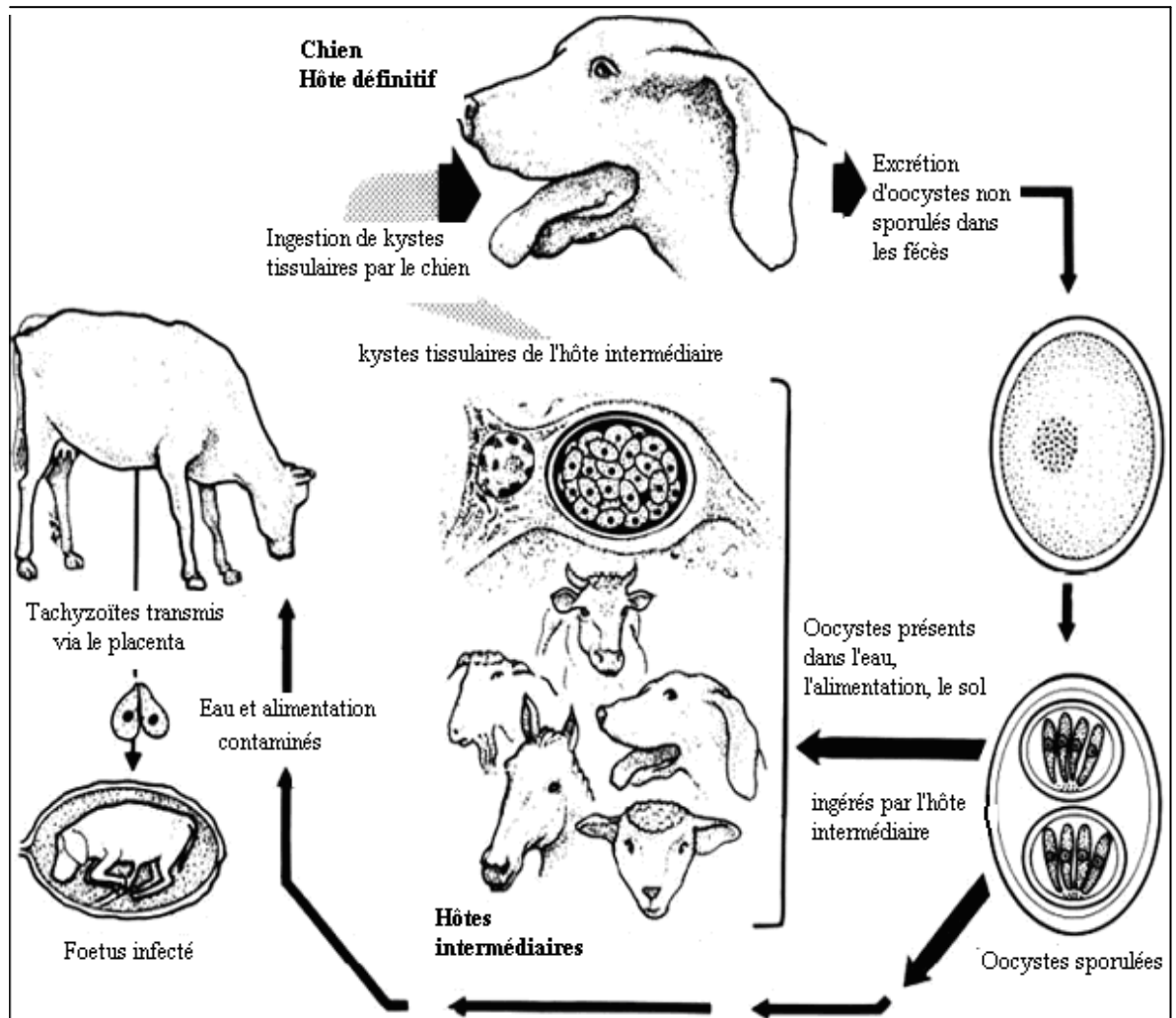
1.3. *Neospora caninum* : biologie générale et cycle de développement

1.3.1. Cycle de développement de *Neospora caninum*

Neospora caninum est une coccidie parasite avec un cycle de développement très proche de celui de *Toxoplasma gondii* : cycle hétéroxène faisant intervenir un carnivore comme hôte définitif. Cependant, la néosporose touche en premier lieu les espèces canine et bovine, avec un canidé comme hôte définitif de *Neospora caninum*, alors que la toxoplasmose est une maladie qui touche de très nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux, notamment les espèces humaine, ovine, caprine et les félidés sont l'unique hôte définitif du parasite *Toxoplasma gondii*. *Neospora caninum* est un parasite difficile à isoler et à mettre en culture, il subsiste de ce fait encore des incertitudes concernant son développement.

Le cycle évolutif de *Neospora caninum* comporte trois formes infectieuses connues: les formes tachyzoïte et kyste à bradyzoïtes, retrouvées chez les hôtes intermédiaires, et la forme oocyste, forme de résistance dans l'environnement, retrouvée dans les fèces de l'hôte définitif. Les stades de schizogonie et de gamétogonie présumés se dérouler entre l'ingestion de la forme infectante par l'hôte définitif et la production d'oocystes sont encore inconnus, même si une forme évoquant un schizonte a été observée sur une coupe histologique de cerveau de chien (Dubey *et al.* (65)).

Figure 1 : Cycle évolutif de *Neospora caninum*,
repris de Dubey (43)



Les trois formes du parasite –tachyzoïte, bradyzoïte et oocyste – sont impliquées dans la transmission du parasite. L’hôte définitif carnivore se contamine probablement par ingestion de bradyzoïtes contenus dans des tissus, et les hôtes intermédiaires se contaminent par l’ingestion de nourriture ou d’eau contaminée par des oocystes de *Neospora caninum* (voir figure 1).

1.3.2. Hôtes intermédiaires et hôtes définitifs de *Neospora caninum*

1.3.2.1. De nombreux hôtes intermédiaires sources de bradyzoïtes

L'hôte intermédiaire héberge le parasite qui y accomplit une reproduction asexuée, sous sa forme kyste à bradyzoïtes et sous la forme tachyzoïte. Tout d'abord identifié chez le chien (Bjerkas (21)), puis chez les bovins le parasite *Neospora sp.* apparaît maintenant comme très peu spécifique d'espèce.

1.3.2.1.1. Hôtes intermédiaires pour lesquels des souches viables de *Neospora caninum* ont pu être mises en évidence.

Des souches de *Neospora caninum* viables ont pu être isolées et identifiées à partir de tissus de vache, de mouton, de daim, de buffle et de chien (64). La plupart de ces isolats provenaient d'animaux cliniquement atteints et de nouveau-nés ou fœtus infectés par voie congénitale, à l'exception des isolats de buffle, mouton et daim qui proviennent d'adultes asymptomatiques (voir tableau 1). L'isolement direct de tachyzoïtes viables en culture cellulaire est très difficile à obtenir et limité par la nécessité d'avoir un matériel non contaminé par d'autres agents pathogènes. Pour pallier cette difficulté, la présence du parasite dans le tissu contaminé a pu être prouvée par inoculation chez la souris immunodéprimée ou par l'observation et la recherche d'oocystes dans des fèces de chien après ingestion du tissu contaminé. L'avantage de cette dernière technique est qu'elle permet l'ingestion et donc le test d'une quantité plus grande de matériel par le chien que ne le permettrait la culture cellulaire ou l'inoculation aux rongeurs. Cependant, le chien pouvant excréter des œufs de parasites très similaires à ceux de *Neospora*, pour identifier de manière certaine des œufs de *Neospora caninum* il faudrait dans l'absolu que l'on retrouve par essai biologique des tachyzoïtes dans des cultures cellulaires ou sur des rongeurs après inoculation de ces oocystes (45).

1.3.2.1.2. Hôtes intermédiaires naturels pour lesquels la présence du parasite a été démontrée par immuno-histochimie et/ou recherche d'ADN de *Neospora caninum*.

La présence de *Neospora caninum* a pu être démontrée par histologie chez le daim (quelques cas), le raton laveur (1 cas), le rhinocéros (1 cas), la chèvre (quelques cas) (64).

Par ailleurs, la présence d'ADN de *Neospora caninum* a été mise en évidence par PCR (polymerase chain reaction) ou par recherche d'antigènes spécifiques (immuno-histochimie) chez le renard, le raton laveur, l'antilope, le cerf, le daim, le lama, l'alpaga, le rat, la souris, le rhinocéros et la chèvre (voir tableau 2). Cependant trouver de l'ADN du parasite n'est pas synonyme de trouver des parasites viables dans un organisme.

Tableau 1 : Hôtes intermédiaires et distribution de *Neospora caninum* ou *Neospora hughesi* prouvés par isolement du parasite repris de Dubey *et al.* (64).

Hôte	Lieu de l'étude	Tissu/origine	Nombre d'isolats
Hôte intermédiaire			
Vache (<i>Bos Taurus</i>)	Australie	Cerveau et moelle épinière de veau	1
	Brésil	Cerveau de fœtus et d'un veau de 3 mois	2
	Italie	Cerveau d'un veau de 45 jours	1
	Japon	Cerveau et moelle épinière de veau	5
	Corée	Cerveau de fœtus et de veau nouveau né	2
	Malaisie	Cerveau de veau nouveau né	1
	Nouvelle Zélande	Cerveau de veau nouveau né	2
	Portugal	Cerveau de fœtus	1
	Espagne	Cerveau de fœtus	1
	Suède	Cerveau d'un veau nouveau né	1
	Royaume-Uni	Cerveau de fœtus et de veau nouveau né	2
	Etats-Unis	Cerveau de fœtus et de veaux nouveaux nés	8
	Pays Bas	Placenta	3*
	Italie	Cerveau d'un veau de 8 mois	1
	Japon	Cerveau de vache adulte	1
	Nouvelle Zélande	Cerveau de vache adulte	
Mouton (<i>ovis ovis</i>)	Brésil	Mouton de 4 mois	1
	Japon	Brebis adulte	1
Buffle (<i>Bubalus bubalis</i>)	Brésil	Buffle adulte	5
Cheval (<i>Equus caballus</i>)	Etats-Unis	Tissus nerveux de cheval adulte	3°
Cerf à queue blanche (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Etats-Unis (Virginie)	Cerveau de cerf adulte	3
	Etats-Unis (Illinois)	Cerveau de cerf adulte	1*
Chien (<i>Canis familiaris</i>)	Allemagne	Tissus nerveux de chiot infecté congénitalement	1
	Royaume Uni	Tissus nerveux de chiot infecté congénitalement	1
	Etats-Unis	Tissus nerveux de chiot infecté congénitalement	10
	Australie	Peau de chien adulte	
	Brésil	Cerveau de chien adulte	

- isolement d'oocystes après ingestion par des chiens, ° *Neospora hughesi*

Tableau 2 : Hôtes intermédiaires pour lesquels la présence du parasite a été démontrée par immuno-histochimie (IHC) et/ou recherche d'ADN de *Neospora caninum*.
Repris de Dubey *et al.* (64)

Hôte	Lieu	Observation
Renard roux (<i>Vulpes vulpes</i>)	Catalogne, Espagne	PCR positive pour 10,7% de 122 renards
	République Tchèque	PCR positive 4,6% de 152 renards
Raton laveur (<i>Procyon lotor</i>)	Etats-Unis	PCR et IHC positives dans un cerveau
Antilope (<i>Tragelaphus imberbis</i>)	Allemagne	PCR positive chez deux avortons et un nouveau né
Cerf à queue noire (<i>Odocoileus hemionus columbianus</i>)	Etats-Unis	IHC positive et Histologie (tachyzoïtes tissulaires) chez un nouveau né
Cerf aux cornes brunes de Thaïlande (<i>Cervus eldii siamensis</i>)	France	IHC positive dans un cerveau de nouveau né
Daim (<i>Dama dama</i>)	Suisse	PCR et IHC positive chez un jeune
Lama (<i>Lama glama</i>)	Pérou	IHC et PCR sur un cerveau de fœtus
Alpaga (<i>Vicugna pacos</i>)	Pérou	IHC et PCR sur deux cerveaux de fœtus
Rat sauvage (<i>Rattus norvegicus</i>)	Royaume Uni	PCR positive pour 4,4% de 45 rats provenant de fermes ovines
	Taiwan	PCR positive dans le cerveau de 2 sur 55 rats séropositifs, présence du parasite confirmé par titrage sur la souris
	Grenade, Indes	PCR positive pour 30% de 238 rats
Souris (<i>Mus musculus</i>)	Royaume Uni	PCR positive (cerveau) pour 3% de 100 souris provenant de fermes ovines
	Etats-Unis, Maryland	PCR positive (cerveau) pour 10% de 105 souris
Rhinocéros (<i>Ceratotherium simum</i>)	Afrique du Sud	Histologie : tachyzoïtes tissulaires chez un nouveau né IHC positive
Chèvre (<i>Capra hircus</i>)	Brésil, Rio Grande	IHC positive sur nouveau né
	Costa Rica	IHC positive sur avorton
	Italie	Histologie et PCR positive sur un avorton
	Etats-Unis, Californie	IHC positive sur 2 avortons
	Etats-Unis, Pennsylvanie	IHC positive sur un nouveau né

De manière expérimentale, la multiplication du parasite a pu être obtenue chez le chat, la souris, le cochon domestique, le rat, la gerbille, le renard et le singe (44). Chez le macaque rhésus, deux fœtus ont pu être contaminés directement par voie intramusculaire *in-utéro*, avec un inoculum de 106 tachyzoïtes (12). Les deux fœtus ont déclaré des lésions tissulaires intracérébrales caractéristiques et des tachyzoïtes ont été retrouvés à l'histologie.

La présence d'anticorps spécifiques anti-*Neospora* a été mise en évidence chez de nombreuses espèces, domestiques et sauvages, partout de part le monde, ce qui fait de *Neospora* sp. un parasite extrêmement cosmopolite. Pour ces espèces, la présence de *Neospora caninum* n'a pas été attestée de manière directe, la présence d'anticorps seule est donc à considérer avec circonspection et ne permettrait pas de conclure formellement vis-à-vis du rang d'hôte intermédiaire.

Même si on ne peut affirmer la qualité d'hôte, intermédiaire ou définitif, il apparaît néanmoins que de très nombreuses espèces de mammifères ont été exposées au parasite.

Les espèces pour lesquelles une sérologie positive vis-à-vis de *Neospora caninum* a été trouvée (en dehors des espèces précédemment citées pour lesquelles à minima une trace ADN du parasite avait été mise en évidence dans l'organisme) sont (64):

Animaux domestiques

- Chat domestique (*Felis catus*),
- Dromadaire (*Camelus dromedarius*),
- Cochon (*Sus scrofa domesticus*),
- Alpaga (*Vicugna vicugna*),
- Buffle (*Bubalus bubalis*).

Faune sauvage

- Canidés : Dingo australien (*Canis familiaris dingo*), Coyote (*Canis latrans*), Loup Eurasien (*Canis lupus dingo*), Loup (*canis lupus*), Chacal doré (*Canis aureus*), Loup à crinière (*Chrysocyon brachyurus*), Renard gris (*Urocyon cinereoargenteus*), Renard de Darwin (*Pseudalopex fulvipes*), Fennec (*Vulpes zerda*), Renard d'Aszara (*Lycalopex gymnocercus*), Renard crabier (*Cerdocyon thous*), Renard chenu (*Dusicyon vetulus*), Chien viverrin (*Nyctereute procyonoides*),
- Félidés : Guépard (*Acinonyx jubatus*), Jaguar (*Herpailurus yaguarondi*), lynx eurasien (*Lynx lynx*), Lion d'Asie (*Panthera leo goojratensis*), Lion (*Panthera leo*),
- Autres carnivores : Hyène (*Crocota crocuta*), Pécan (*Martes pennanti*), Ours brun (*Ursus americanus*),
- Equidés : Zèbre (*Equus burchelli*),
- Cervidés et ruminants : Antilope cervicapre (*Antilope cervicapra*), Cobe de Lechwe (*Kobus leche*), Buffle du cap (*Syncerus caffer caffer*), Impala (*Aepyceros melampus*), Gazelle (*Gazella thomsoni*), Bouquetin d'Espagne (*Capra pyrenaica*), Mouflon de corse (*Ovis ammon*), Mouflon à manchette (*Amnotragus lervia*), Eland du Cap (*Taurotragus oryx*), Bison d'Europe (*Bison bonasus*), Bison (*Bison bison*), Bœuf musqué (*Ovibos moschatus*), Sitatunga (*Tragelaphus spekei gratus*), Cerf du Père David (*Elaphurus davidianus*), Cerf brésilien (*Mazama sp.*), Cerf des pampas (*Ozotoceros bezoarticus*), Cerf élaphe (*Cervus elaphus*), Cerf sika du Vietnam (*Cervus nippon pseudaxis*), Chevreuil (*Capreolus capreolus*), Izard (*Rupicapra pyrenaica*), Chamois (*Rupicapra rupicapra*), Wapiti oriental (*Cervus elaphus canadensis*), Caribou (*Rangifer tarandus*), Elan (*Alces alces*),
- Rongeurs : Lapin européen (de Garenne) (*Oryctolagus cuniculus*), Lièvre ibérique (*Lepus granatensis*), Lièvre brun (*Lepus europaeus*),

- Mammifères marins: Loutre de mer (*Enhydra lutris*), Morse (*Odobenus rosmarus*), Lion de mer (*Zalophus californiarus*), Phoque annelé (*Phoca hispida*), Phoque veau-marin (*Phoca vitulina*), Phoque barbu (*Erignathus barbatus*), Phoque tacheté (*Phoca largha*), Phoque marbré (*Phoca fasciata*), Grand Dauphin (*Tursiops truncatus*), Orque (*Orcinus orca*),
- Autres mammifères: Sanglier (*Sus scrofa*), Phacochère (*Phacochoerus aethiopicus*), Opossum (*Trichosurus vulpecula*).

1.3.2.2. De rares hôtes définitifs sources d'oocystes

1.3.2.2.1. Le chien : seul hôte définitif confirmé de *Neospora caninum*

L'hôte définitif de *Neospora caninum* est resté inconnu jusqu'en 1998, bien que des expérimentations aient été tentées sur le chien, le coyote, le chat et d'autres canidés sauvages susceptibles épidémiologiquement de remplir ce rôle. Ce n'est qu'en 1998 que l'équipe de McAllister a mis en évidence la faculté d'excrétion d'oocystes de *Neospora caninum* par le chien (122) : sur les 4 chiens ayant consommé des tissus murins contaminés par des formes bradyzoïte de *Neospora caninum*, 3 ont excrété des oocystes s'apparentant à ceux de *Toxoplasma gondii* ou *Haemondia* sp. 8 jours après l'ingestion. L'identification des œufs a été confirmée par essai biologique chez la souris : des souris inoculées par voie orale ou sous cutanée avec des extraits de matières fécales ont été observées afin de rechercher des signes histologiques, sérologiques ou immuno-histochimiques de néosporose. Les souris ayant reçu des extraits de matière fécale de deux de ces chiens ont développé un titre élevé en anticorps anti-*Neospora* et une souris inoculée à partir des extraits de matière fécale du troisième chien a développé une néosporose, confirmée par immuno-histochimie et examen histologique des tissus en microscopie électronique.

Le rôle du chien comme hôte définitif a par la suite été confirmé et les recherches approfondies par Lindsay *et al.* en 1999 (104) : la période prépatente entre l'ingestion de tissus contaminés et l'excrétion d'oocystes est réduite à 5 jours. Par ailleurs, aucun des deux

chiens inoculés par Lindsay *et al.* n'a présenté de signes cliniques de néosporose, même si des lésions microscopiques cardiaques et hépatiques évoquant une atteinte par *Neospora* ont par la suite été retrouvées à l'autopsie.

D'autres études visant à investiguer les facteurs intervenant sur l'excrétion des oocystes par le chien ont ensuite été menées (voir tableau 3), mais ces facteurs restent en grande partie inconnus de part la difficulté et le coût engendrés par de telles expérimentations (élevage des chiens, faible nombre d'oocystes excrétés, excrétion irrégulière). L'excrétion d'oocystes par le chien a pu être provoquée après ingestion de tissus naturellement infectés – cerveau de buffle (154) ou placenta de bovin (41) contenant des souches de *Neospora caninum* – ou infectés expérimentalement (induction de l'infection chez l'animal d'expérimentation, puis alimentation du chien avec les tissus infectés). Par contre, ni l'ingestion de lait contaminé par des tachyzoïtes (41), ni la consommation de fœtus contaminés naturellement (20) n'ont induit une excrétion d'oocystes, même si le faible nombre d'études à ce sujet ne permet pas de conclure définitivement sur ces voies possibles de contamination.

Il apparaît tout de même que la durée d'excrétion varie de un à quelques jours et que cette excrétion n'est pas continue mais évolue plutôt par vagues. Les chiens nourris avec des tissus bovins semblent excréter des oocystes en plus grand nombre que ceux nourris avec des tissus murins, de même que les chiots excrètent plus que les adultes. Ainsi, si on regroupe les données des études menées par Gondim *et al.* en 2002 et 2005, on note que sur les 12 chiots utilisés, l'excrétion moyenne est de 166 400 oocystes, alors qu'elle est de 2 900 pour les adultes (77, 79).

Certains chiens traités par corticothérapie à dose immunosuppressive ont excrété plus de 100 000 oocystes après ingestion de cerveaux contaminés, ce qui laisse suggérer que l'immunodépression majore l'excrétion (104, 107) ; par ailleurs le chien ayant excrété le plus grand nombre d'oocystes avait subi une splénectomie (104). Il n'existe pour l'instant pas de données concernant une éventuelle prédisposition raciale.

Tableau 3 : Excrétion d'oocystes par le chien : synthèse des études réalisées

Source alimentaire (souche de <i>N. caninum</i>)	Nombre de chiens		Jours d'excrétion, après ingestion	Nombre d'oocyste isolés	Période d'observation, en jours	Séroconversion (Nombre de chien/total)	Référence
	Total	Excrétant					
Tissu infecté obtenu expérimentalement							
Cerveau souris (NC2)	3	2	8-27 13-23	ND*	37	3/3	122
Cerveau souris (NC beef)	2	1	13-20	ND	37	1/2	122
Cerveau souris (NC liverpool)	2	1	13-20	ND	37	2/2	122
Cerveau Souris (NC beef)	2	2	5,6	4 500 000 Peu	42	1/2	104
Cerveau souris (CKO)	3	1	13	Peu	36	3/3	107
Cerveau souris (CKO cloné)	3	2	7-14 8-13, 15	810 000 161 000	36	2/3	107
Cerveau souris (NC 2)	2	2	17, 19, 21, 22, 24 6-11, 13-17	700 29 900	30	ND	77
Cerveau de souris (NC beef)	2	2	9, 17, 21, 25 9,10, 12-14	500 1200	30	ND	77
Cerveau de souris (NC IL)	2	2	10, 13, 16, 17, 6	300 100	30	ND	77
Souris BALB/c	1	0			ND	0/1	157
Rat (HY Berlin 1996)	1	1	9-13	0	ND	ND	157
Cochon d'inde (HY Berlin 1996)	5	5	5-12 5-11 5-14 8-13 11-13	2 000 000 1 000 000 0 Peu Peu	ND	1/4 (1 ND)	157
Cœur et muscle ovin (HY Berlin 1996)	8	7	9-13 6-10 6-10 7-11 7-13 8-13 8-13	1 500 000 Peu 0 Peu Peu 0 0	ND	0/5 (3 ND)	157
Cœur et muscle caprin (HY Berlin 1996)	1	0		0	ND	ND	157
Cœur, Muscle et cerveau caprin (HY Berlin 1996)	3	3	7-12 7-10 6-12	0 Peu 80 000	ND	0/3	157
Veau (NC beef)	4	3	5-8, 11, 14-17 5-14, 16, 19	54 100 392 800	30	ND	77
Veau (NC IL)	4	4	8-10, 13-16, 19, 20 7-9 10-13, 18,26, 29 6-10, 14-16	25 100 5 700 345 900 95 700	30	ND	77
Veau (NC beef, NC Liv)	5 adultes	3	ND	2 000 1 200 11 400	28	4/5	79
Veau (NC beef, NC Liv)	3 chiots	3	ND	504 400 45 2000 500	28	2/3	79

Tableau 3, suite
Repris de Dubey et al. (64)

Source alimentaire (souche de <i>N. caninum</i>)	Nombre de chiens		Jours d'excrétion, après ingestion	Nombre d'oocyste isolés	Période d'observation, en jours	Séroconversion (Nombre de chien/total)	Référence
	Total	Excrétant					
Tissu infecté obtenu naturellement							
Placenta bovin	3	3	13,15,16,25,27,30 11-16, 18 10-19, 21	<10 opg	60	0/3	41
Cerveau de buffle	7	4	26 (durée 17 excrétion) 7 9	275 969 820 655 21 265 43 500	30	2/4	154

*ND : Non déterminé

Les données publiées concernant la présence d'oocystes retrouvés de manière naturelle dans les fèces de chien sont très peu nombreuses. En effet, les œufs de *Neospora* sp. étant très proches structurellement des œufs d'autres coccidies, il est difficile de les identifier, et leur présence doit être confirmée par essai biologique sur animaux d'expérimentation.

L'équipe de Basso *et al.* est la première à avoir identifié, en 2001, des œufs correspondant à *Neospora caninum* provenant d'un Rottweiler de 45 jours naturellement atteint ; après inoculation chez la gerbille, des souches viables de *Neospora caninum* ont pu être mises en culture(18). Par la suite, Slapeta *et al.* identifient des œufs de *Neospora* dans les fèces d'un chien en République Tchèque en 2002 (164). En 2003, McGarry *et al.* retrouvent des oocystes de *Neospora caninum* en quantité modérée dans les fèces d'un chien de chasse, deux fois à 4 mois d'intervalle (127). En 2005, Shares *et al.* examinent 24 089 échantillons de fèces de chiens, souffrant pour la plupart de désordres gastro-intestinaux (158). Des oocystes s'apparentant à *Neospora caninum* furent retrouvés dans 47 prélèvements, dont 28 ont pu être analysés et testés sur animal de laboratoire. Sur ces prélèvements, 7 se sont révélés contenir des oocystes de *Neospora caninum* après identification par PCR et essai biologique (12 prélèvements contenaient des oocystes de *Hammondia heydorni*, 2 des oocystes *Toxoplasma gondii*, 2 des oocystes de *Hammondia hammondi* et 6 ne furent pas identifiés).

Une seule étude, celle de Gondim *et al.* en 2002 (77), s'est intéressée à l'excrétion des oocystes sur le long terme, en réalisant un examen coprologique hebdomadaire sur 5 chiens atteints. Deux chiens ont alors excrété de nouveau un petit nombre d'oocystes de manière spontanée deux mois après la première expérimentation ; un total de 640, 665 et 170 oocystes furent retrouvés dans les fèces du premier chien sur trois jours consécutifs et 170, 0 et 0 pour le deuxième. La même équipe réalisa une seconde épreuve sur ces 5 chiens en les exposant de nouveau au parasite *Neospora caninum* (79). Les chiens furent une nouvelle fois nourris avec des tissus de veaux infectés expérimentalement par *Neospora caninum* ; le titre en anticorps par IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test) ainsi que l'excrétion d'oocystes ont été ensuite étudiés. Le résultat de cette étude est exposé dans le tableau 4. On remarque qu'après un intervalle de 8 mois entre deux expositions au parasite, 2 chiens sur 2 ne ré-excrètent pas d'oocystes. A l'opposé, lorsque l'intervalle de temps était de 18 et 20 mois, une ré-excrétion a eu lieu, ce qui laisse à supposer qu'une immunité de 8 mois peut résulter d'une unique exposition, mais qu'elle disparaîtrait à plus longue échéance. Cependant, le faible nombre de chiens étudiés ne permet pas de tirer des conclusions certaines, de plus, un des chiens exposés au parasite après un intervalle de 19 mois n'a pas ré-excrété des oocystes.

Tableau 4 : Production d'oocyste et titre en anticorps suite à une exposition répétée au parasite *Neospora caninum* chez le chien
Repris de Dubey *et al.* (64)

Chiens exposés deux fois au parasite						Chiens contrôles nouvellement exposés		
	Temps entre la 1 ^{ère} et la 2 ^{ème} exposition (en mois)	Oocystes produit en 1 ^{ère} exposition (Gondim <i>et al.</i> (77))	Oocystes produit en deuxième exposition	Titre en Anticorps avant la 2 ^{ème} exposition (IFAT)	Titre en Anticorps 4 semaines après la 2 ^{ème} exposition (IFAT)		Oocystes produit en 1 ^{ère} exposition	Titre en Anticorps 4 semaines après la 1 ^{ère} exposition (IFAT)
A	8	23 500	0	1/400	1/400	A	0	1/400
B	8	25 100	0	1/200	1/400	B	2 000	1/200
C	19	345 900	0	<1/50	1/100	C	1 200	1/200
D	20	54 100	1 700	1/1600	1/1600	D	11 400	<1/50
E	18	5 700	11 600	<1/50	1/800	E	0	1/200

Remarque : seuil de positivité en IFAT : 1/50,
Tous les chiens étaient séronégatifs avant leur première épreuve.

Il est important de noter que dans la majorité des études, seuls certains chiens présentent une séroconversion, et donc que l'estimation de la prévalence de *Neospora caninum* chez le chien est peut-être sous estimée avec les tests sérologiques. De même, la plupart des chiens ayant excrété des oocystes n'ont pas présenté d'atteinte clinique, ce qui rend la détection des chiens porteurs difficile.

Pour conclure, on peut souligner le fait que le chien joue, dans le cycle de *Neospora caninum*, un double rôle : celui d'hôte intermédiaire multipliant le parasite sous forme tachyzoïte et bradyzoïte, et celui d'hôte définitif réalisant la multiplication sexuée du parasite.

1.3.2.2.2. Le coyote et autres canidés sauvages : hôtes définitifs possibles de *Neospora caninum*

En dehors du chien, hôte définitif connu et étudié de *Neospora caninum*, d'autres canidés sauvages sont présumés intervenir comme hôte définitif dans le cycle du parasite. Le coyote est désormais le deuxième hôte définitif connu de *Neospora caninum* : après avoir nourris 4 jeunes coyotes pendant 2 jours avec 1kg de tissus bovins infectés, des oocystes de *Neospora caninum* ont été retrouvés dans les fèces de l'un des animaux (Gondim *et al.* (78)). L'identification des oocystes a été confirmée par PCR. La quantité d'oocystes produite a été estimée comme suffisante pour infecter un bovin (>300 oocystes).

Le loup est un carnivore plus proche phylogénétiquement du chien que ne l'est le coyote, ce qui laisse à suggérer que celui-ci pourrait également être un hôte définitif. Par ailleurs, de l'ADN de *Neospora caninum* a été retrouvé dans les fèces de 2 renards sur 271 au Canada (rapporté par Dubey (64))

La transmission du parasite chez le macaque rhésus ayant été réalisée expérimentalement (12), la question concernant l'éventuel rôle zoonotique de *Neospora caninum* est soulevée. A l'heure actuelle, *Toxoplasma gondii* est considéré comme le seul protozoaire du phylum des apicomplexes à l'origine de maladie systémique chez l'homme. Cependant, si *Neospora caninum* devait être considéré comme un agent pathogène zoonotique, on peut craindre qu'il ait été sous diagnostiqué, de part sa ressemblance morphologique avec *Toxoplasma gondii*, surtout si le diagnostic est établi de manière conventionnelle par histologie.

Il n'existe pas pour l'instant de preuves d'une infection humaine à *Neospora caninum*, même si de faibles taux d'anticorps anti *Neospora caninum* ont pu être mis en évidence dans des échantillons sanguins. La séroprévalence humaine concernant *Neospora caninum* est rapportée par Dubey *et al.* (64), dans le tableau 5. Il n'existe pas de contrôles positifs (manipulateur contaminé accidentellement par exemple), qui permettrait d'étalonner les tests sérologiques, le seuil de positivité choisi arbitrairement dans chacune des études ne permet donc pas d'affirmer qu'une personne a été en contact avec le parasite.

Tableau 5: Séroprévalence de *Neospora caninum* chez l'homme
Repris de Dubey *et al.* (64)

Pays	Echantillon	Nombre de sérum étudiés	Test utilisé (seuil positivité)	% positif
Brésil	Personnes atteintes du SIDA	61	IFAT (1/50) ELISA IB	38
	Troubles neurologiques	50		18
	Nouveaux nés	91		5
	Témoins	54		6
Danemark	Fausse couches répétées	76	ELISA IFAT (1/640) IB	0
Corée	Donneurs de sang	172	IFAT (1/100) ELISA IB	6,7
Irlande du Nord	Donneurs de sang	247	IFAT (1/160)	8
Royaume Uni	Agriculteurs et femmes lors de fausses couches répétées	400	IFAT (1/400)	0
Etats-Unis	Donneurs de sang	1 029	IFAT (1/100)	6,7
			IFAT (1/200)	0
			IB	

1.3.3. Modes de transmission de *Neospora caninum*, hors transmission verticale

1.3.3.1. Contamination horizontale par ingestion du parasite

La voie de contamination horizontale par ingestion d'oocystes sporulés provenant de l'environnement est l'unique mode d'infection naturelle démontré chez l'hôte intermédiaire après la naissance ; la transmission entre adultes n'a jamais été décrite. Le développement et la distribution tissulaire de *Neospora caninum* après ingestion naturelle d'oocystes n'est que peu connu. De manière expérimentale, on retrouve alors des kystes à bradyzoïtes dans le système nerveux de souris 20 à 28 jours après l'ingestion de tissus cérébraux de chiens infectés contenant le parasite (Dubey *et al.* (65)) ; McAllister *et al.* (122)).

L'ingestion d'oocystes a été prouvée comme étant une voie de contamination possible chez le veau, la chèvre, le mouton et les rongeurs tels que la souris, la gerbille et le cochon d'inde (64). Par contre, si de nombreuses expérimentations ont prouvé que le chien pouvait se contaminer par l'ingestion de tissus contaminés (voir tableau 3), il n'existe pas de données concernant la possibilité d'une infection après ingestion d'oocystes.

Expérimentalement, des veaux ont pu être infectés par ingestion de colostrum contenant des tachyzoïtes (Uggla *et al.* (174)) : après ingestion de lait additionné de tachyzoïtes, de l'ADN de *Neospora caninum* a été retrouvé dans le cerveau des 4 veaux soumis à l'expérience, mais l'isolement du parasite a échoué. Parallèlement, de l'ADN de *Neospora caninum* a été retrouvé dans du colostrum de vache infectée (134), ce qui laisse à penser qu'un tel mode de contamination est possible, mais il n'a jamais été démontré de manière naturelle. Chez le chien, les tentatives d'infection via le colostrum infecté par des tachyzoïtes ont échoué. (41)

Une contamination par voie vénérienne semble possible mais peu évidente chez la vache et pour l'animal d'expérimentation. Chez la souris, un passage du parasite dans les testicules 7 jours après inoculation par voie intrapéritonéale a été démontré (Masuda *et al.* (120)). Par la suite, le parasite a été mis en évidence pour 3 souris femelles sur 7 (3/5 scid et 0/2 BALB/c) s'étant accouplées avec le mâle porteur.

Chez la vache, après inoculation par voie intra-utérine du parasite, une parasitémie (ADN du parasite présent dans le sang) a été mise en évidence, pour des quantités inoculées allant de 10^2 à 10^5 tachyzoïtes (Serrano-Martinez *et al.* (161)). Au-delà de 10^4 parasites inoculés, une sérologie positive durable a été retrouvée, ce qui confirme la possibilité d'une contamination utérine (161). Même si de l'ADN de *Neospora caninum* a été retrouvé de manière sporadique dans du sperme de taureaux séropositifs, à des concentrations équivalentes à 1 à 2,8 parasites par ml de semence (et jusqu'à 7,5 parasites par ml pour un échantillon) (138), ces résultats laissent à penser que si des parasites viables se retrouvent dans le sperme, c'est à des concentrations faibles et de manière exceptionnelle et donc certainement en quantité insuffisante pour provoquer une infection. De plus, les essais de transmission de la néosporose par insémination artificielle via du sperme contenant des tachyzoïtes ont échoués : les animaux inséminés sont restés séronégatifs (31, 134).

Pour l'instant, la possibilité d'une transmission du parasite entre hôtes intermédiaires, d'animal à animal, n'a pas pu être démontrée. Par exemple, lors d'une étude, 25 génisses séronégatives ont été élevées au contact de 25 génisses séropositives. Toutes les génisses séronégatives le sont restées et ont donné naissance à des veaux séronégatifs vis-à-vis de *Neospora caninum*, alors que les génisses séropositives, bien que n'ayant montré aucun signes cliniques, ont donné naissance à des veaux infectés congénitalement (Anderson *et al.* (3)).

1.4. *Neospora caninum* : Caractéristiques et localisation des différentes formes parasitaires

N. caninum est un parasite intracellulaire strict. Il est connu sous trois formes : le kyste à bradyzoïtes, la forme tachyzoïte et l'oocyste. Différentes études descriptives menées par Dubey *et al.* (47), Dubey et Lindsay (55), Speer *et al.* (166) ont permis de caractériser le parasite *Neospora caninum*, peu après sa découverte. Une étude plus récente, menée en 2002 par Dubey *et al.* sur les souches du parasite étudiées en 1988 ainsi que des coupes de tissus conservées à partir des études précédentes, a ensuite apporté certaines modifications, offrant ainsi une description réactualisée du parasite en vue de sa classification officielle (45). Par la suite, une caractérisation biologique, morphologique et moléculaire du parasite sur une portée de chiots naturellement infectés a été réalisée en 2004 par Dubey *et al.* (65).

Chacune des formes du parasite de *Neospora caninum*, tachyzoïte et bradyzoïte, présente une ultrastructure similaire, avec tous les organites et inclusions caractéristiques des parasites protozoaires Apicomplexa : deux anneaux apicaux, deux anneaux polaires, une conoïde, un plasmalemme accolé à une membrane interne, 22 microtubules, des rhoptries, des mitochondries, un noyau, un complexe de Golgi, des ribosomes, des polysomes, des granules denses, des granules d'amylopectine, des corps lipidiques, des vésicules, un réticulum endoplasmique, des micropores, un pore postérieur.

1.4.1. La forme bradyzoïte

1.4.1.1. Distribution du parasite sous forme bradyzoïte dans l'organisme

Les bradyzoïtes sont la forme de division latente du parasite. Pour l'ensemble des espèces touchées par la néosporose, ils sont regroupés dans des kystes tissulaires retrouvés dans le système nerveux central - cerveau, rétine, moelle épinière (5) – à la différence des kystes du toxoplasme retrouvés dans divers organes. Récemment, en 2001, Peters *et al.* (141) ont rapporté la présence de kystes intramusculaire chez des chiens et des bovins naturellement

infectés par un parasite s'apparentant à *Neospora caninum*. Ces kystes ont été caractérisés grâce à des anticorps anti *Neospora caninum* et étaient retrouvés dans des fibres musculaires, sans qu'une localisation plus précise n'ait pu être confirmée. De tels kystes n'ont jamais été retrouvés sur les modèles expérimentaux d'étude de la néosporose tels que les souris, gerbilles et chats infectés expérimentalement. Ceci serait lié, du moins en partie, au fait qu'il est difficile d'induire la formation de kystes chez les rongeurs (Dubey, données non publiées). Les kystes sont répartis de manière inégale dans le système nerveux.

1.4.1.2. Description en microscopie électronique du kyste à bradyzoïte

Les kystes à bradyzoïtes sont sphériques à ovoïdes et ne possèdent ni cloison ni paroi secondaire. Leur taille est variable : dans la première étude descriptive menée sur le parasite *Neospora caninum*, en 1988, des kystes de grande taille – 55 à 107 μm – avaient été observés sur des coupes de cerveau de caniche (Dubey *et al.* (47)). Depuis, de telles valeurs n'ont pas été observées : la taille moyenne des kystes de *Neospora caninum* s'échelonne selon les études entre 15 et 60 μm , en fonction du nombre de bradyzoïtes contenus dans le kyste (65). Au cours d'une étude menée par Dubey *et al.* en 2004 (65), des préparations à base de 2 à 3mm³ de tissu cérébral de trois chiens atteints de néosporose ont été examinées afin de décrire précisément les caractéristiques biologiques, morphologiques et moléculaires du parasite. Cette étude a permis de mettre en évidence l'irrégularité de répartition et d'aspect de *Neospora caninum* chez un individu. En effet, si la plupart des échantillons de cerveau étaient dépourvus de parasites, on pouvait compter jusqu'à 12 kystes pour certaines coupes. Les kystes observés vont de 14 μm de diamètre contenant 15 bradyzoïtes seulement pour les plus petits, jusqu'à 65 μm , contenant de nombreux bradyzoïtes pour les plus grands. Chaque kyste est délimité par une paroi, constituée d'une fine membrane plasmique externe, électro-dense et d'une couche granulaire interne, comprenant des vésicules et des granules. L'ensemble de ces deux structures forme la paroi du kyste, souvent ondulée ou irrégulière, d'une épaisseur moyenne comprise entre 1 et 4 μm . Cette épaisseur peut varier pour un même kyste : dans la même étude de 2004 (Dubey *et al.* (65)), des valeurs comprises entre 0,7 μm et 2,4 μm ont été mesurées pour la même structure kystique, mais sans protrusion de la paroi. Pour Jardine (91) l'épaisseur de la paroi des kystes est directement liée à la chronicité de

l'infection : plus l'infection est ancienne, plus celle-ci est épaisse. Cette affirmation est remise en question par Dubey en 2002 (45), pour lequel la relation entre maturité du parasite et taille des kystes n'est pas établie.

Les kystes retrouvés dans les fibres musculaires sont similaires à ceux trouvés dans le système nerveux. Ils contiennent chacun de 14 à 50 bradyzoïtes et mesurent moins de 50 µm de longueur (9).

1.4.1.3. Description en microscopie électronique du bradyzoïte

Les parasites sous leur forme bradyzoïte ont un aspect incurvé, avec un noyau proche de l'extrémité postérieure. Leur taille est en moyenne de 6,5 x 1,5 µm, avec des valeurs extrêmes allant de 4 à 8 µm pour la longueur et 1 à 2 µm pour la largeur.

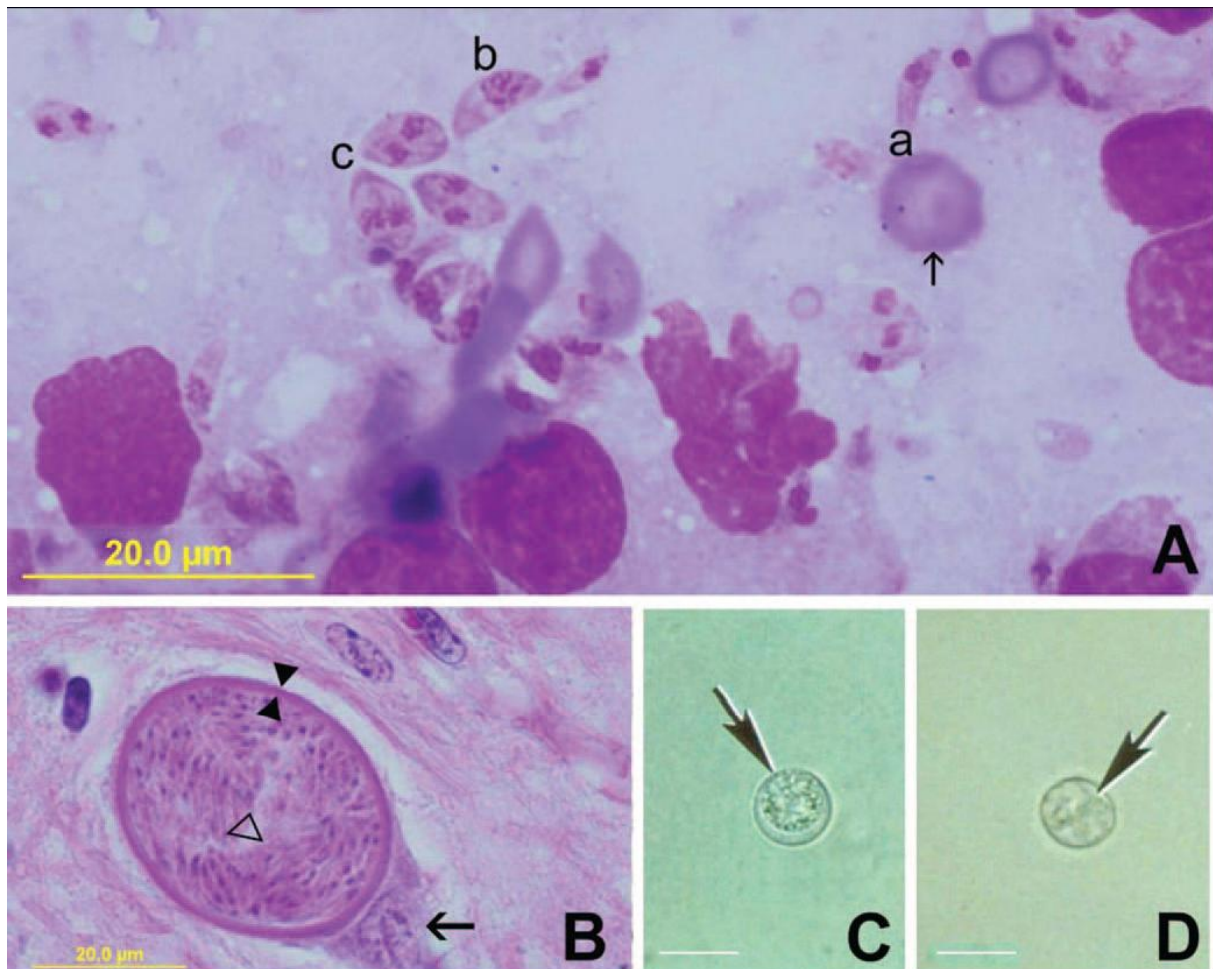
Les bradyzoïtes possèdent une conoïde à l'extrémité antérieure, des micronèmes, des rhoptries, de l'amylopectine et un noyau.

Les micronèmes sont nombreux, mesurent approximativement 232 x 58 nm et sont regroupés dans le tiers antérieur du bradyzoïte pour la plupart, même si on en retrouve certains postérieurement au noyau. Selon l'étude de Dubey *et al.* de 2004, (65) ils ne sont pas répartis selon un schéma particulier. Dans des études antérieures menées par Jardine (1996) (91) Bjerkas et Dubey (1991) (21) ; Barr *et al.* (1991) (11) ; Speers *et al.* (1999) (166) ; Peters *et al.* (2001) (141) ; les micronèmes observés étaient parfois organisés orthogonalement à la membrane du parasite.

Les rhoptries se répartissent sur toute la longueur du parasite ; leur contenu est électron-dense. Leur nombre moyen varie selon les études : pas plus de 3 par parasite selon Dubey *et al.* (65), alors qu'une moyenne de 6 à 12 rhoptries était couramment observée dans les études antérieures (Bjerkas et Perthus en 1988 (24) ; Barr *et al.* en 1991 (11))

Les granules d'amylopectine sont situées principalement dans le tiers moyen du bradyzoïte. Un micropore est parfois visible au niveau de l'extrémité conoïdale du parasite (65).

Figure 2 : image en microscopie électronique de *Neospora caninum*
Repris de Dubey *et al.* (64)



A Frottis hépatique d'une souris infectée expérimentalement par *Neospora caninum* montrant de nombreux tachyzoïtes (coloration Giemsa). Les tachyzoïtes varient en dimension, en fonction de leur stade de division : (a) mince tachyzoïte (b) tachyzoïte avant division, et (c) trois tachyzoïtes en division. La taille d'une hématie est donnée par comparaison (flèche)

B Coupe histologique montrant un kyste tissulaire dans un neurone de la moelle épinière d'un veau infecté congénitalement (coloration hématoxyline et éosine). La paroi du kyste est épaisse (entre les deux têtes de flèches) ; il contient de nombreux petits bradyzoïtes (tête de flèche transparente). Le noyau de la cellule hôte est repoussé en périphérie.

C Oocyste non sporulé (flèche) avec un amas indivisé dans les fèces d'un chien.

D Oocyste sporulé (flèche) comprenant deux sporocystes.

1.4.2. La forme tachyzoïte

1.4.2.1. Distribution du parasite sous forme tachyzoïte dans l'organisme

Le tachyzoïte est la forme de division rapide du parasite, à l'origine des dommages tissulaires et assurant la propagation du parasite à l'intérieur de l'hôte. Ils se divisent en deux rapidement par endodyogénie et on peut en observer jusqu'à 100 dans une unique cellule (45).

Chez le chien infecté, on retrouve couramment des tachyzoïtes dans de nombreux types cellulaires : muscles striés squelettiques, particulièrement le muscle quadriceps lors de troubles neurologiques touchant l'arrière train, mais aussi masséter et muscle temporal ; muscle de l'œsophage ; myocarde. On en retrouve également dans le poumon, les hépatocytes et de manière moins fréquente dans les reins, le pancréas, les glandes surrénales et l'utérus (Barber *et al.* (5)). On peut remarquer que si le parasite a été observé sur des coupes histologique d'œsophage, il n'a jamais été mis en évidence dans les autres parties du tractus intestinal, d'où le manque de connaissance au sujet du cycle de développement intra-intestinal du parasite.

Dans l'espèce bovine les études ont prouvé la présence de tachyzoïtes dans de très nombreux types cellulaires incluant les neurones, les cellules de l'endothélium vasculaire, les macrophages alvéolaires, les cellules du myocarde, les hépatocytes, les cellules rénales, les trophoblastes du placenta (Barr *et al.* (5) ; Dubey *et al.* (45); Dubey *et al.* (46))

1.4.2.2. Description en microscopie électronique

Les tachyzoïtes sont de forme ovoïde, lunaire ou parfois globuleuse en fonction de leur stade de division. On les observe au mieux suite à une coloration May-Grünwald-Giemsa. On les retrouve au sein d'une vacuole parasitophore, qui inclut en outre des tubules. Lors de leur première description en 1988 (Dubey *et al.* (47)) cette vacuole parasitophore, fine et parfois invisible sur certaines préparations, n'avait pas été mise en évidence dans les prélèvements de foie et de derme étudiés. Sa présence fut démontrée un peu plus tard, toujours en 1988, par la même équipe (Dubey *et al.* (50)) lorsque le parasite fut isolé en culture cellulaire.

La taille du tachyzoïte est de 3 à 7 μm sur 1 à 5 μm en fonction de son stade de division. (45). On retrouve les mêmes organites que ceux contenus dans le bradyzoïte, à savoir : un conoïde, plusieurs micronèmes (jusqu'à 150), une mitochondrie, un nucléus et des rhoptries. On retrouve 6 à 16 rhoptries de densité homogène, dans chaque tachyzoïte, et parfois jusqu'à 6 rhoptries postérieurement au noyau. Des micropores n'ont été observés que sur culture *in vitro* et non *in vivo* (108).

1.4.3. Les oocystes

Les oocystes sont excrétés non sporulés dans les excréments de l'hôte définitif. Ils sont de forme sphérique ou sub-sphérique et mesurent en moyenne 11,7 sur 11,3 μm ; le ratio longueur sur largeur est de 1,04. Les oocystes de *Neospora caninum* ne contiennent ni micropyle, ni *residuum*. (Lindsay *et al.* (104))

Il n'y a pas de granules polaires, bien que, occasionnellement, on puisse retrouver des granules réfringents en microscopie électronique au niveau des sporozoïtes contenus dans l'oocyste (104).

Dans la majorité des observations, chaque oocyste contenait deux sporocystes, comme c'est le cas pour *Isospora*, ce qui rend les deux entités difficiles à distinguer. Cependant, des oocystes s'apparentant au genre *Caryospora*, avec un sporocyste et 8 sporozoïtes sont occasionnellement retrouvés.

Les sporocystes sont de forme ellipsoïdale et mesurent 8,4 μm sur 6,1 μm en moyenne. Le ratio longueur sur largeur pour les sporocystes est de 1,37. Un groupe de petites granules, formant un *residuum* sphérique à l'intérieur du sporocyste est fréquemment observé.

On retrouve 4 sporozoïtes dans chacun des sporocystes. Ceux-ci sont de forme allongés et mesurent 7 à 8 μm de longueur sur 2 à 3 μm de largeur.

Après excrétion, les oocystes de *Neospora caninum* sporule en 24 heures si les conditions sont optimales (37°C ou température ambiante) (104)

La différenciation formelle en microscopie entre les oocystes de *Neospora caninum* et les oocystes d'autres parasite proches tels que *Hammondia* ou *Toxoplasma* est actuellement impossible (166). Pour différencier ces différentes espèces, des tests génétiques (recherche d'ADN par PCR) ou des essais biologiques par inoculation à l'animal d'expérimentation sont obligatoires.

1.4.4. Variation inter-espèces

1.4.4.1. Différenciation entre *Neospora caninum* et *Neospora hughesi*

Marsh *et al.* décrivent pour la première fois une nouvelle espèce de *Neospora*, *Neospora hughesi*, propre au cheval, en 1998 (118). Le parasite isolé avait été obtenu par inoculation à l'animal d'expérimentation de cultures cellulaires de tissus nerveux d'un cheval californien. Il montrait des différences avec *Neospora caninum* au niveau de la séquence ITS1 du génome (7 nucléotides différents) ainsi que sur la morphologie des kystes tissulaires. Depuis, *Neospora hughesi* a été isolé sur un cheval en Oregon en 2001 (Dubey *et al.* (57)) et sur un cheval en Alabama en 2002 (Cheadle *et al.* (33))

Les critères de différenciation entre *Neospora caninum* et *Neospora hughesi* ont été rapportés par Dubey *et al.* en 2002 (45). Les tachyzoïtes de *Neospora hughesi* apparaissent morphologiquement similaires à ceux de *Neospora caninum*. Seuls 6 kystes ont été retrouvés dans le cerveau du cheval californien, ceux-ci mesuraient 6,9 à 16,0 sur 10,7 à 19,3 µm, et l'épaisseur de leur paroi était comprise entre 0,15 et 1,0 µm, ce qui est inférieur aux valeurs de l'épaisseur communément retrouvée pour *Neospora caninum*. Les bradyzoïtes mesuraient 4,4 à 5,8 sur 1,7 à 2,8 µm, et contenaient chacun 13 à 24 rhoptries (4 à 8 µm sur 1 à 2 µm pour *Neospora caninum*, avec 4 à 12 rhoptries). Il semblerait que les bradyzoïtes de *Neospora hughesi* soient plus grand que ceux de *Neospora caninum*. Aucun kyste tissulaire n'a été retrouvé sur le cheval de l'Oregon, et ils n'ont pas pu être retrouvés après infection expérimentale chez la souris et la gerbille (57).

Il semblerait d'ailleurs que la gerbille ne soit pas sensible à *Neospora hughesi*, alors qu'elle est sensible à *Neospora caninum* : les gerbilles inoculées ne déclenchent pas de maladie ; une séroconversion ainsi que quelques lésions tissulaires sont tout de même observées (57).

Les oocystes et l'hôte définitif de *Neospora hughesi* ne sont pas pour l'instant identifiés. Un essai d'infection du chien par ingestion de cerveau de souris contaminées par *Neospora hughesi* a échoué, mais seulement deux chiens ont été utilisés dans cette étude (Walsh *et al.* (180))

Génétiquement, les deux espèces *Neospora caninum* et *Neospora hughesi* sont clairement différentes. Les antigènes de surfaces de *Neospora hughesi* (SAG1, SRS2) ainsi que les protéines GRA6 et GRA7 diffèrent des protéines équivalentes de *Neospora caninum* (57 ; 180) et la séquence ITS1 de l'ADN de *Neospora caninum* montre des différences avec celle de *Neospora hughesi*.

1.4.4.2. Différentiation entre les souches bovines et canines de *Neospora caninum*

Lors des premières identifications de *Neospora caninum*, des différences morphologiques avaient été notées entre les observations faites chez le chien et les bovins. Il a été montré par la suite qu'aucune différence morphologique n'existait entre les parasites d'origine canine ou bovine (Jardine (91))

1.4.5. Resistance du parasite

Peu de données existent concernant la résistance du parasite dans l'environnement.

La forme tachyzoïte du parasite perd son caractère infectieux après passage dans l'acide peptique, ce qui n'est pas le cas de la forme bradyzoïte. Ce caractère du parasite a renforcé l'hypothèse d'un hôte définitif carnivore au début des recherches concernant le parasite (rapporté par Dubey *et al.* (64)). Les kystes tissulaires et bradyzoïtes semblent résister jusqu'à 10 jours à la réfrigération à 4°C : si on inocule à une souris KO (Knock Out) des kystes tissulaires conservés 7 et 10 jours à 4°C, celle-ci meure de néosporose aigue. Par contre ni lésions ni séroconversion ne sont notées si les kystes sont conservés 23 et 31 jours (Dubey *et al.* (65)). La congélation fait également perdre le caractère infectieux (rapporté par Dubey *et al.* (65))

Une autre étude montre que les oocystes perdent leur caractère infectieux après une conservation de 46 mois dans le l'acide sulfurique à 2% et à 4°C (Uzeda *et al.* (175))

1.5. *Neospora caninum* : agent de la néosporose chez les mammifères

1.5.1. Pathologie générale

Chez l'hôte intermédiaire, la multiplication des tachyzoïtes de *Neospora caninum* dans les différents tissus de l'organisme est capable d'induire la formation de lésions nécrotiques extensives en quelques jours. La principale manifestation de cette multiplication est la survenue de troubles de la reproduction, et particulièrement d'avortement, qui feront l'objet d'une étude spécifique.

En dehors des troubles de la reproduction, les troubles neuromusculaires sont le plus fréquemment rencontrés, par destruction d'un grand nombre de cellules nerveuses, dont les cellules des nerfs crâniens et périphériques, ce qui affecte en outre la conductivité des cellules lésées(55). La néosporose a également été associée, chez le chien, à des lésions de nécrose hépatique, nécrose pancréatique, pneumonie et dermatite pyogranulomateuse (28 ; 32; 48; 80 ; 103) Une exacerbation des lésions est associée à l'administration de corticostéroïdes.

La durée pendant laquelle les kystes tissulaires à bradyzoïtes peuvent persister dans l'organisme est inconnue, mais on retrouve des formes viables du parasite un an après infection expérimentale chez la souris. On retrouve parfois des granulomes entourant des kystes tissulaires dégénérescents ou des bradyzoïtes, ce qui laisse suggérer que certains kystes pourraient se rompre, d'où une réaction inflammatoire focale de la part de l'hôte (48).

Les symptômes associés à la néosporose sont surtout rencontrés chez de jeunes animaux infectés congénitalement. Chez la vache adulte, les troubles de la reproduction sont en effet les seuls symptômes observables. Les pics de fièvre biphasiques, observés chez des vaches, des chats, un cheval et des brebis après inoculation de *Neospora caninum* (Innes *et al.* (90) ; Dubey *et al.* (58) ; McDole et Gay (126) ; Macaldowie *et al.* (115)) n'ont jamais été rapportés dans les cas d'infections naturelles. A part chez le chat immunodéprimé – où deux décès sur trois chats inoculés sont survenus (Dubey *et al.* (58) – les animaux inoculés

expérimentalement avec des doses importantes de tachyzoïtes n'ont pas exprimé de symptômes cliniques autres que l'hyperthermie.

Chez le chien adulte, des cas d'atteinte neurologique, de pneumonie ou de dermatite sont exceptionnellement décrits, alors que des troubles neuromusculaires sont courants chez le jeune infecté de manière congénitale (103).

Bien qu'il n'existe pas de cas de transmission naturelle de néosporose chez les rongeurs, ceux-ci ont été largement utilisés pour diverses expérimentations. L'induction d'une néosporose clinique est difficile sans l'aide d'immunodépresseurs, comme la méthylprednisolone. Les rongeurs présentant une certaine résistance au parasite. Les souris « nude » et « knockout », déficiente en interféron γ ou lymphocytes B sont particulièrement sensibles à *Neospora caninum* et peuvent déclencher de véritable néosporose « aigue » (153). Lors de néosporose aigue, la pneumonie hystio-lymphocytaire est la lésion dominante, alors qu'en cas de néosporose subaigue ou chronique, les lésions touchant le système nerveux : méningo-encéphalite, encéphalite nécrotique et gliose multifocale dominant. La gerbille serait plus sensible que la souris au parasite, alors que des traitements immunosuppresseurs importants sont nécessaires pour infecter le rat. (Buxton *et al.* (30))

1.5.2. Aperçu des méthodes de diagnostic de la néosporose

1.5.2.1. Diagnostic histologique

Le diagnostic anatomo-pathologique est une procédure intéressante pour orienter le diagnostic de néosporose. En effet, la multiplication du parasite dans les tissus de l'hôte induit des lésions microscopiques typiques, nécrotiques et inflammatoires, retrouvées dans divers organes, mais surtout dans le système nerveux. Les lésions macroscopiques sont rares, mais peuvent être présentes dans le cerveau, le cœur, le foie des animaux atteints (avortons et jeunes) ((8) ; (17) ; (30) ; (37) ; (115) ; (136)). Les lésions spécifiques retrouvées lors d'infection congénitales seront développées par la suite.

L'examen de coupes histologiques d'organes peut également permettre la mise en évidence directe du parasite, par coloration à l'Hematoxyline et à l'Eosine (HE). Cependant, le nombre de parasites est généralement faible et *Neospora caninum* est un parasite difficile à reconnaître d'autres parasites proches comme *Toxoplasma gondii* et *Hammondia* sp (Dubey et Shares (63)).

1.5.2.2. Diagnostic immuno-histochimique

Le diagnostic par immuno-histochimie est plus à même de diagnostiquer directement des infections à *Neospora caninum*. Des anticorps poly et mono clonaux peuvent ainsi être employés pour révéler la présence d'antigènes du parasite sur des coupes histologiques tissulaires (63). Par immuno-histochimie, le parasite est le plus souvent retrouvé dans le cerveau et le cœur, mais moins souvent dans d'autres organes comme le placenta, peut être à cause de la forte concentration en peroxydase de ce dernier, qui nécessite un traitement spécifique (63).

Afin d'attribuer de manière certaine les lésions observées au parasite *Neospora caninum*, la viabilité du parasite devrait être démontrée, car il existe de nombreux animaux infectés asymptomatiques. Cependant, les essais d'isolement du parasite viable par culture cellulaire ou essai biologique sur animal d'expérimentation sont souvent suivis d'échec. Ainsi, des souches viables du parasite n'ont pu être isolées que pour une vingtaine de bovins analysés (Dubey et Schares (63)), quelques isolats de cheval, chien (Dubey *et al.* (49)) et de ruminants sauvages (voir tableau 1) ce qui est très faible par rapport au nombre de cas rapportés. Cet échec pourrait être dû au fait que le parasite meure le plus souvent en même temps que son hôte. Pour la réalisation de ces tests, les tissus infectés sont digérés dans de la trypsine ou de la pepsine, puis centrifugés, lavés et homogénéisés dans du sérum physiologique. La solution obtenue est ensuite mise en culture cellulaire ou mieux, injectée à l'animal d'expérimentation. La souris immunodéprimée serait la plus à même de déclencher la maladie. Ce diagnostic, même s'il apporte le plus de certitudes concernant l'infection, car démontre la présence de parasites pathogènes dans l'organisme étudié, est difficile à mettre en place de manière courante.

La PCR joue un rôle de plus en plus important dans le diagnostic des infections à *Neospora caninum*, car elle permet la détection directe la plus facile du parasite. La plupart des protocoles utilisés permettent la détection de l'ADN du parasite dans les tissus des avortons ou des hôtes intermédiaires, mais certains tests peuvent s'effectuer sur fluide amniotique ou cérébrospinal (Dubey et Schares, (63)) ou sur fèces de chien ou de coyote (Gondim *et al.* (77) et (78); Basso *et al.* (18)). Récemment (2003), l'identification d'ADN de *Neospora caninum* par PCR a été possible dans le colostrum (Moska *et al.* (134)) et le sperme de taureau (Ortega Mora *et al.* (138)). Il semblerait que le cerveau soit le plus à même d'être utilisé pour une détection du parasite par PCR, suivi du cœur, des poumons et des reins (63).

La détection de *Neospora caninum* par PCR repose sur l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN, appelée cible, par cycles successifs de dénaturation, hybridation et élongation, puis sa révélation. Différentes cibles ont été proposées pour le parasite *Neospora caninum*, la séquence 18S de l'ADN ribosomal, la séquence 28S de l'ADN ribosomal, le gène pNc5, la séquence ITS1. Pour la majorité des protocoles développés, une bonne spécificité a été retrouvée, et aucune amplification n'est survenue pour l'ADN de *Toxoplasma gondii* et de *Sarcocystis cruzi*, qui peuvent tout deux contaminer les mêmes hôtes intermédiaires (63). La plupart des tests ont été développés avant de connaître l'existence de *Neospora hughesi*, et depuis que le génome des séquences ITS1 et 28S (ADN ribosomal) de *Neospora hughesi* est connu, il semble évident qu'il diffère au moins par une paire de base de *Neospora caninum* pour ces séquences. Les PCR basées sur ces séquences cibles de *Neospora caninum* ne sont donc pas capable de détecter *Neospora hughesi*, ou alors avec une sensibilité moindre. Actuellement, il existe des tests PCR spécifiques de *Neospora caninum* pour lesquels l'ADN de *Neospora hughesi* n'est pas amplifié, mais aucune PCR spécifique de *Neospora hughesi* n'a été développée.

Les avantages et inconvénients de chaque méthode de diagnostic direct de *Neospora caninum* sont donnés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Comparaisons des différentes méthodes de diagnostic direct de
Neospora caninum
 Repris de Leleu (101) d'après Pitel *et al.* (144)

Technique	Avantages	Inconvénients	Prélèvements	Modalité de transport
Histologie	- Technique de référence - Visualisation des foyers de nécrose entourés de cellules inflammatoires - Eventuellement observation de tachyzoïtes ou kystes tissulaires - Coût modéré	- Très difficile si autolyse - Demande une habitude de lecture - Nécessité de plusieurs coupes, jamais exhaustives	- Encéphale - Cœur - Muscles squelettiques	- Formol - Liquide de Bouin
Immuno-histochimie	- Distinction de <i>Neospora</i> des autres Apicomplexa - Visualisation des lésions et du parasite - Utilisables chez les fœtus mommifiés	- Difficile si autolyse - Qualité de l'anticorps - Demande une habitude de lecture - Nécessité de plusieurs coupes, jamais exhaustives	- Encéphale - Cœur	- Formol - Liquide de Bouin
PCR	- Détection d'ADN à partir de nombreux tissus - Grande sensibilité et spécificité - Possible même si début d'autolyse	- Nécessite un matériel spécifique en laboratoire - Pas de visualisation des lésions	- Encéphale et cœur surtout - beaucoup de types tissulaires possibles	- Frais ou congelé, sous couvert du froid
Culture/inoculation	- Permet l'isolement du parasite et sa caractérisation - Mise en évidence du pouvoir pathogène	- Long, coûteux - Non applicable en routine, réservé à la recherche	- Encéphale - Cœur - Muscles squelettiques	- Frais, sous couvert du froid

La sérologie, sur sang, ou plus récemment sur le lait, et la méthode la plus couramment employée pour diagnostiquer l'infection à *Neospora caninum*. Les tests sérologiques ont l'avantage de pouvoir être réalisés de manière *ante-mortem* et d'apporter des indications concernant le stade de l'infection, par contre, ils ne sont que le témoin indirect de l'infection. Les anticorps (Immunoglobuline G, IgG et immunoglobuline M, IgM) apparaissent chez l'animal contaminés quelques jours seulement après l'infection primaire. Chez la vache, le taux d'IgM montre un pic deux semaines après l'infection, puis décline lentement, alors que le pic en IgG est atteint 3 à 6 mois après infection expérimentale (Uggla *et al.* (174) ; Trees *et al.* (172)). Les anticorps peuvent persister toute la vie de l'animal chez le bovin, et plus de 4 ans chez le chien, mais de manière fluctuante au cours de temps.

Actuellement, les deux types de tests majoritairement utilisés pour diagnostiquer une infection à *Neospora caninum* sont l'IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test) et l'ELISA (Enzyme Like Immunosorbent Assay). Il existe de nombreuses variantes de procédures pour ces tests, mais la plupart sont basées sur l'utilisation de souches bovines ou canines de tachyzoïtes issus de cultures cellulaires permettant la détection des anticorps présents dans le sérum et, depuis 2005, dans le lait ou le colostrum (Bjorkman *et al.* (26) ; Bartels *et al.* (15)).

1.5.2.5.1.

Test IFAT

Les antigènes utilisés en IFAT sont des tachyzoïtes entiers fixés sur lame. Cette technique demande une grande habitude de lecture, car seule la fluorescence complète du tachyzoïte doit être prise en compte. Elle reste cependant la technique de référence concernant la recherche sérologique de *Neospora caninum*. Cette technique détecte les anticorps dirigés contre la surface du tachyzoïtes, qui fournit de nombreux antigènes très spécifiques de *Neospora caninum*, ce qui a été démontré par l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Baszler *et al.* (19) ; Bjorkman et Hemphill (25)). Il est important de savoir que la détection d'anticorps par l'IFAT peut donner des faux positifs si le sérum fœtal bovin utilisé pour la culture cellulaire intermédiaire contient déjà des anticorps dirigés contre *Neospora caninum*. En raison de la forte prévalence de la néosporose subclinique, la plupart des sérums bovins

commercialisés contiennent ces anticorps (Dubey et Schares (63)). Un seul test IFAT est disponible dans le commerce (voir annexe 2 : méthodes de diagnostic commercialisées pour la détection de *Neospora caninum*)

1.5.2.5.2.

Test ELISA

De nombreux tests ELISA ont été décrits et développés pour la recherche des anticorps de *Neospora caninum* et sont disponibles dans le commerce (Voir annexe 2). Ces ELISA utilisent différents substrats : tachyzoïtes entiers ou fixés, extraits de tachyzoïtes solubilisés dans de l'eau ou dans des détergents, antigènes naturels ou recombinants de *Neospora caninum*. Les antigènes recombinants pourraient prendre une place plus importante dans le futur car ils sont plus facile à produire en grande quantité et autorisent une meilleure standardisation des résultats.

Récemment, des modifications ont été apportées pour améliorer la spécificité des tests ELISA, comme l'utilisation de complexes de stimulation immuns (Immuno Stimulating COMplex, pour ISCOM ELISA), d'anticorps monoclonaux spécifiques à certaines immunoglobulines ou à des antigènes de surfaces des tachyzoïtes, et de clones d'antigènes spécifiques de *Neospora*. En outre, une amélioration du test ELISA permet de mesurer l'avidité des immunoglobulines G (IgG), ce qui autorise ainsi à différencier les infections chroniques, à haute avidité des IgG, des infections aiguës, à faible avidité (Bjorkman *et al.* (27) ; Schares *et al.* (156))

Chez le cheval, les tests sérologiques utilisant des antigènes de *Neospora caninum* peuvent être utilisés pour détecter des anticorps dirigés contre *Neospora hughesi*, car il existe une antigénicité croisée entre les deux espèces de *Neospora* (Vardeleon *et al.* (177)). Récemment, un test ELISA utilisant un antigène recombinant spécifique de *Neospora hughesi*, l'antigène de surface 29-kDa (NhSAG1) a été développé et a montré une grande spécificité et une grande sensibilité, en comparaison avec les techniques d'immunoblotting (Hoane *et al.* (86)).

Des protocoles sont maintenant disponibles dans le commerce pour la recherche d'anticorps contre *Neospora caninum* dans le lait ou le colostrum, individuellement ou par

mélange sur lait de tank (15, 26). Ces tests seraient capables de détecter avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité une prévalence de 15% dans un troupeau (15). Deux de ces tests sont couramment disponibles en France et présentés en Annexe 3 et 4.

1.5.2.5.3.

Immunoblotting

Une technique d'immunoblotting a montré sa haute efficacité en matière de spécificité et de sensibilité, pour l'espèce bovine. Lors de l'immunoblotting, les protéines (ici antigènes de *Neospora*) sont tout d'abord séparées par électrophorèse, transférée sur un filtre (nitrocellulose le plus souvent) puis détectées immunologiquement à l'aide du sérum à tester. Différents antigènes dominants de *Neospora caninum* ont été identifiés (Bjerkas *et al.* (22)), qui donnent une réaction forte avec les sérums positifs. La réaction est meilleure avec les antigènes non dénaturées, ce qui laisse penser que la conformation des épitopes est impliquée dans la réponse immunitaire. (Dubey et Schares (63)) Cette technique est recommandée lorsque l'ELISA ou l'IFAT donne des résultats ambigus et elle peut être d'une aide cruciale pour interpréter d'éventuelles réactions croisées ou même pour différencier chez les nouveau-nés les anticorps d'origine maternelle ou fœtale. Cependant, ce test n'est pas utilisé de manière courante.

1.5.2.5.4.

Agglutination directe : NAT

Les tests d'agglutination directes (NAT : *Neospora* Agglutination Test, ou DAT : Direct Agglutination Test) qui ne nécessitent pas d'anticorps secondaires spécifiques d'espèce, sont également utilisés pour le diagnostic des affections à *Neospora caninum* (Romand *et al.* (155)). Un test d'agglutination est commercialisé par Vétquinol en France, il est présenté en annexe 5.

Pour de nombreuses espèces, la séropositivité vis-à-vis de *Neospora caninum* est considérée comme un caractère acquis à vie et il existe ainsi de nombreux infectés chroniques asymptomatiques. Trouver des anticorps anti-*Neospora caninum* ne signifie donc pas qu'un animal est atteint cliniquement de néosporose, mais que celui-ci a été en contact avec le parasite à un moment de sa vie. De plus, le taux peut fluctuer et devenir, de temps en temps, en dessous du seuil de détection (Pabon *et al.* (139)).

Cette notion même de seuil de positivité a été l'objet de nombreux débats. La difficulté concernant l'élaboration de seuil de positivité concernant l'infection à *Neospora caninum* est qu'il n'existe pas de standard auquel se référer, aucune méthode n'a été validée par la démonstration de parasites viables pour définir un animal positif (Dubey *et al.* (64)). Ce n'est que récemment que les méthodes de détection de *Neospora caninum* ont été évaluées et les seuils de positivité optimisés.

Pour la majorité des études comparatives, les différents tests utilisés avaient montré un haut degré de concordance négative ($P \geq 0,84$), mais un degré modéré de concordance positive ($P=0,25$ à $0,96$) (92, 100, 163, 179, 181), à mettre en relation avec l'utilisation de certains tests ELISA qui manquaient de spécificité.

Pour l'espèce canine, selon Silva et collaborateurs, dans une étude de 2007, (163) les tests ELISA utilisant des parasites entiers pour la détection des anticorps doivent être regardés avec circonspection, surtout si le titre en anticorps est faible. Cependant, les études menées sur les tests sérologiques utilisant des antigènes de *Neospora caninum* ont donné de bons résultats (Pinheiro *et al.* (143)).

Concernant l'IFAT, il est difficile de trancher concernant un seuil de positivité. En effet cette méthode dépend en grande partie de la qualité du matériel utilisé pour évaluer la fluorescence. En conséquence, il serait justifié que chaque laboratoire établisse sa propre valeur seuil (Schaes *et al.* (63)). En général, pour l'espèce canine, le seuil de 1/50 est choisi comme seuil de positivité et semble le plus approprié pour diagnostiquer une infection à *Neospora caninum* chez le chien (Cole *et al.* (51) ; Pinheiro *et al.* (143))

Depuis l'amélioration des tests, il semble que la plupart des méthodes employées dans le commerce soient de bonne qualité pour explorer la prévalence vis-à-vis de *Neospora caninum* dans une population bovine (Von Blumröder *et al.* (181)) ou canine (Pinheiro *et al.* (143)) et que les réactions croisées avec les antigènes de *Toxoplasma gondii* ou *Sarcystis* sp., si elles surviennent, sont désormais mineures (Lally *et al.* (100)).

Une étude de 2008 a comparé les résultats de l'IFAT avec ceux de la PCR quantitative. Il semblerait que l'IFAT sous estimerait la séroprévalence des populations canines : sur les 32 PCR positives, seules 8 ont donné un résultat positif par IFAT, ce qui serait peut-être dû au fait que les infections chroniques, où le parasite est enkysté, ne stimulent pas assez le système immunitaire (Ghalim *et al.* (73)).

Une synthèse des avantages et limites des différents tests de diagnostic indirect est donnée dans le tableau 7.

Tableau 7 : Comparaisons des différentes méthodes de diagnostic indirect de *Neospora caninum*

Repris de Leleu (101), d'après Pitel *et al.* (144)

Technique	Avantages	Limites	Prélèvements
IFAT	- Méthode sérologique de référence - Rapide et peu coûteux	- Lecture subjective nécessitant une certaine expérience - Seuil non standardisé	- Sérum
ELISA	- Automatisation possibles - Diversité des kits commercialisés - Réalisable sur lait	- Seuil non standardisé	- Sérum - Lait, colostrum
NAT	- Spécifique et très sensible - Pas de réactif spécifique d'espèce	- Nécessité d'un nombre important de tachyzoïtes	- Sérum
Western Blot	- Très spécifique et très sensible - Permet de décrire l'intensité de la réponse	- Long, coûteux, uniquement utilisé pour la recherche	- Sérum - Fluides fœtaux

1.6. *Neospora caninum* : séroprévalence générale

La séroprévalence vis-à-vis de *Neospora caninum* a été évaluée chez le chien, le bovin et de nombreuses espèces domestiques ou appartenant à la faune sauvage.

Même si l'ensemble des données ne peut être comparé, du fait de la diversité des tests et des seuils de positivité utilisés, les études de séroprévalence réalisées montrent tout de même que le parasite *Neospora* est présent sur les 5 continents et touche de nombreuses espèces.

1.6.1.1. Séroprévalence de *Neospora caninum* dans l'espèce bovine

La séroprévalence de *Neospora caninum* dans l'espèce bovine est donnée dans le tableau 8 pour les vaches laitières et 9 pour les vaches allaitantes (repris de Dubey (64))

Une étude internationale européenne de 2006 a permis de lever le biais de comparabilité des prévalences, en étudiant à l'aide d'un test ELISA standardisé la séroprévalence intra-troupeau, inter-troupeau et individuelle de la néosporose bovine en Allemagne, au Pays-Bas, en Espagne et en Suède (Bartels *et al.* (14)). Dans cette étude, des différences considérables de prévalences ont été obtenues entre les troupeaux, mais aussi au sein des troupeaux en fonction du pays, de la région, du type d'élevage, de l'âge et de la race. Ainsi, la prévalence individuelle réelle de la maladie (estimation de Rogan Gladen) varie de 0,5% en Suède, à 16,2% en Espagne, alors que la prévalence de troupeaux atteints varie de 30% en Suède à 80% de troupeau atteint au Pays-Bas. Dans cette même étude, la prévalence individuelle de la maladie apparaît comme plus élevée pour les bovins laitiers par rapport aux bovins allaitants en Allemagne et au Pays-Bas (respectivement 4,1%, 13,3%, 15,8% de bovins laitiers atteints en Allemagne, Pays-Bas et Espagne, contre 1,6%, 9,9% 16,2% de bovins allaitant). Pour chaque pays, des facteurs ont pu être associés significativement à des différences de séroprévalence, tels que l'âge, la race, mais ils n'ont pas été retrouvés entre les pays.

Tableau 8 : Prévalence sérologique des anticorps de *N. caninum* chez les vaches laitières
Repris de Dubey *et al.* (64)

Pays	Région	Nombre d'animaux (détails révélateurs)	Nombre de troupeaux	% positif	Test	Titre/nom commercial
Argentine	La Plata La Plata	33	3	51,5	IFAT	1 :800
		189 (avortement)	19	64,5	IFAT	1 :25
		1048	52	16,6	IFAT	1 :200
		750 (avortement)	49	43,1	IFAT	1 :200
Australie	Nouvelles Galles du Sud	266	1	24	IFAT	1 :160
	Nouvelles Galles du Sud	266	1	10,2	ELISA	POURQUIER
Belgique		711	52	12,2	IFAT	1 :200
Brésil	Bahia	447	14	14,0	IFAT	1 :200
	Goiás	444	11	30,4	IFAT	1 :250
	Minas Gerais	584	18	18,7	ELISA	IDEXX
	Minas Gerais	476	15	12,6	ELISA	IDEXX
	Minas Gerais	100	3	46,0	ELISA	IDEXX
	Minas Gerais	126		34,4	IFAT	1 :25
	Minas Gerais	243	2	16,8	ELISA	IH-ISCOM
	Mato Grosso do Sul	23		21,7	IFAT	1 :25
	Paraná	165 (avortement)	1	42,1	ELISA	IDEXX
	Paraná	172	1	34,8	ELISA	IDEXX
	Paraná	623	23	14,3	IFAT	1 :25
	Paraná	75		21,3	IFAT	1 :25
	Paraná	385	90	12,0	IFAT	1 :200
	Rio Grande do Sul	223 (avortement)		11,2	IFAT	1 :200
	Rio Grande do Sul	1 549	60	17,8	IFAT	1 :200
	Rio Grande do Sul	70		18,6	IFAT	1 :25
	Rio Grande do Sul	781 (laitières et allaitantes)		11,4	ELISA	CHEKIT
	Rio de Janeiro	75		22,7	IFAT	1 :25
	Rio de Janeiro	563	57	23,2	ELISA	IDEXX
	Rondônia	1 011	50	11,2	IFAT	1 :25
	São Paulo	150		27,3	IFAT	1 :25
	São Paulo	521		15,9	IFAT	1 :200
	São Paulo	521		30,5	ELISA	IDEXX
	São Paulo	408		35,5	ELISA	IDEXX
Canada	Alberta	2 816	77	18,5	ELISA	IDEXX
	Manitoba	1 204	40	8,3	ELISA	IDEXX
	New Brunswick	900	30	25,5	ELISA	WT-IHCA
	Nova Scotia	900	30	21,3	ELISA	WT-IHCA
	Ontario	758	25	6,7	ELISA	WT-IHCA
	Ontario	3 412	56	7,0	ELISA	WT-IHCA
	Ontario	3 702	82	12,1	ELISA	WT-IHCA
	Ontario	3 162	57	10,5	ELISA	WT-IHCA
	Ontario	9 732	125	11,2	ELISA	WT-IHCA
	Ontario, Prince Edward, Island, New Brunswick, Nova Scotia	3 531	134	12,7	ELISA	WT-IHCA
	Ontario	930	31	8,2	ELISA	BIOVET
	Prince Edward Island	900	30	10,4	ELISA	WT-IHCA
	Québec	437	11	9,8	ELISA	BIOVET
	Québec	2 037	23	21,9	ELISA	BIOVET
	Québec	3 059	46	16,6	ELISA	WT-IHCA
	Saskatchewan	1 530	51	5,6	ELISA	BIOVET
Pays	Région	Nombre	Nombre de	%	Test	Titre/nom

		d'animaux (détails révélateurs)	troupeaux	positif		commercial
Chili	9 régions	198 173	1 1	15,7 30,2	IFAT IFAT	1 :200 1 :200
Costa Rica		3 002 2 743	20 94	39,7 43,3	ELISA ELISA	WT-IHCA WT-IHCA
République Tchèque		407 (avortement) 463 (avortement)	5 137	3,1 3,9	IFAT ELISA	1 :200 IDEXX
Danemark		1 561	31	22,0	ELISA, IFAT	IH-ISCOM
France	Normandie	575 1 924 895 1 373 1 170 2 141	42 13 12	26,0 5,6 26,0 10,4 11,1 17	ELISA ELISA ELISA ELISA ELISA ELISA	IDEXX IDEXX IDEXX IDEXX IDEXX IDEXX
Allemagne		388 (problèmes de fertilité) 1 357 100 4 261	22 1 100	4,1 6,8 27,0 1,6	IFAT ELISA IFAT ELISA	1:400 IDEXX 1 :50 IH-p38 (lait)
Hongrie		97 (avortement) 518	 39	10,0 3,3	ELISA IFAT	IH-ISCOM 1 :100
Iran	Mashhad Mashhad	810 (avortement) 337	4 30	15,1 46,0	IFAT ELISA	1 :200 IDEXX
Irlande		324 (avortement) 165 (contrôle)		12,6 3,0	IFAT IFAT	1 :640 1 :640
Italie	Parme Potenza, Patuna Alpes italiennes Italie du Sud	5 912 (avortement) 820 (avortement) 880 (avortement) 387 864 350	 85 81 35	24,4 28,7 14,0 11,4 30,8 18,8	IFAT IFAT IFAT ELISA ELISA ELISA	1 :640 1 :160 1 :160 CHEKIT IDEXX MASTAZYME
Japon	 Pays en entier	145 (avortement) 2 420	 	20,0 5,7	IFAT IFAT	1 :200 1 :200
Corée	9 provinces	793 895 (avortement) 492 852	168 30	20,7 48,7 23,0 12,1	IFAT IFAT ELISA ELISA	1 :200 1 :200 IgG-IH IH-Ncp43P
Mexique	Aguascalientes Coahuila, Chihuahua Hidalgo, Queterado, Jalisco Coahuila Nuevo Leon Tamaulipas	187 (avortement) 813 (avortement) 12 18 11	13 20 50 185 262 144	59,0 42,0 56,0 45,0 40,0 16,0	ELISA ELISA ELISA ELISA ELISA ELISA	IDEXX IDEXX WT-IH WT-IH WT-IH WT-IH
Pays-Bas		2 430 6 910	18 108	39,4 9,9	ELISA ELISA	WT-IH WT-IH
Nouvelle Zélande		77 (avortement) 97 (avortement) 800 194 (avortement) 600 (avortement) 1 199 (avortement) 164 (avortement)	1 1 40 1 1 3 1	46,7 30,7 7,6 53 50 33,6 10,9	IFAT IFAT ELISA ELISA ELISA IFAT IFAT	1 :200 1 :200 WT-IH WT-IH WT-IH 1 :200 1 :200
Paraguay		297	6	35,7	ELISA	WT-IH
Chine		262	9	17,2	ELISA	CIVTEST

Pays	Région	Nombre d'animaux (détails révélateurs)	Nombre de troupeaux	% positif	Test	Titre/nom commercial
Pologne		45 (avortement) 416	6 32	15,6 9,3	ELISA ELISA	IDEXX IDEXX
Portugal		119 (avortement) 114 1 237 (avortement)	1 49 36	49,0 28,0 46,0	ELISA NAT NAT	IDEXX 1 :40 1 :40
Russie		391	8	9,9	ELISA	
Slovaquie		105 (avortement)		22,2	ELISA	IDEXX
Espagne		889 1 121 237 (avortement) 185 (éleveur de taureaux) 3 360 2 773 1 970 (avortement)	43 143 1 291 6 3	30,6 36,8 35,4 11,2 11,2 13,3 16,2 15,1 12,0	ELISA ELISA ELISA IFAT ELISA ELISA ELISA ELISA ELISA	WT-IHCA WT-IH IDEXX 1 :50 CIVTEST IDEXX CIVTEST CIVTEST CIVTEST
		1 331	2	26,8	ELISA	CIVTEST
Suède		70 (avortement) > 1 300 4 252 780	1 14 112	63,0 5,8-65 1,3 2	ELISA ELISA ELISA ELISA	IH-ISCOM IH-ISCOM IH-ISCOM IH-ISCOM
Taïwan		613	25	44,9	IFAT	1 :200
Thaïlande	11 provinces	904 549 83 164	59 16 11	6 5,5 37,5-70 15	IFAT ELISA IFAT ELISA	1 :200 VMRD 1 :100 IH-ISCOM
Turquie	Ankara Anatolie Gebze Kars Kars Thrace Sakarya Sanliurfa	60 3 287 97 228 (local) 73 (importé) 274 92 305	32 14 3 6	10,0 13,9 5,0 0 8,2 8,0 9,2 7,5	ELISA ELISA ELISA ELISA ELISA ELISA ELISA ELISA	VRMD IDEXX VMRD MASTAZYME MASTAZYME IDEXX VMRD VMRD
Royaume Uni		95 (avortement) 4 295	1 14	60 17,1	ELISA ELISA	MASTAZYME MASTAZYME
Etats Unis	Californie Californie Californie Californie Géorgie Maryland 5 régions Oklahoma Texas	176 277 285 254 327 1 029 4 907 1 000 87	1 1 2 1 3 1 93 laitières, 5 allaitantes 16 2	34,0 43,0 40,4 60,6 32,1 28,0 16,0 14,7 10,3	IFAT IFAT ELISA ELISA IB IFAT ELISA ELISA IB	1 :640 1 :640 WT-IHCA WT-IHCA Lait 1 :200 IDEXX IDEXX Lait
Uruguay		155	1	61,3	IFAT	1 :200
Vietnam		200	> 30	5,5	ELISA	IH-ISCOM

Tableau 9 : Prévalence sérologique des anticorps de *N. caninum* chez les vaches
allaitantes
Repris de Dubey *et al.* (64)

Pays	Région	Nombre d'animaux (Détails révélateurs)	Nombre de troupeaux	% positif	Test	Titre/nom commercial
Andorre		65 1 758	1 26	9,2 7,4	ELISA ELISA	CIVTEST CIVTEST
Argentine		400 216 (avortement) 305 (taureaux) 290 (avortement)	17 39 19 1	4,7 18,9 4,9 20,3	IFAT IFAT IFAT IFAT	1 :200 1 :200 1 :200 1 :200
Australie	Queensland	1 673	45	14,9	IFAT	1 :200
Belgique		93		14	IFAT	1 :200
Brésil	Goiás Mato Grosso do Sul Mato Grosso do Sul Minas Gerais Paraná Rio de Janeiro Rio Grande do Sul Rondônia São Paulo São Paulo São Paulo et Minas Gerais	456 241 87 36 15 75 70 584 505 777 600	9 11 8	29,6 26,1 29,9 11,1 26,7 6,7 21,4 9,5 20,0 15,5 16,8	IFAT ELISA IFAT IFAT IFAT IFAT IFAT IFAT ELISA IFAT IFAT	1 :250 IDEXX 1 :25 1 :25 1 :25 1 :25 1 :25 1 :25 IDEXX 1 :200 1 :200
Canada	Alberta Alberta Manitoba Provinces de l'ouest	1 806 1 976 (boeufs) 1 425 2 484	174 4 lots 49 200	9,0 6,5 9,1 5,2	ELISA ELISA ELISA ELISA	IDEXX IDEXX IDEXX BIOVET
Allemagne		2 022	106	4,1	ELISA	IH-p38
Hongrie		545	49	1,8	IFAT	1 :100
Italie	Potenza, Paduna	385	39	6,0	ELISA	CHEKIT
France		219		4,1	ELISA	ND
Japon		65		1,5	IFAT	1 :200
Corée	9 provinces	438		4,1	IFAT	1 :200
Mexique	Linares Pesqueria	29 30	2 1	10 10	ELISA ELISA	WT-IH WT-IH
Pays-Bas		1 601	82	13,3	ELISA	WT-IH
Nouvelle Zélande		499	40	2,8	ELISA	WT-IH
Paraguay		582	5	26,6	ELISA	WT-IH
Espagne		1 712	216	17,9	ELISA	WT-IH
	Galice	2 407	372	15,8	ELISA	CIVTEST
Etats Unis	Etats de l'ouest Texas Nebraska Dakota du Nord	2 585 1 009 208 (avortement) 212	55 92 1 7	23,0 12,9 79,0 5,2	ELISA NAT ELISA ELISA	VMRD 1 :80 IH-ISCOM IDEXX
Uruguay		4 444	229	13,9	ELISA	WT-IH

La séroprévalence de *Neospora caninum* dans l'espèce canine est donnée dans le tableau 10 (repris de Dubey (64))

Entre les différentes études, il apparaît que les animaux vivant en milieu rural sont plus atteints que ceux vivants en milieu urbain. Par exemple, en Italie du Nord, dans une étude de 2007, la prévalence (test ELISA) de *Neospora caninum* est de 14,6% pour les chiens vivants en chenil, contre 43% pour ceux vivant à proximité d'une ferme et on note une association entre la séroprévalence et l'augmentation de l'âge. (Paradies *et al.* (140)). Dans le Nord Ouest de l'Italie, la même corrélation avec le milieu de vie est retrouvée : les séroprévalences (Test NAT, *Neospora* Agglutination Test) aux dilutions 1/40, 1/80 et 1/160 étaient significativement plus élevées en milieu rural (36,4%, 19,5%, 9,9% respectivement pour les 302 chiens), qu'en milieu urbain (20,2%, 10,6%, 4,8% respectivement, pour les 188 chiens) (Ferroglia *et al.* (68)). En 2001, une corrélation a pu être faite en Allemagne entre la séroprévalence vis à vis de *Neospora caninum* et l'existence de troubles cliniques évoquant une néosporose : 4% de séropositivité dans le groupe témoin, contre 13% dans le groupe suspect clinique (Klein et Müller (96)). Par contre, aucune association n'a pu être faite entre la séroprévalence et le sexe (Cheadle *et al.* (32)). Rappelons que cette séroprévalence pourrait être sous-estimée par rapport à l'infection réelle déterminée par PCR (73)

Tableau 10 : Prévalence des anticorps de *N. caninum* chez le chien
Repris de Dubey *et al.* (64)

Pays	Région	Type	Nombre de tests	% positif	Test	Titre
Argentine	Province de Buenos Aires	Ville	160	26,2	IFAT	1 :50
		Elevage laitier	125	48,0	IFAT	1 :50
		Elevage allaitant	35	54,2	IFAT	1 :50
	La Plata	Compagnie	97	47,4	IFAT	1 :50
Australie	Melbourne		207	5,0	IFAT	1 :50
	Sydney		150	12,0	IFAT	1 :50
	Perth		94	14,0	IFAT	1 :50
Autriche		Campagne	433	5,3	IFAT	1 :50
		Ville	381	2,1	IFAT	1 :50
		Inconnu	956	3,3	IFAT	1 :50
Belgique		Elevage laitier	56	46,4	ELISA	VMRD
				26,8	IFAT	1 :100
		Clinique	84	18,4	ELISA	VMRD
		Asymptomatique		9,7	IFAT	1 :100
		Malade	71	22,2	ELISA	VMRD
	Anvers	Aléatoire	100	11,0	IFAT	1 :100
	Gand	Clinique	100	11,0	IFAT	1 :50
	Gand	Aléatoire	100	12,0	IFAT	1 :50
Brésil	Bahia	Compagnie errant et	415	12,0	IFAT	1 :50
	Mato Grosso do Sul	Ville	345	27,2	IFAT	1 :50
	Mato Grosso do Sul	Compagnie	245	26,5	IFAT	1 :50
	Mato Grosso do Sul	Campagne	40	30,0	IFAT	1 :50
	Maranhão	De rue	100	45,0	IFAT	1 :100
	Minas Gerais	Ville	300	10,7	IFAT	1 :50
	Minas Gerais	Péri-urbain	58	18,9	IFAT	1 :50
	Minas Gerais	Campagne	92	21,7	IFAT	1 :50
	Minas Gerais	Clinique	163	6,7	IFAT	1 :50
	Minas Gerais	Clinique	275	7,9	ELISA	WT-IH
	Minas Gerais	Errant	94	12,8	ELISA	WT-IH
	Minas Gerais	Clinique, errant	300	10,7	IFAT	1 :25
	Paraíba	Domestique	286	8,4	IFAT	1 :50
	Paraná	Elevage laitier	134	21,6	IFAT	1 :50
	Paraná	Ville, neurologique	31	0	IFAT	1 :50
	Paraná	Elevage ovin	24	29,1	IFAT	1 :50
	Rondônia	De rue	157	8,3	IFAT	1 :25
	Rondônia	De rue	174	12,6	IFAT	1 :50
	São Paulo	Elevage allaitant	39	58,9	IFAT	1 :50
	São Paulo	Compagnie	500	10,0	NAT	1 :25
	São Paulo	De rue	611	25,0	NAT	1 :25
	São Paulo	Campagne et ville	295	8,4	IFAT	1 :50
	São Paulo	Ville	204	17,6	IFAT	1 :50
Chili	9 régions	Campagne	81	25,9	IFAT	1 :50
		Ville	120	12,5	IFAT	1 :50
		Elevage laitier	7	57	IFAT	1 :50
République Tchèque			80	1,3	ELISA	IH-ISCOM
			858	4,9	IFAT	1 :50
Danemark		Compagnie	98	15,3	IFAT	1 :160

Pays	Région	Type	Nombre de tests	% positif	Test	Titre
Allemagne		Clinique	200	13,0	IFAT	1 :50
		Normal	50	4,0	IFAT	1 :50
Iles Falkland			500	0,2	IFAT	1 :50
France		Elevage laitier	22	22,7	IFAT	1 :100
Hongrie		Campagne	249	6,0	IFAT	1 :80
		Ville	402	1,0	IFAT	1 :80
Iran		Campagne	50	20,0	IFAT	1 :50
		Ville	50	46,0	IFAT	1 :50
Italie	Campania	Compagnie	1 058	6,4	IFAT	1 :50
	Campania Parma	Compagnie	194	28,9	IFAT	1 :50
		Compagnie	282	18,1	IFAT	1 :50
	Veneto	Chenil et compagn.	707	10,9	ELISA	VMRD
	Italie du Sud	Chenil	144	14,6	ELISA	MASTAZYME
		Ferme	162	26,5	ELISA	MASTAZYME
Japon		Ville	198	7,1	IFAT	1 :50
		Elevage laitier	48	31,3	IFAT	1 :50
Kenya		Campagne	140	0	IFAT	1 :50
Corée		Ville	289	8,3	IFAT	1 :50
		Elevage laitier	51	21,6	IFAT	1 :50
Mexique	Hidalgo	Ferme	27	51	ELISA	IDEXX
	Hidalgo	Ville	30	20	ELISA	IDEXX
Pays Bas		Ville	344	5,5	ELISA	WT-IH
		Ferme	152	23,6	ELISA	WT-IH
Nouvelle Zélande		Ville	150	76,0	IFAT	1 :50
		Elevage laitier	161	97,5	IFAT	1 :50
		Elevage bovin/ovin	154	100	IFAT	1 :50
		Ferme	200	22	IFAT	1 :40
Roumanie	Cluj Napoca	Errant	56	12,5	IFAT	ND
Espagne	Catalogne	Compagnie	139	12,2	IFAT	1 :50
Suède		Compagnie	398	0,5	ELISA	IH-ISCOM
Suisse		Compagnie	1 080	7,3	ELISA	WT-IH
		Elevage laitier	30	20	ELISA	WT-IH
Taiwan		Elevage laitier	13	23	IFAT	1 :50
Tanzanie		Campagne	49	22	IFAT	1 :50
Thaïlande		Elevage laitier	82	1,2	ELISA	VMRD
Turquie	Bursa, Adana	Compagnie	150	100	IFAT	1 :50
Royaume Uni		Compagnie	104	5,8	IFAT	1 :50
		Compagnie	163	16,6	IFAT	1 :50
Etats Unis	Kansas	Compagnie	229	2	IFAT	1 :50
	35 états	Compagnie	1 077	7	IFAT	1 :50
Uruguay			414	20	IFAT	1 :50

1.6.1.3. Séroprévalence de *Neospora hughesi* dans l'espèce équine

La séroprévalence de *Neospora hughesi* dans l'espèce équine est donnée dans le tableau 11 (repris de Dubey (63)).

Dans une étude de 2007 de Kliger *et al.* portant sur 892 chevaux en Israël (97), la séropositivité (IFAT) était significativement supérieur pour les animaux souffrant de signes neurologiques (21,2%) et pour les juments ayant avorté (37,5%) que dans la population générale (11,9%). Dans une étude portant sur 536 sérums de chevaux en Alabama, en 1999 (Cheadle *et al.* (33)) une séroprévalence de 11,5% a été notée dans la population générale.

Une association entre l'âge et la séropositivité est également rapportée (97).

1.6.1.4. Séroprévalence de *Neospora caninum* chez d'autres espèces domestiques

La séroprévalence de la néosporose a été évaluée chez de nombreuses espèces domestique, et montre que l'infection peut toucher un très grand nombre d'hôte. Celle-ci est rapportée dans le tableau 11.

Tableau 11 : Prévalence des anticorps de N. caninum chez les animaux domestiques en dehors des chiens et des bovins
Repris de Dubey *et al.* (64)

Hôte	Localisation	Nombre examinés (Détails révélateurs)	% Positif	Test	Titre
Chat domestique (<i>Felis catus</i>)	Brésil	502	11,9	NAT	1 :40
	Brésil	400	24,5	IFAT	1 :16
	Italie	282	31,9	NAT	1 :40
Chameau (<i>Camelus domesticus</i>)	Egypte	161	3,7	NAT	1 :40
	Iran	120	5,8	IFAT	1 :20
Cochon (<i>Sus scrofa</i>)	Allemagne	2 041 (94 fermes)	3,3 0,04	ELISA ELISA/ IB	WT-IH
	Royaume Uni	454	0	IFAT	1 :50
Mouton (<i>Ovis aries</i>)	Rio Grande do Sul, Brésil	62	3,2	ELISA	CHEKIT
	Paraná, Brésil	305	9,5	IFAT	1 :50
	São Paulo, Brésil	597	9,2	IFAT	1 :50
	Suisse	117	10,3	IFAT	1 :160
	Royaume Uni	660 (avortements)	0,45	IFAT	1 :50
	Italie	1 010	2	ELISA	CHEKIT
Chèvre (<i>Capra hircus</i>)	Costa Rica	81	6,1	IFAT	1 :100
	Sri Lanka	486	0,7	ELISA	WT-IH
	São Paulo, Brésil	394	6,4	IFAT	1 :50
	Taiwan	24	0	IFAT	1 :200
Lama (<i>Lama glama</i>)	Pérou	81	1,2	IB	
	Pérou	73	32,9	IFAT	1 :50
	Allemagne	20	0	IB	
Alpaga (<i>Vicugna pacos</i>)	Pérou	657	2,6	IB	
	Pérou	78	35,9	IFAT	1 :50
	Allemagne	12	0	IB	
	Minnesota	61	13,1	IFAT	1 :50
Vigogne (<i>Vigogna vigogna</i>)	Pérou	114	0	IB	
Buffle de l'Inde (<i>Bubalus bubalis</i>)	São Paulo, Brésil	222	53,0	NAT	1 :40
	Pará, Brésil	196	70,9	IFAT	1 :25
	São Paulo, Brésil	411	56,0	IFAT	1 :200
	Rio Grande do Sul, Brésil	164	14,6	ELISA	CHEKIT
	Egypte	75	60,0	NAT	1 :40
	Campana, Italie	1 377	34,6	IFAT	1 :200
	Chine	40	0	ELISA	CIVTEST
	Vietnam	200	1,5	IFAT	1 :640

Tableau 11, suite

Hôte	Localisation	Nombre examinés (Détails révélateurs)	% Positif	Test	Titre
Cheval <i>(Equus caballus)</i>	Argentine	76	0	NAT	1 :40
	Plusieurs régions, Brésil	101	0	NAT	1 :40
	Plusieurs régions, Brésil	961	2,5	ELISA	NhSAG1
	Paraná, Brésil	36	47,0	IFAT	1 :50
	São Paulo, Brésil	1 106	10,3	IFAT	1 :50
	Régions VIII, IX, Chili	145	32,0	NAT	1 :40
	France	434	23,0	NAT	1 :40
	France	50	6,0	NAT	1 :100
	France	54 (avortement)	50,0	NAT	1 :40
	France	45 (aléatoire)	77,7	NAT	1 :40
	France	76 (aléatoire)	77,6	NAT	1 :40
	Caserta, Naples, Salerno, Italie	150	28,0	IFAT	1 :50
	Ile Jeju, Corée du Sud	191	2,0	IFAT	1 :50
	Suède	414	9,0	ELISA	IH-ISCOM
	Suède		1,0	IB	
	Alabama	536	11,5	IFAT	1 :50
	Texas, Nebraska	296	21,3	NAT	1 :40
	5 régions géographiques, Etats-Unis	208	17,0	IFAT	1 :100
	Washington	160 (normal)	8,0	IFAT	1 :50
	Washington	276	13,0	IFAT	1 :50
	Wyoming	1 917	31,1	NAT	1 :25
	Plusieurs états, Etats Unis		30,4	ELISA	NhSAG1

1.7. *Neospora caninum* : un impact majeur sur l'économie

L'évaluation des pertes économiques liées à *Neospora caninum*, qui n'a été effectuée que pour l'élevage bovin, doit regrouper à la fois les pertes directes, les coûts de traitements et de diagnostics (Chi *et al.* (34) ; Trees *et al.* (171)). Concernant les pertes directes, il faut prendre en compte à la fois les pertes liées aux avortements (mortalité fœtale) et à la baisse des performances de reproduction, mais aussi les pertes liées à une mise à la réforme anticipée. En effet, il est apparu qu'en moyenne, les vaches séropositives étaient réformées relativement plus tôt que les vaches séronégatives (risque 1,6 fois plus élevé d'être réformée pour une vache séropositive, Dubey *et al.* (63)), ce que l'on peut rapprocher du fait que les vaches avortant sont généralement réformées plus tôt. En analysant l'ensemble de ces paramètres, Chi et ses collaborateurs (34) ont évalué en 2002 pour un troupeau de 50 têtes, à 2304 dollars par an les pertes liées à la néosporose au Canada (contre 2421 dollars par an pour la maladie des muqueuses bovine BVD)

En Californie, les pertes liées aux avortements à *Neospora caninum* sont évaluées à 35 millions de dollars par an, en Australie et en Nouvelle Zélande, elles attendraient plus de 100 millions de dollars australien par année. En Suisse, les pertes économiques dues à *Neospora* sont estimées 9,7 millions d'euros par an, pour les troupeaux laitiers (Haesler *et al.* (81)). Au Pays-Bas, les pertes attendraient 2000 euros par an pour certains troupeaux, avec jusqu'à 50 euros par animal pour les deux ans suivant une épidémie d'avortements dans un troupeau, pertes directes liées à la mortalité fœtale exclues. (Repris de Dubey *et al.* (63))

L'importance des pertes économiques liées à la Néosporose en élevage incite à contrôler et à connaître au mieux cette maladie et surtout son influence sur la reproduction, qui est la fonction la plus touchée. De plus, les calculs appliqués à l'espèce bovine pourraient être étendus à toute espèce touchée par *Neospora caninum*, d'où l'importance des recherches concernant ce parasite.

2. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez les bovins, un modèle d'étude concernant l'influence du parasite sur la reproduction

2.1. *Neospora caninum* chez les bovins, une transmission particulièrement efficace à la descendance

2.1.1. Première mise en évidence d'une transmission verticale

Historiquement, Thilsted et Dubey sont les premiers à rapporter l'existence d'un organisme s'apparentant à *Neospora caninum* dans le tissu cérébral d'un fœtus provenant d'un troupeau atteint d'avortements à répétition au Nouveau Mexique, en 1989 (167). Le diagnostic était alors basé sur la découverte de quelques petits kystes tissulaires ressemblant à ceux de *Toxoplasma gondii* et sur l'exclusion de toute autre cause possible. La toxoplasmose avait été écartée du diagnostic car ce n'était pas un facteur reconnu d'avortements chez les bovins et les vaches ayant avorté parmi le troupeau ne possédaient pas d'anticorps anti-*Toxoplasma*. Le diagnostic final a pu être fait rétrospectivement une fois que les tests sérologiques vis-à-vis de *Neospora caninum* furent développés (55).

Barr *et al.* (8) furent les premiers à reconnaître en 1990 les avortements à protozoaire comme une cause épidémiologique majeure d'avortement. Entre 1987 et 1989 en Californie, sur 445 avortons, 82 ayant des lésions d'encéphalite, de myocardite, ou des parasites tissulaires visibles furent sélectionnés. Des protozoaires, d'abord non identifiés, purent être retrouvés histologiquement pour 21% de ces fœtus. Par la suite, en 1991, 66 fœtus parmi les 80 sélectionnés (2 fœtus non analysés), donnèrent une réponse positive aux tests de recherche sérologique de *Neospora caninum* (Barr *et al.* (9)).

En 1992, la transmission du parasite au cours de la gestation a pu être étudiée et vérifiée de manière expérimentale (Dubey *et al.* (56)) Depuis, le potentiel de transmission de *Neospora caninum* par voie transplacentaire est maintenant une donnée acquise.

De manière rétrospective il semble que le premier cas rapporté de néosporose bovine soit celui d'un veau mort-né en Australie, en 1974 (Raporté par Dubey, (55)).

2.1.2. Efficacité de la transmission de *Neospora caninum* à la descendance

Actuellement, le parasite *Neospora caninum* est reconnu comme étant l'un des parasites transmis le plus efficacement à la descendance au cours de la gestation chez les bovins. Dans cette espèce, il n'y a pas de transfert d'anticorps de la mère au fœtus durant la gestation, la preuve formelle de la transmission verticale du parasite peut donc se faire en comparant le statut sérologique de la mère et du nouveau-né, avant prise colostrale. Cependant, si l'infection est tardive au cours de la gestation, le veau peut naître séronégatif mais infecté, la synthèse des anticorps n'ayant pu avoir lieu. Rarement, on rapporte des cas de veaux séropositifs nés de mères séronégatives, cela pourrait être dû au fait que les vaches ont été infectées il y a suffisamment longtemps pour que le taux d'anticorps soit devenu inférieur au seuil de détection (Dubey *et al.* (63)).

Dubey et collaborateurs rapportent dans une synthèse de 2006 (46), des taux de transmission congénitale variant selon les études, de 40,7% (Pan *et al.*, 2004), 44% (Bergeron *et al.*, 2000), 63,7% (Romero et Frankena, 2003), 73% (Dijkstra *et al.*, 2003), 81% (Paré *et al.*, 1995), 85% (Björkman *et al.*, 2003), 93% (Shares *et al.*, 1998) à 95% (Davison *et al.*, 1999). Cependant, il semble que l'efficacité de la transmission soit plus proche des 95% voire même supérieure, si l'on considère le potentiel de transmission d'une mère atteinte congénitalement à sa future descendance. Même si le potentiel de transmission à la descendance est très fort, les différents modèles mathématiques de transmission ont montré que cette dernière n'était pas suffisante pour expliquer la persistance de l'infection au sein des troupeaux : le mode de contamination par voie horizontale doit également être pris en compte (French *et al.* (72))

2.1.3. Conséquences de la transmission du parasite au cours de la gestation

2.1.3.1. Des avortements possibles

Les avortements sont la manifestation clinique principale de la néosporose bovine, à la fois dans les troupeaux laitiers et les troupeaux allaitants, pour les génisses aussi bien que pour les vaches multipares. Le plus souvent, les fœtus retrouvés morts *in utero* ont entre 3 et 8 mois de gestation et montrent généralement des signes d'autolyse modérée. Il est possible de trouver des fœtus momifiés de moins de 5 mois ainsi que des fœtus entièrement résorbés pour les avortements les plus précoces, avec, en conséquence, des retours en chaleur répétés (Dubey *et al.* (46)).

2.1.3.2. Dans la majorité des cas, la naissance d'un veau cliniquement sain mais infecté persistant

Même si les avortements sont la manifestation la plus visible de la néosporose, dans la majorité des cas, une vache atteinte donne naissance à un veau cliniquement sain mais infecté persistant (Anderson *et al.* (3) ; Dubey and Lindsay (55); Dubey *et al.* (63) ; Fioretti *et al.* (70)). On estime qu'il y aurait jusqu'à 95% des veaux nés de mère séropositive qui seraient infectés de manière congénitale, et donc hébergeraient le parasite, mais qui seraient cliniquement sains à la naissance. Ce mode de transmission serait donc à l'origine de la persistance de l'infection au sein des troupeaux.

2.1.3.3. Rarement, la naissance d'un veau cliniquement atteint de néosporose

Rarement, on observe des troubles neurologiques chez les veaux âgés de moins d'un mois infectés congénitalement. Ceux-ci peuvent être chétifs, avec un faible potentiel de croissance. Les antérieurs ou les postérieurs, voire même les deux peuvent être en flexion permanente ou en hyperextension. L'examen neurologique révèle une ataxie, une diminution du reflex patellaire, une perte de proprioception consciente. Une exophtalmie ou une asymétrie oculaire sont également rapportées dans certains cas, ainsi que des scolioses, des cas d'hydrocéphalie ou des compressions de la moelle épinière (Dubey *et al.* (46) ; Peters *et al.* (141)).

2.2. Mode de transmission *Neospora caninum* chez les bovins : une transmission verticale complexe, exogène ou endogène

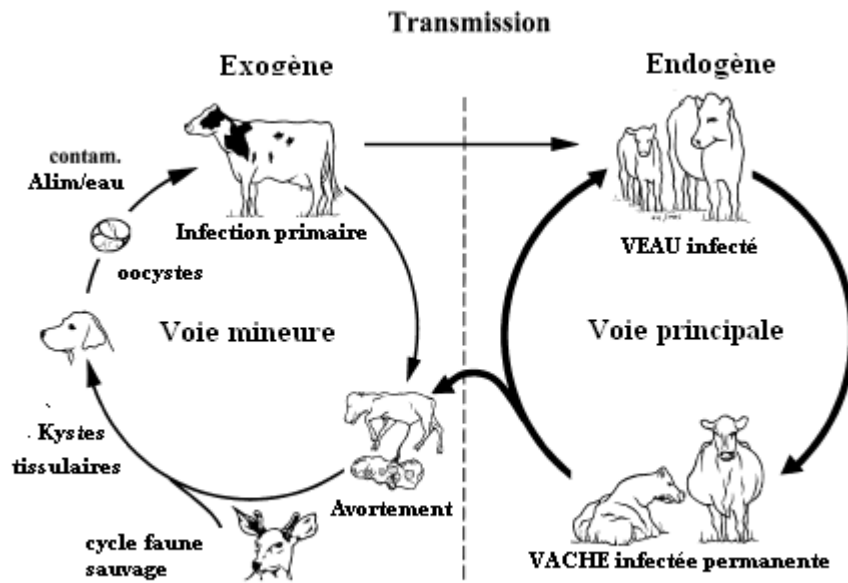
2.2.1. Définition des termes exogène et endogène

Depuis 2005 (Trees et Williams (173)), les termes de transmission exogène et transmission endogène sont utilisés pour décrire précisément la transmission verticale (ou congénitale) de *Neospora caninum*.

En effet, avant même la découverte de l'hôte définitif, il est apparu que dans certains troupeaux la courbe épidémiologique des avortements liés à *Neospora* suggérait l'existence d'une source de contamination extérieure, à un moment précis de la gestation (correspondant au contact avec l'hôte définitif) (McAlister *et al.* (123) ; Yaeger *et al.* (187)). En parallèle, après une épizootie d'avortements à *Neospora caninum*, le risque d'avortement lors des mises à la reproduction suivantes était accru (Moen *et al.* (131) ; Wouda *et al.* (186)) et une forte association entre séroprévalence et avortement était notée ((131) ; (170) ; (186)), ce qui suggérait un deuxième mode de transmission congénitale, par réactivation de l'infection durant la gestation.

Le terme de transmission transplacentaire exogène désigne la transmission du parasite après une primo infection de la mère durant la gestation, alors que le terme de transmission transplacentaire endogène désigne la transmission résultant de la réactivation du parasite au cours de la gestation chez une mère infectée de manière persistante (voir figure 3).

Figure 3 : Transmission de la Néosporose bovine
Repris de Dubey *et al.* (46)



2.2.1.1. Transmission exogène du parasite durant la gestation

2.2.1.1.1. Transmission exogène du parasite : une infection primaire à l'origine d'une parasitémie

Concernant le mécanisme de transmission exogène du parasite, il est probable qu'après l'ingestion, il y ait relargage dans l'intestin des huit sporozoïtes contenus au sein de l'oocyste, comme c'est le cas pour la toxoplasmose. Les sporozoïtes colonisent alors l'épithélium intestinal et se transforment en tachyzoïtes. Il s'ensuit une phase de multiplication, qui pourrait avoir lieu dans les nœuds lymphatiques mésentériques. Les tachyzoïtes gagneraient ensuite la circulation sanguine.

Le statut intracellulaire ou libre du parasite au cours de la parasitémie est pour l'instant inconnu, même si la présence d'ADN de *Neospora caninum* a été démontrée dans des leucocytes de veaux naturellement infectés (46). La parasitémie serait alors à l'origine de la dissémination de *Neospora caninum* dans l'organisme, dont l'utérus gravide. De nombreuses inconnues subsistent concernant la dissémination du parasite, car la parasitémie est difficile à observer expérimentalement, probablement car elle serait de très courte durée ou pulsatile (Macaldowie *et al.* (115))

2.2.1.2. Transmission exogène expérimentale à partir de tachyzoïtes ou bradyzoïtes

Afin d'investiguer le mode de transmission et de mieux comprendre l'épidémiologie des avortements à *Neospora caninum*, les observations de terrains ont été complétées par des épreuves expérimentales visant à reproduire la transmission du parasite. En 1992, Dubey *et al.* (56) inoculent pour la première fois trois vaches par voie intramusculaire et sous cutanée avec 26 millions de tachyzoïtes à 81, 126 et 129 jours de gestation. La vache inoculée à 81 jours fut euthanasiée 32 jours post inoculation et la présence de *Neospora caninum* dans les tissus fœtaux fut prouvée par immuno-histochimie et par essai biologique sur animal de laboratoire. Les deux autres vaches ont avortés, les fœtus étaient momifiés et non analysables.

En 1994, une nouvelle preuve expérimentale de la transmission exogène du parasite est apportée (Barr *et al.* (13)). Deux fœtus furent directement inoculés *in utero* (groupe 1) et un total de 6 vaches furent inoculées par voie intraveineuse et intramusculaire au cours de la gestation : entre 138 et 161 jours (groupe 2), à 85 jours de gestation (groupe 3), et à 120 jours de gestation (groupe 4). Six fœtus furent retirés chirurgicalement et analysés : les deux fœtus infectés directement ainsi que deux autres fœtus présentaient des lésions compatibles avec l'évolution d'une néosporose et un fœtus était positif par IFAT. Pour deux vaches, le fœtus fut laissé en place : l'une avorta d'un fœtus momifié 67 jours après inoculation, l'autre donna naissance à un veau cliniquement atteint à la naissance. Au final, une preuve (immuno-histochimie, isolement du parasite) de la présence du parasite été mise en évidence pour les deux fœtus infectés directement, ainsi que pour 5 des 6 fœtus issus de mères contaminées.

Même si l'ingestion de tissus – placenta notamment – contenant des formes tachyzoïtes et bradizoïtes peut être un mode d'infection possible pour l'hôte, les oocystes produits par l'hôte définitif sont, épidémiologiquement, la forme la plus probable de contamination à l'origine d'une transmission exogène. Cependant, les études à ce sujet sont assez contradictoires. Sur trois vaches ayant ingéré 600 oocystes à 70 jours de gestation (Trees *et al.* (172)), aucune preuve de la transmission du parasite au veau n'a pu être démontrée. Les trois veaux sont nés à terme, sans lésions apparentes et sans signes du parasite après recherche par PCR. L'infection des trois mères a pourtant été prouvée par l'élévation du taux d'anticorps durant la gestation et il est connu que l'administration intraveineuse de tachyzoïtes à 70 jours de gestation est susceptible de déclencher des avortements. L'expérience a été renouvelée en 2004, par Gondim *et al.* (76) en administrant à 19 vaches 1500 à 115 000 oocystes entre 70 et 176 jours de gestation. Après examen sérologique, histologique, PCR et immuno-histochimique, 6 fœtus dont un avorton étaient infectés par *Neospora caninum*.

Récemment, dans une étude de 2007, 18 vaches reçurent 40 000 oocystes par voie orale ; à 70 (6 vaches), 120 (6 vaches) et 210 (6 vaches) jours de gestation (McCann *et al.* (146)). Un seul avortement attribuable à *Neospora* fut noté pour une vache inoculée à 120 jours et aucune trace du parasite ne fut retrouvée pour les 11 autres fœtus nés des vaches inoculées à 70 et 120 jours. Par contre, 4 des 5 veaux nés des vaches inoculées à 210 jours avaient un taux d'anticorps pré-colostraux élevés pour *Neospora*.

Au total, sur les 40 vaches contaminées, seuls 10 fœtus ont été infectés et un seul avortement a été provoqué, pour des doses d'oocystes élevées. Ce résultat peut sembler paradoxal, car d'après les études réalisées, il apparaît que le chien excrète peu d'oocystes, si on exclue les cas d'immunosuppressions ((41) ; (104) ; (107) ; (154)). On peut illustrer ce paradoxe en faisant une comparaison avec les avortements à *Toxoplasma gondii*, responsable lui aussi de vagues d'avortements épizootiques chez la brebis. Pour déclencher un avortement, la dose nécessaire d'oocystes est relativement faible (moins de 1500) au regard de la quantité excrétée par le chat (13,6 millions par jour et jusqu'à 150 millions sur toute la période d'excrétion), ce qui rend possible l'infection après dissémination des fèces de chat dans l'environnement via l'eau ou la nourriture.

Pour *Neospora caninum*, les doses d'oocystes produites par le chien sont de l'ordre de 10 oocystes par gramme de fèces, ce qui les rend difficiles à étudier expérimentalement, alors que plus d'un millier d'oocystes sont nécessaires pour déclencher l'avortement de manière expérimentale. En 2007, une étude de McCann *et al.* (125) a montré que les doses utilisées lors des expérimentations étaient compatibles avec celles présentes naturellement dans l'environnement. En effet, après essai biologique sur la gerbille, il est apparu que sur les 40 000 oocystes (qui étaient conservées à 4°C) utilisés dans l'expérimentation, seuls 127 pouvaient être considéré comme viables. La quantité d'oocystes viables nécessaires à déclencher un avortement est donc relativement faible (de l'ordre de quelques centaines d'oocystes).

2.2.2. Transmission endogène du parasite durant la gestation

2.2.2.1. Transmission endogène du parasite : une transmission répétée du parasite au cours des gestations successives

La preuve d'une transmission endogène du parasite au cours de la gestation a été apportée par Anderson et son équipe en 1997 (3). Dans leur étude, 25 génisses séropositives (issues de mères séropositives) élevées depuis leur naissance et leur descendance furent étudiées afin de mettre en évidence une infection à *Neospora caninum*. Les génisses séropositives demeurèrent cliniquement saines, mais donnèrent naissance à des veaux séropositifs ; sept de ces veaux furent autopsiés et tous présentaient des lésions histologiques typiques de néosporose.

Il est maintenant connu que *Neospora caninum* peut être à l'origine d'avortements répétés, lors de gestations successives (Fioretti *et al.* (70)) ou de manière intermittente (Thurmond *et al.* (170) ; Wouda *et al.* (186)). Dubey rapporte le cas d'une vache ayant avorté au cours de trois gestations successives, en 1987, 1988 et 1989 (63), le parasite *Neospora caninum* avait été identifié sur les avortons de 1987 et 1989. Plus récemment, en 2003, Fioretti *et al.* (70) ont sélectionné trois vaches ayant mis bas des veaux sains infectés par *Neospora caninum* afin d'observer les trois gestations suivantes (deuxième, troisième et quatrième gestation). Aucun des 9 veaux et aucune des trois vaches n'ont présenté de

symptômes cliniques, pourtant les trois vaches sont restées séropositives au cours de leurs gestations successives et les 9 placentas étudiés étaient infectés. Il s'est avéré après inoculation à la souris d'extraits des cerveaux des veaux que les 9 veaux étaient effectivement contaminés. Le parasite a donc été transmis à chacune des descendances au cours des trois gestations successives étudiées.

La transmission répétée du parasite au cours des gestations est à l'origine d'avortements, successifs ou de manière intermittente au sein du troupeau. Il est avéré que les vaches infectées de manière congénitale par *Neospora caninum* ont un risque d'avortement plus élevé que les vaches saines, surtout lors de la première et de la deuxième gestation : un risque relatif d'avortement 7,4 fois supérieur pour les génisses infectées congénitalement est rapporté par Thurmond *et al.* (170). Celui-ci est ensuite de 1,7 pour la gestation suivante. Il est important de noter que dans cette étude, même si le risque d'avortements répétés sur les gestations successives était élevé, certaines vaches n'ont avorté que lors de leur deuxième ou troisième gestation.

2.2.2.2. Transmission endogène du parasite : l'hypothèse d'une recrudescence de l'infection au cours de la gestation

Il est maintenant clairement établi que la transmission transplacentaire endogène est le mode le plus commun de transmission de l'infection à *Neospora caninum* chez le bovin. Les différentes études épidémiologiques sont en effet en faveur d'une recrudescence de l'infection au cours de la gestation (Fioretti *et al.* (70); Moen *et al.* (131); Thurmond *et al.* (170); Wouda *et al.* (186)). Cette recrudescence serait vraisemblablement rendue possible à cause de la baisse d'immunité maternelle survenant aux alentours du milieu de la gestation (Innes *et al.* (88) et (89)). Chez les bovins infectés permanents, le parasite persisterait sous forme bradyzoïte, confiné au système nerveux et pour une moindre part aux muscles squelettiques (Schaes *et al.* (159)), en équilibre avec le système immunitaire. Concernant la toxoplasmose, il est établi que toute perturbation du système immunitaire de l'hôte peut induire, chez des personnes infectées permanentes, une recrudescence de l'infection. Pour *Neospora*, la possibilité d'une baisse d'immunité par ingestion de toxique ou via une autre affection intercurrente a été évoquée, mais n'est pas appuyée par des études fiables.

Le mécanisme le plus probable de réactivation ferait appel à un déséquilibre immunitaire dans la relation hôte-parasite induit par la gestation (voir *infra*), mais n'est pas encore totalement élucidé (Dubey *et al.* (63))

2.2.2.3. Transmission endogène du parasite : une transmission possible uniquement par les mères infectées permanentes

Les différentes études ont pu montrer que si une vache pouvait rester séropositive à vie après avoir été infectée expérimentalement par des souches de *Neospora caninum* (Transmission de type horizontale), seul le fait d'être infectée congénitalement et donc infectée permanent était à l'origine d'une transmission endogène au cours des gestations. McCann *et al.* (125) ont infecté en 2007 18 génisses séronégatives par inoculation de *Neospora caninum* à différents stades de gestation, ce qui fut à l'origine d'une transmission exogène avérée du parasite pour 5 fœtus. Sept vaches furent ensuite sélectionnées pour être mise de nouveau à la reproduction : les 5 vaches ayant infecté leur veau ou leur fœtus, une vache ayant eu un avortement dont l'origine n'avait pu être attribuée de manière certaine à *Neospora caninum*, et une vache ayant un taux d'anticorps anti-*Neospora* particulièrement élevé persistant. Toutes les vaches gardèrent un taux élevé d'anticorps anti-*Neospora* jusqu'à la seconde mise-bas et donnèrent naissance à des veaux cliniquement sains. Toutes les prises de sang pré-colostrale pour chacun des veaux sont restées négatives, les échantillons de cerveaux et de cœur ne montraient pas de trace d'ADN de *Neospora* par PCR. De plus, il n'y a pas eu de variation du taux d'anticorps chez les mères au cours de la gestation, qui aurait pu témoigner d'une recrudescence de l'infection. Si l'infection au cours de la gestation est à l'origine d'une transmission exogène du parasite, elle n'est pas capable d'induire une transmission endogène au cours des gestations suivantes (McCann *et al.* (125)). De plus, une infection par le parasite avant la gestation n'est pas à l'origine d'une transmission endogène du parasite au cours de la gestation suivante (Innes *et al.* (90))

Seule la transmission congénitale du parasite peut donc être à l'origine, par la suite, d'une transmission répétée, endogène, de *Neospora caninum* dans le troupeau.

2.3. Pathogénie des avortements liés à *Neospora caninum* chez les bovins

2.3.1. Hypothèses concernant les mécanismes à l'origine de l'avortement

Au cours de la gestation chez les mammifères, des mécanismes complexes sont mis en place pour permettre à la mère de tolérer le fœtus, qui représente immunologiquement un véritable « corps étranger ». Chez les bovins, la placentation est de type cotylédonaire, avec jusqu'à 100 placentomes, composés d'une villosité fœtale intimement en relation avec la caroncule maternelle. Le placenta est un tissu dynamique, en constant remodelage, qui ne cesse de se développer durant la gestation et qui permet le passage des nutriments et de l'oxygène. De plus, le placenta joue un rôle primordial dans le contrôle endocrine de la gestation, par la production de la progestérone et la régulation des prostaglandines.

A la suite de la parasitémie, *Neospora caninum* est capable d'envahir les caroncules placentaires, avant de franchir la barrière foeto-placentaire (Macaldowie *et al.* (115) ; Maley *et al.* (117)). Pour qu'un avortement ait lieu, le fœtus et/ou le placenta doivent avoir été suffisamment endommagés pour rendre impossible la suite de la gestation. Pour cela, deux hypothèses sont possibles : le parasite peut nuire directement à la survie du fœtus, ou être à l'origine du relargage de cytokines induisant lutéolyse et avortement. Concernant la première hypothèse, la survie du fœtus peut être compromise directement par la multiplication parasitaire, ou par un défaut d'oxygénation et de nutrition secondairement aux dommages placentaires. L'ensemble de ces mécanismes interviendrait d'une manière ou d'une autre lors des avortements, et tous seraient influencés par le stade de gestation.

2.3.2. Rappel immunologique : réponse immunitaire maternelle et fœtale au cours de la gestation

La gestation est une situation très particulière pour le système immunitaire car la mère porte ce qui représente en grande partie un « corps étranger », sans qu'une réaction de rejet ne soit mise en place. Les différentes recherches immunologiques ont montré le rôle crucial des cytokines présentes au niveau de l'interface materno-fœtale et à sa périphérie afin que la gestation puisse être menée à terme. Certaines cytokines sont bénéfiques à la gestation, alors que d'autres sont au contraire défavorables. Les cytokines pro-inflammatoires produites par les lymphocytes T-helper de type 1, comme le Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , l'interféron (INF)- γ et l'interleukine (IL)-2 peuvent, si elles sont en quantité suffisante, compromettre la survie du fœtus. Des administrations directes d'INF- γ , IL-2 ou TNF- α peuvent en effet induire des avortements chez la souris gestante (Enrican (67)). Au contraire, les cytokines régulatrices des lymphocytes T-helper de type 2, comme IL-10, le Transforming Growth Factor (TGF)- β , l'IL-4, et l'IL-5 sont produites localement au niveau de l'interface materno-fœtale et concurrence l'action des cytokines pro-inflammatoire. Il a notamment été démontré que l'IL-10 pouvait empêcher les avortements décrits précédemment chez la souris gestante (88). Durant la gestation, la réponse immunitaire au niveau du placenta est donc modifiée en faveur d'un microenvironnement dominé par des cytokines « bénéfiques » à la gestation.

Les hormones produites lors de la gestation sont également connues pour avoir des effets immunomodulateurs. La progestérone est capable d'induire la production d'IL-4 et la présence de Prostaglandine E2 peut orienter la maturation des lymphocytes T naïfs en lymphocyte T-helper de type 2 via la production d'IL-10 par les cellules dendritiques.

Du côté fœtal, l'immunocompétence commence à se mettre en place à partir de 100 jours de gestation, mais le fœtus n'est capable de répondre aux antigènes qu'après 150 jours. Parallèlement à la mise en place de la réponse immunitaire à médiation humorale, la réponse immunitaire à médiation cellulaire (via les lymphocyte CD4 et les cellules Natural Killer) tendrait à se mettre en place un peu plus tôt ; des fœtus autopsiés à 4 mois de gestation après inoculation de *Neospora caninum* ont montré des taux de cytokine pro-inflammatoires augmentées, alors que les anticorps anti-*Neospora* n'ont pu être détectés (Almeria *et al.*(1)) Ces observations tendent à supposer que le fœtus serait plus capable de lutter contre une infection si celle-ci intervient tardivement dans la gestation (Gibney *et al.* (74)).

2.3.3. Réponse immunologique face à l'infection à *Neospora caninum* en fonction du stade de gestation.

Afin de mieux comprendre la pathogénie des avortements à *Neospora caninum*, il importe de savoir comment l'immuno-régulation qui intervient lors de la gestation peut affecter l'équilibre hôte parasite. Les cytokines pro-inflammatoires comme INF- γ , IL-2 ou TNF- α qui ont pour rôle de limiter la multiplication du parasite sont potentiellement néfastes pour la gestation. En parallèle, les trophoblastes produisent de l'IL-10, qui crée un environnement local de type Th-2. Or, l'IL-10 exerce également un rétrocontrôle négatif sur la production d'INF- γ , ce qui peut faciliter la multiplication du parasite dans l'organisme. C'est pourquoi, la situation est telle que la réponse immunitaire est néfaste à la survie du fœtale, alors que l'immunomodulation nécessaire à la gestation peut affecter la capacité de l'organisme à lutter contre l'infection. La gestation est donc à l'origine d'un déséquilibre de la relation hôte-parasite (Innes *et al.* (88)).

La figure 4 illustre l'évolution de la relation Hôte-Parasite lors d'une infection par *Neospora caninum*.

Chez les bovins non gestants (figure 4 (i)), l'infection à *Neospora caninum* est suivie d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (prolifération cellulaire et production de cytokines) suffisante pour que l'animal ne développe pas de symptômes cliniques. La production d'interféron gamma (INF- γ) par les lymphocytes T_{CD4}⁺ est capable de limiter la multiplication intracellulaire du parasite et joue ainsi un rôle important dans la protection immunitaire. Le parasite persiste cependant sous forme bradyzoïte, dans le système nerveux principalement. Les quelques données existantes semblent montrer que lorsque un animal non gestant est infecté, il développerait une immunité suffisante pour empêcher la transmission verticale du parasite lors des mises à la reproduction suivantes ((88) ; (90) ; (125)).

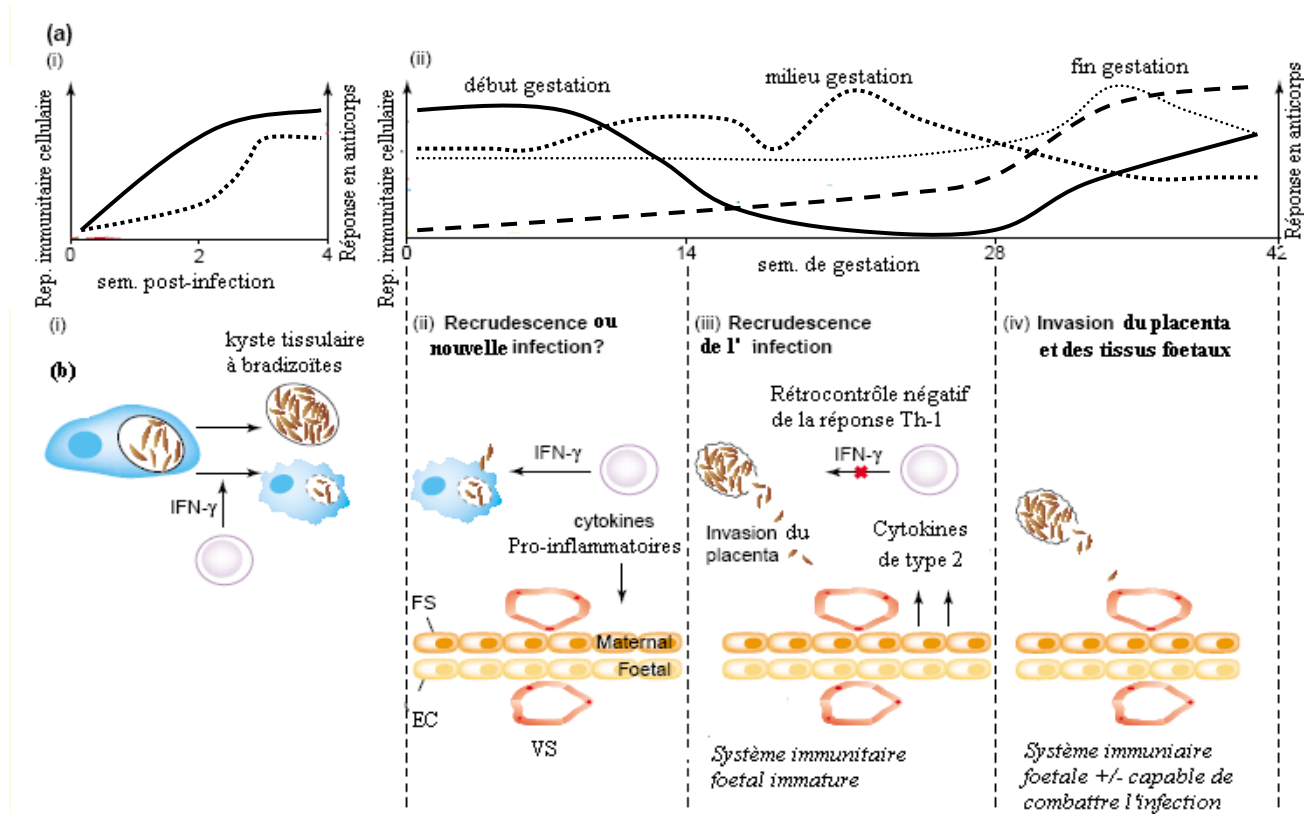
Au début de la gestation (Figure 4 (ii)), les conséquences d'une infection à *Neospora caninum* peuvent être sévères, allant jusqu'à la mort du fœtus. Le fœtus, de part son immaturité, est à ce moment là incapable de produire une réponse immunitaire efficace. En parallèle, la mère peut en début de gestation produire une très forte réaction inflammatoire avec libération massive d'IFN- γ en réponse aux antigènes du parasite. C'est pourquoi, il serait possible que l'avortement soit lié, au moins en partie, au relargage de cytokine pro-inflammatoire par les lymphocytes T-helper de type 1 au niveau de l'interface mère-fœtus, lors de la réaction immunitaire.

Au milieu de la gestation, on observe une modulation majeure du système immunitaire et surtout de la réponse IFN- γ (figure 4 (iii)). Le rétrocontrôle négatif exercé sur le système immunitaire par la gestation permettrait la réactivation du parasite quiescent dans le système nerveux. Lors de cette réactivation, le parasite serait à même de sortir de la forme kystique et d'envahir la circulation sanguine.

L'environnement materno-fœtal, avec libération de cytokines régulatrices par les lymphocytes Th-2 serait de plus favorable à la prolifération du parasite, ainsi qu'à l'infection du placenta et du fœtus. Pour Almeria et collaborateurs (1), la réponse de type Th-1 pro-inflammatoire primitive, serait suivi d'une réponse modératrice de type Th-2. Cette réponse de type Th-2 avec relargage de cytokine anti-inflammatoire préviendrait la perte fœtale induite par la réponse inflammatoire excessive, mais permettrait également la multiplication du parasite au sein de l'hôte et son passage à travers le placenta. Ainsi, c'est toute la balance immunitaire qu'il faut considérer pour approcher la physiopathogénie de la transmission verticale de *Neospora caninum*. L'âge du fœtus au moment de l'infection est primordial. Au milieu de la gestation, les conséquences d'une infection peuvent être la mort du fœtus et donc l'avortement, ou la naissance d'un veau cliniquement atteint de néosporose.

En fin de gestation, l'infection est moins à même de déclencher un avortement, certainement grâce à l'acquisition progressive de la maturité du système immunitaire fœtal (figure 4 (iv)). La conséquence la plus probable d'une infection en fin de gestation serait donc la naissance d'un veau sain, atteint congénitalement. Comme la majorité des transmissions verticales donnent naissance à un veau sain infecté permanent, il est probable que la majorité des transmissions ait lieu en fin de gestation (Dubey *et al.* (46)).

Figure 4 : Evolution de la relation Hôte/parasite lors d'une infection par *Neospora caninum* chez l'animal non gestant (i) et en cours de gestation (ii, iii et iv) d'après Innes *et al.* 2002, (88)



Légende figure (a) :

(i) Infection d'un animal non gestant

— Réponse immunitaire à médiation cellulaire
 Réponse en anticorps

(ii, iii et iv) Infection d'un animal pendant la gestation

— Réponse immunitaire à médiation cellulaire
 Réponse en anticorps
 Réponse en anticorps
 Infection en milieu de gestation
 Réponse en anticorps
 Infection en fin de gestation
 - - - Réponse immunitaire foetale (maturité)

Légende figure (b)

EC: Epithélium chorionique

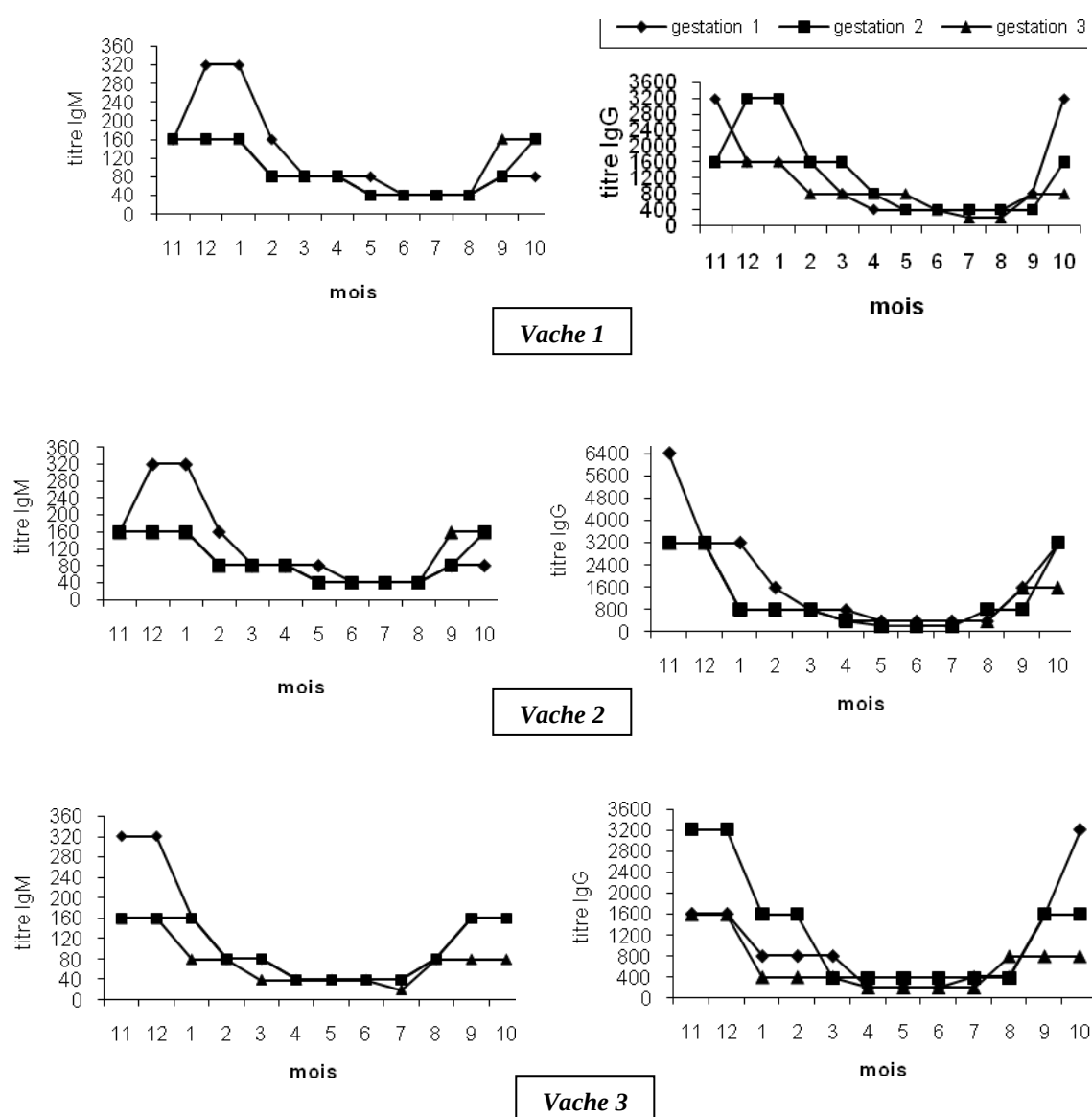
FS : Syncytium foetal

VS: Vaisseau sanguin

L'évolution de la réponse à médiation humorale serait également le témoin de la recrudescence du parasite lors de la gestation, chez les animaux infectés permanents. Le titre en IFAT d'immunoglobuline G (IgG) et M (IgM) contre *Neospora caninum* au cours de 3 gestations successives à été observé pour 3 vaches infectées permanentes (congénitales) (Fioretti *et al.* (70) ; voir figure 5).

Figure 5 : Titre en anticorps (IgG et IgM) anti-*Neospora caninum* au cours de 3 gestations consécutives.

D'après Fioretti *et al.* 2003, (70)



Au milieu de la gestation, le taux d'IgG diminue sensiblement, signe de la baisse d'immunité exercée par l'état gestant. Puis le titre augmente rapidement en fin de gestation, les titres les plus élevés sont observés en fin de gestation et dans les mois suivants la gestation, ce qui concorde avec une recrudescence de la multiplication parasitaire. Le taux d'IgM suit la même tendance, les taux les plus bas étant observés en milieu de gestation et les plus élevés en fin de gestation.

Une synthèse des expérimentations réalisées en vue de qualifier la réponse immunitaire maternelle et fœtale responsable des avortements à *Neospora caninum* est présentée dans le tableau 12. On peut remarquer qu'en cas d'infection précoce, la réaction inflammatoire de type cellulaire domine, avec une forte production d'Interféron gamma, délétère à la poursuite de la gestation. En cas d'infection en milieu de gestation, aucune modification concernant l'environnement en cytokines n'est notée si à l'autopsie le fœtus retrouvé était viable. Par contre, une forte réaction cellulaire est présente en cas d'avortements (115). En cas d'infection en fin de gestation, une réponse immunitaire fœtale est notée en plus de la réaction maternelle ((1) ; (17)). A côté de la réaction de type Th-1, une réaction de type Th-2 est également présente qui laisse penser, comme dit précédemment, que les mécanismes mis en causes lors de l'infection par *Neospora caninum* sont assez complexes.

Le processus immunitaire prend donc une large part dans la pathogénie des avortements à *Neospora caninum* et pourrait dans certains cas être responsable à lui seul de l'avortement, mais tous les mécanismes mis en jeu n'ont pas encore été élucidés. Néanmoins, dans la majorité des cas, la pathogénie des avortements est complexe, associant le processus immun et les lésions directes causées par la multiplication parasitaire dans les tissus fœtaux et maternels.

Tableau 12: Réponse immunologique fœtale et maternelle après inoculation de souches de *Neospora caninum* chez le bovin, en fonction de la dose inoculée, de la voie d'inoculation et du stade de gestation.

Animal	Quantité inoculée (tachyzoïtes)	Voie	Stade de gestation	Avortements constatés lors du retrait des fœtus	Réponse immunologiques à médiation cellulaire	Réponse immunologique à médiation humorale	source
8 vaches et leur fœtus euthanasiés : - à 14j PI (2) - à 28j PI (2) - à 42j PI (2) - à 56j PI (2)	10 ⁷	SC	140 j	0/8	Réponse maternelle - production IFN- γ - prolifération cellulaire NL utérins et de drainage du site d'inoculation à 14j et 28j PI	Réponse maternelle : Séroconversion (IFAT et ELISA) Réponse fœtale: Séropositivité (IFAT et ELISA)	(17)
6 vaches et leur fœtus euthanasiés : - à 14j PI (2) - à 28j PI (2) - à 42j PI (2)	5.10 ⁸	SC	140j	0/6	Réponse fœtale : - production IFN- γ - prolifération cellulaire/NL réactionnels 14j PI et 28j PI		
8 vaches et leur fœtus euthanasiés : - à 14j PI (2) - à 28j PI (2) - à 42j PI (2) - à 56j PI (2)	5.10 ⁸	IV	70j	0/2 2/2 2/2 2/2	Infiltration placentaire de type CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , $\gamma\delta$ TC et NK Production d'IFN- γ dès 14j PI (IV) ou 28j PI (SC)		(116)
8 vaches et leur fœtus euthanasiés : - à 14j PI (2) - à 28j PI (2) - à 42j PI (2) - à 56j PI (2)	5.10 ⁸	SC	70j	0/2 1/2 1/2 1/2	Pas de modifications par rapport aux contrôles dans le cas des fœtus viables.		
4 génisses euthanasiées 21j PI	10 ⁷	IV	110j	0/4	Mère : réponse de type Th-1 majoritaire (IFN- γ , TNF- α , IL-12) et Th-2 (IL-4) Fœtus : Réponse de type Th-1 (IFN- γ , TNF- α) puis contrôle de type Th-2 (IL-10, TNF- β)	Pas de réponse humorale maternelle ou fœtale	(1)

2.3.4. Dommages placentaires et fœtaux causés par *Neospora caninum*

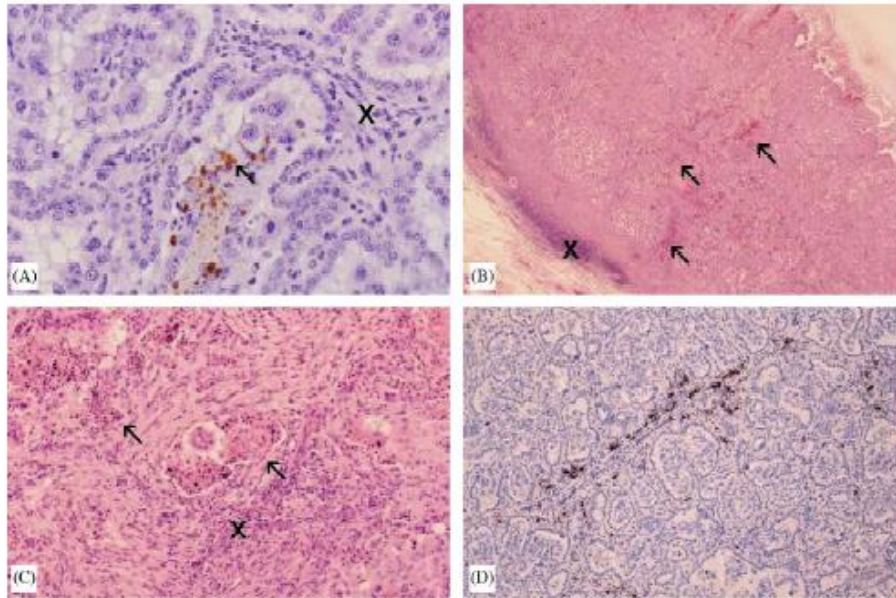
2.3.4.1. Dommages placentaires causés par *Neospora caninum*

Lors des infections expérimentales, les lésions les plus sévères sont observées au niveau placentaire. Lorsque *Neospora caninum* envahit les cellules utérines, il s'y multiplie et détruit le tissu maternel et fœtal, provoquant alors une forte réponse inflammatoire non suppurée (Macaldowie *et al.* (115) ; Maley *et al.* (117)). Les lésions les plus précoces ont été observées par Macaldowie, 14 jours après inoculation par voie intraveineuse à 70 jours de gestation. On pouvait alors observer la multiplication du parasite dans les villosités placentaires fœtales ainsi qu'une nécrose de ces villosités, parfois associée à un exsudat séreux entre la villosité fœtale et le septum maternel et à une inflammation non suppurée du septum maternel (voir figure 6). Les analyses réalisées (Innes *et al.* (88) et (89) ; Maley *et al.* (116)) après infection expérimentale et étude de la réponse immunitaire locale au niveau placentaire, ont mis en évidence la présence d'un infiltrat cellulaire composé pour une large part de lymphocytes CD4+, CD8+, et de cellules T- $\gamma\delta$, à l'origine d'une production accrue d'interféron gamma. La réaction inflammatoire maternelle serait donc en grande partie responsable du rejet du fœtus à ce stade de gestation. En général, aucune réaction inflammatoire fœtale n'était observée pour les stades précoces de gestation.

Chez les vaches inoculées par voie sous cutanée, les lésions n'étaient observées que dans la moitié des cas, et moins précocement (voir tableau 13). Une désinsertion des cotylédons vis-à-vis des caroncules maternelles a été observée 28 jours après inoculation par voie sous cutanée. Les observations les plus tardives ont mis en évidence une autolyse des caroncules maternelles et du fœtus, les tissus utérins tendaient à se normaliser avec une nouvelle épithélialisation des caroncules résorbées.

Lors des infections naturelles, on rapporte la présence d'une placentite non suppurée, pouvant s'étendre à la région inter-cotylédonaire du placenta, avec parfois des minéralisations (Barr *et al.* (8); Collantes-Fernandez *et al.* (37); Nietfeld *et al.* (136))

Figure 6 : Lésions placentaires causées par *Neospora caninum*, coupes histologiques
Macaldowie *et al.* (115)



A-D Coupes histologiques de placentomes de vaches 14 jours après inoculation par voie intra-veineuse (A,D) ou sous cutanée (B,C) de tachyzoïtes de *Neospora caninum*.

(A) Inflammation du septum des caroncules maternelle (X) et nombreux tachyzoïtes dans les villosités fœtales (→) (Immuno-histochimie x110)

(B) Inflammation maternelle à la base des caroncules (X), inflammation du septum maternel et nécrose des villosités fœtale (→) (HE x10)

(C) Inflammation (X) et nécrose des villosités fœtale (→) (HE x50)

(D) Inflammation du septum des caroncules maternelles avec un nombre important de cellules positive pour l'ARN de l'INF- γ . (Hybridation *in-situ*, x50)

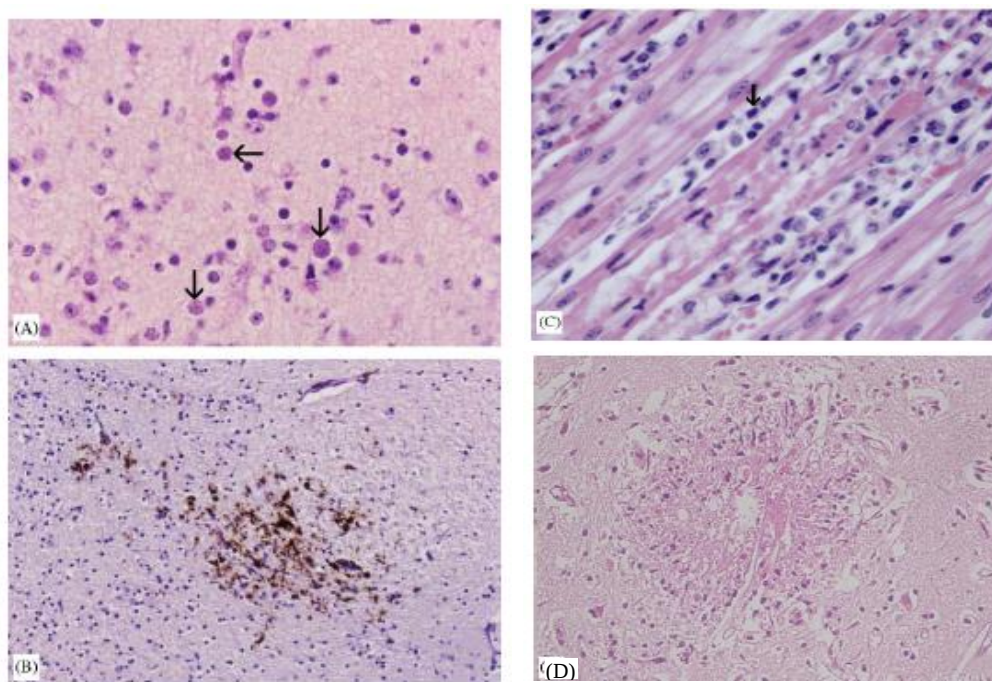
2.3.4.2.

Dommages fœtaux causés par *Neospora caninum*

Lors de l'infection placentaire, *Neospora caninum* est capable d'envahir la circulation sanguine et les tissus fœtaux, avec une prédilection pour le système nerveux central (Macaldowie *et al.* (115)). Le parasite est tout d'abord retrouvé en périphérie des vaisseaux sanguins (Bartley *et al.* (17)) et, pour les fœtus les plus jeunes, sa multiplication intense peut causer des destructions fatales de la substance grise contenant les prolongements neuronaux (ou neuropile) sans qu'il y ait d'inflammation (Buxton *et al.* (30)) (voir figure 7). Pour les fœtus plus âgés, dont la capacité à contrôler le parasite est plus élevée, la multiplication est restreinte. On observe alors des zones de nécroses focales, entourées d'un infiltrat inflammatoire d'origine fœtale important, composé de cellules microgliales, d'astrocytes réactionnels et de cellules des lignées monocytaires et lymphocytaires. Une minéralisation des zones de nécroses est parfois notée (Dubey *et al.* (46)) ainsi qu'une méningite modérée.

Les avortons infectés par *Neospora caninum* présentent souvent des lésions de nécroses multifocales et des infiltrations cellulaires mononuclées diffuses, disséminées dans de nombreux tissus. La destruction des cellules fœtales, associée à une réaction inflammatoire lymphoïde peut se produire dans de nombreux tissus, comme le cœur, les muscles squelettiques, le poumon, le foie (Barr *et al.* (8) ; Bartley *et al.* (17); Collantes-Fernandez *et al.* (37); Nietfeld *et al.* (136)). Pour certains fœtus, on retrouve après infection par *Neospora caninum* des lésions typiques inflammatoires et nécrotiques où le parasite peut être mis en évidence, dans des tissus comme le foie et le cœur. Des lésions de leucomalacie cérébrale, indicatives d'une hypoxie fœtale, sont également rencontrées. Les différentes expérimentations réalisées (voir tableau 13) tendent à montrer que le cerveau serait l'organe parasité le plus tôt ; les tachyzoïtes se multipliant à l'intérieur et en périphérie des vaisseaux sanguins initieraient l'encéphalite.

Figure 7 : Lésions fœtales causées par *Neospora caninum*, coupes histologiques
Macaldowie *et al.* (115)



(A, B) Coupe histologique de cerveau de fœtus bovin, à 84 jours de gestation, 14 jours post inoculation de la mère par des tachyzoïtes de *Neospora caninum*

(A) Inclusions de *N. caninum* (→) dans le pont cérébral (HE x360)

(B) Antigènes de *N. caninum* dans une zone de nécrose aigue du diencéphale (Immuno-histochimie, x120)

(C, D) Coupes histologiques d'encéphale et de cœur de fœtus naturellement infectés par *Neospora caninum*

(C) Nécrose focale et infiltration de cellules mononuclées (→) dans le myocarde (HE x300)

(D) Encéphalomyélite associée à *N. caninum* : zone de nécrose centrale avec entourée de cellules mononuclées (HE x150)

Tableau 13 : Lésions fœtales et placentaires observées après inoculation de souche de *Neospora caninum* chez le bovin, en fonction de la dose inoculée, de la voie d'inoculation et du stade de gestation.

Animal	Quantité inoculée	Voie	Stade de gestation	Nombre Transmissions verticale (sur total inoculé)	Avortements	Lésions observées	source
Vache Jersey 1	26.10 ⁶ Tachyzoïtes	SC et IM	129 j	1/1	Non*	Fœtus : encéphalite nécrotique	(70)
Vache Jersey 2			126 j	1/1	Oui 101j PI	Fœtus : autolysé	
Vache Jersey 3			81 j	1/1	Oui 74j PI	Fœtus : autolysé	
19 vaches	1500 à 115000 oocystes	PO	70 à 176 j	6/19	1/19	Avorton : lésions histologiques typiques (inflammation avec nécrose multifocale)	(76)
8 vaches et leur fœtus euthanasiés : - à 14j PI (2) - à 28j PI (2) - à 42j PI (2) - à 56j PI (2)	5.10 ⁸ tachyzoïtes	IV	70j	2/2 2/2 Résorbé Résorbé	0/2* 2/2 2/2 2/2	Placentite nécrotique focale, dégénérescence cotylédonnaire Désinsertion cotylédonnaire Disparition des tissus fœtaux Disparition des tissus fœtaux	(1)
8 vaches et leur fœtus euthanasiés : - à 14j PI (2) - à 28j PI (2) - à 42j PI (2) - à 56j PI (2)	5.10 ⁸ Tachyzoïtes	SC	70j	2/2 1/2 1/2 1/2	0/2* 1/2 1/2 1/2	pas d'altérations visibles pour les fœtus viables après 28jPI Placentite focale modérée Placentite sévère, nécrotique, hémorragique Nécrose des cotylédons Nécrose des cotylédons	(1)

* Retrait précoce du fœtus
jPI : jours post infection

Tableau 13 : Lésions fœtales et placentaires observées après inoculation de souche de *Neospora caninum* chez le bovin, en fonction de la dose inoculée, de la voie d'inoculation et du stade de gestation. (suite)

Animal	Quantité inoculée	Voie	Stade de gestation	Nombre Transmissions verticale (sur total inoculé)	Avortements	Lésions observées	source
vaches	40 000 oocystes	PO	70j (n=6) 120j (n=6) 210j (n=6)	0/6 0/6 5/6	0/6 1/6 1/6	Fœtus : Nécrose multifocale et infiltration des muscles squelettiques	(125)
12 vaches	10 ⁷ Tachyzoïtes	SC	70j (n=6) 210j (n=6)	6/6 6/6	6/6 0/6	Nécrose multifocale placentaire, fœtale et maternelle avec infiltration lymphocytaire, macrophagique ou neutrophilique diffuse. Hémorragies placentaires focales, exsudat séreux Nécrose épithéliale focale modérée, affectant souvent un seul cotylédon, avec infiltration lymphocytaire associée	(74)
14 vaches	5. 10 ⁸ tachyzoïtes N=8 10 ⁷ tachyzoïtes N=6	SC SC	140j 140j	8/8 6/6	0/8 0/6	Placenta : Dégénérescence aigue des villosités choriales avec nécrose, exsudat séro-nécrotique, infiltration Fœtus : inflammation péri vasculaire cérébrale dès 14j PI, encéphalite nécrotique multifocale à partir de 28j PI, hépatite, myosite, nœuds lymphatiques réactionnels Placenta : lésions moins marquées, zones de nécrose placentaire avec minéralisation. Fœtus : encéphalite nécrotique multifocale à 42j PI ; nœuds lymphatiques réactionnels, pas de lésions observé à 14, 28 et 56j PI.	(17)

Lors d'infection naturelle, les fœtus sont souvent autolysés, ce qui rend leur étude difficile (voir tableau 14). Le plus souvent, les lésions touchent le système nerveux central, avec une encéphalomyélite multifocale nécrotique, mais peuvent être rencontrées dans différents organes. Dans une étude portant sur 82 fœtus en Californie, une encéphalite et une myocardite étaient rencontrées dans 100% des cas, des lésions des surrénales dans 80% des cas, des myosites dans 72% des cas, des néphrites dans 66% des cas, des hépatites dans 62% des cas et des pneumonies dans 44% des cas., Les lésions étaient accompagnées d'un infiltrat de type monocellulaire et des protozoaires ont pu être observés pour 89% des fœtus (Barr *et al.* (8))

La synthèse des lésions fœtales et maternelles, lors d'infection expérimentale est donnée dans le tableau 13. La synthèse des lésions rencontrées lors d'infection naturelle est donnée dans le tableau 14.

Les lésions placentaires et fœtales démontrent que *Neospora caninum* est un pathogène capable d'induire par sa seule multiplication des avortements, par l'inflammation du placenta maternel, la nécrose et l'inflammation du placenta fœtal et maternel, ou les dommages fœtaux, voire la combinaison des trois. Cependant, en général, le nombre de parasites retrouvés dans les tissus fœtaux est faible, même chez les sujets bien préservés. Ceci pourrait être dû à la pathogénie même des avortements : la réponse immunitaire maternelle ou la lutéolyse induite par les prostaglandines causerait l'expulsion du fœtus avant que le parasite ait le temps de se multiplier en grand nombre.

Nombre observé	Critère d'identification	Lésions histologiques	source
17 fœtus issus d'avortement entre 1897 et 1989	Parasite présent dans les tissus fœtaux	Autolyse Hépatite non suppurée, inflammation et nécrose hépatiques focales, myosite focale non suppurée, inflammation des surrénales, de la graisse mésentérique et abdominale, du placenta (minéralisation), pneumonie.	Barr <i>et al.</i> (8)
19 fœtus provenant de 15 troupeaux, Nouveau Mexique, 1989	Tachyzoïtes dans les tissus cérébraux, IHC positive	Autolyse Encéphalite multifocale non suppurée, myocardite, myosite, hépatite Inflammation pulmonaire, rénale, placentaire Nécrose multifocale cérébrale, hépatique, pulmonaire, placentaire	Nietfeld <i>et al.</i> (136)
72 fœtus parmi 220 avortons, Espagne, entre 2000 à 2003	PCR positive dans les tissus fœtaux	Avortement en début et milieu de gestation : lésions généralisée : encéphalite, myocardite, hépatite, nephrite, pneumonie Avortement en fin de gestation : lésions moins sévères, touchant un nombre plus restreint d'organes.	Collantes-Fernandez <i>et al.</i> (37)

Tableau 14: Lésions fœtales et placentaires observées après infection naturelle par *Neospora caninum* chez le bovin.

2.4. Approche épidémiologique des avortements à *Neospora caninum* chez les bovins

2.4.1. *Neospora caninum* dans l'espèce bovine : premier agent à l'origine d'avortements

De manière rétrospective, la première mise en cause de la néosporose dans une épidémie d'avortements remonte à 1989, dans un troupeau laitier du Nouveau Mexique (Nietfeld *et al.* (136)), et de nombreuses données ont confirmé cette infection comme une cause particulièrement importante d'avortement. La néosporose a une distribution mondiale, touchant de nombreux pays répartis sur les 6 continents. La néosporose bovine n'est probablement pas une maladie nouvelle, mais nouvellement reconnu, car le parasite serait enzootique depuis 1984 en Californie. Des études menées en Californie, aux Pays-Bas et en Nouvelle-Zélande indiquent qu'environ 20% des avortons examinés sont touchés par *Neospora caninum* (64). Dans les troupeaux laitier ayant déjà subi des avortements à *Neospora caninum*, la proportion des avortons infectés par *Neospora caninum* serait même de 44% (Rapporté par Dubey *et al.* (64)). Le taux d'infection était de 77% pour 226 fœtus issus de 50 troupeaux danois ayant subi de nombreux avortements sur une courte période (Anderson *et al.* (2)). Le taux d'avortements liés à *Neospora caninum* serait compris entre 20 et 43%, en Californie au Brésil ou en Argentine. En Europe, des études menées en Allemagne, en Espagne ou en Suède ont également mis en avant le rôle majeur de *Neospora caninum* lors d'avortements (Dubey *et al.* (64)).

L'ensemble de ces données fait de *Neospora caninum* le premier ou le deuxième agent infectieux – éventuellement derrière le virus de la diarrhée virale bovine, BVD – mis en cause lors d'avortements dans l'espèce bovine

2.4.2. Diversité des formes épidémiologiques d'avortements liés à *Neospora caninum*

2.4.2.1. Epizootie d'avortements et transmission exogène du parasite

Avant même la découverte du chien comme hôte définitif, différentes études concernant des épisodes d'avortements attribués au parasite *Neospora caninum* ont pu mettre en évidence l'existence d'une source d'exposition des vaches à un moment précis de la gestation ((92) ; (123) ; (187)). En effet, dans certains troupeaux, de véritables épizooties d'avortements attribués à *Neospora caninum* sont survenus sur un laps de temps court, ce qui est très évocateur d'une contamination à un moment précis de la gestation via une source de contamination commune à l'ensemble du troupeau. On définit les épisodes d'avortements comme épizootique, si plus de 10% ou 12,5% des vaches à risque avortent sur une période de 6-8 semaines (46).

En 1989, au Mexique, 29 vaches sur 240 (12,1%) avortèrent sur une période de 5 mois, 7 fœtus sur les 9 examinés présentaient des lésions de néosporose (Thilstead et Dubey (167)). En Irlande, en 1993, 11 vaches sur 150 (7,3%) subirent des avortements, 5 fœtus présentaient des lésions compatibles avec une néosporose et le parasite pu être identifié sur deux avortons (McNamee et Jeffrey (129)).

En 1993 également, 33% d'un troupeau de 158 vaches de Nouvelle Zélande avortèrent durant l'automne, l'atteinte par *Neospora caninum* fut confirmée par les examens (Thornton *et al.* (168)).

En 1994, au Dakota, 9 vaches sur un troupeau de 90 avortèrent sur seulement 10 jours d'intervalle. *Neospora caninum* fut identifié sur les 7 fœtus examinés (Yaeger *et al.* (187)).

En 1995, un épisode explosif d'avortements fut observé au Pays-Bas, sur 4 troupeaux de vaches Holstein. En trois semaines, 33% des 227 vaches et 14% des génisses avortèrent, la période d'avortement fut suivie de la mise-bas d'avortons momifiés les mois suivants. Sur les 51 fœtus examinés, 50 avaient des lésions suggestives de néosporose. Le diagnostic fut confirmé par immuno-histochimie pour 40 sujets (Moen *et al.* (131)).

Dans un troupeau de 1 200 têtes en Californie, 66 vaches sur les 360 gestantes (18%) ont avorté sur une période de 2 mois (McAllister *et al.* (123)). Les titres en anticorps et les

lésions retrouvées sur les fœtus étaient compatibles avec des avortements à *Neospora*. La courbe représentant les taux hebdomadaires d'avortements marquait un pic soudain, ce qui était en faveur d'une source commune de contamination.

En 2000, sur un troupeau de vaches laitières de Caroline du Sud, près de 10% du troupeau et 40% des vaches en milieu de gestation ont avorté sur une période de 4 mois (Jenkins *et al.* (92)). De telles épidémies d'avortements sont fortement évocatrices d'une contamination lors de la gestation par voie exogène.

2.4.2.2. Enzootie d'avortements et transmission endogène du parasite

Les avortements sont considérés comme une affection enzootique, s'ils persistent dans le troupeau sur une période de plusieurs mois ou années. Pour beaucoup de troupeaux ayant une enzootie d'avortements à *Neospora caninum*, une association a pu être faite entre le statut sérologique vis-à-vis de *Neospora caninum* des mères et de leur descendance (Hall *et al.* (82); Shares *et al.* (159) ; Thurmond *et al.* (169) ; Wouda *et al.* (186)). Les mères ayant avorté d'un fœtus infecté par *Neospora caninum* ont en général une descendance séropositive vis-à-vis de *Neospora caninum*, et des liens de parenté entre animaux positifs ont été retrouvés pour des valeurs allant jusqu'à 75% des animaux concernés (82).

La séropositivité vis-à-vis de *Neospora caninum* est considérée comme étant acquise à vie et des titres élevés en anticorps peuvent persister plusieurs années (Pabon *et al.* (139)). Seuls 2 animaux séropositifs sur 30 et 1 animal séronégatif sur 83 changeraient de statut sérologique au cours de la gestation, ce qui montre la grande stabilité sérologique de l'infection.

L'ensemble des études menées (Fioretti *et al.* (70); Moen *et al.* (131) ; Thurmond *et al.* (170) ; Wouda *et al.* (186)) montrent une relation étroite entre statut sérologique et risque d'avortements : les vaches séropositives ont un risque relatif d'avortement variant selon les études, de 3 fois (Moen *et al.* (131)), 3,13 fois (Wouda *et al.* (186)), 7,4 fois (Thurmond *et al.* (170)), 13 fois (Hall *et al.* (82)), plus élevé que les vaches séronégatives. Le risque relatif d'avortement est même de 18,9 fois plus élevé pour une vache séropositive si l'on s'intéresse aux avortements survenant après 90 jours de gestation (Lopez Gatius *et al.* (111)).

Plus récemment, en 2007, le statut sérologique et les performances de reproduction d'un troupeau ayant subi des avortements attribuables à *Neospora caninum* furent étudiés sur une période de trois années consécutives (Pabon *et al.* (139)). Les résultats de cette étude sont donnés dans le tableau 15. Sur un total de 414 gestations sur les 3 années, le taux d'avortement des vaches séropositives (39,5%) était significativement supérieur à celui des vaches séronégatives (1,4%) et 92,5% en moyenne des avortements sont survenus pour des mères séropositives. Pour les animaux séropositifs, la moitié (51%) des avortements étaient des avortements répétés.

Tableau 15 : Séoprévalence de *Neospora caninum* et avortement pour un troupeau de vaches laitières sur trois années consécutives
Pabon *et al.* (139)

Année	Nombre total de vaches du troupeau	Vaches séropositive (%)	Nombre total de gestation (séropositive) ^a	Nombre total d'avortement (%)	Avortement chez les vaches séropositive (%) ^b (%) ^c	Avortement répété pour les vaches séropositives (%) ^d
1	259	82 (31,7)	165 (65)	34 (20,6)	31 (47,7) (91,2)	18 (58,1)
2	222	55 (24,8)	128 (32)	7 (5,5)	7 (21,9) (100)	4 (57,1)
3	231	46 (19,9)	121 (27)	12 (9,9)	11 (40,7) (91,7)	3 (27,3)
Total	712	183 (25,7)	414 (124)	53 (12,8)	49 (39,5) (92,5)	25 (51)

^a Nombre total de vaches séropositive gestante

^b Rapporté au nombre total de vache séropositive gestante

^c Rapporté au nombre total d'avortement

^d Rapporté au nombre total d'avortement chez les vaches séropositives

Les enzooties d'avortements sont donc compatibles avec le mode de transmission endogène du parasite, à l'origine du maintien de l'infection dans le troupeau sur plusieurs générations.

On peut rajouter, pour différencier les deux formes épidémiologiques, que si la transmission est principalement endogène, les mères et leur descendance (anticorps pré-colostraux) seront séropositifs et la distribution des animaux positifs sera uniforme dans le troupeau.

Au contraire, lors d'une infection de type exogène, les animaux séropositifs sont surtout confinés à une classe d'âge (Dubey *et al.* (64)). La mesure de l'avidité des anticorps immédiatement après des avortements, sur 8 à 10 vaches, apporte également des informations concernant le mode de transmission. Dans un troupeau subissant des avortements de type enzootique et où l'avidité des anticorps est élevée (donc témoin de la chronicité de l'infection), le mode de transmission endogène doit être considéré en premier lieu.

2.4.3. Etudes des facteurs de risques influençant les avortements chez les bovins

2.4.3.1. Stade de gestation

La mise en place progressive du système immunitaire fœtal et l'évolution de la relation hôte parasite au cours de la gestation influencent la survenue des avortements et l'efficacité de la transmission verticale.

Comme il a été expliqué précédemment, les infections en début de gestation sont plus à même de déclencher les avortements, car le fœtus n'est pas capable de déclencher une réponse immunitaire. En fin de gestation, une infection donnerait naissance à un veau sain, infecté congénital (Gibney *et al.* (74) ; Innes *et al.* (88) ; Innes *et al.* (89)).

Lors des expérimentations, les avortements sont obtenus quasi systématiquement pour une inoculation dans le premier tiers de gestation, alors que les fœtus sont généralement viables pour une inoculation plus tardivement dans la gestation. On note, selon les études : 5 avortements sur 6 vaches inoculées précocement, alors que dans la même étude toutes les vaches inoculées tardivement dans leur gestation ont donné naissance à des veaux viables, tous montrant des signes de néosporose (Williams *et al.* (183)) ; 8 avortements sur 8 vaches inoculées à 70 jours de gestation par voie intraveineuse (Macaldowie *et al.* (115)), 6 avortement sur 6 vaches inoculées à 70 jours de gestation, alors que dans la même étude les 6 vaches inoculées à 210 jours de gestation portaient des fœtus infectés viables. Par ailleurs, les avortements sont rarement provoqués lors des inoculations tardives, ou alors pour des doses extrêmement élevées (Fioretti *et al.* (70) ; McCann *et al.* (125)) (voir tableau 12).

D'après l'étude de 2004 faite par Gondim *et al.* (76) le risque de transmission transplacentaire après ingestion d'oocystes, qui est la voie naturelle de contamination, serait directement corrélé à l'avancement de la gestation

Pourtant, lors d'infection naturelle, les avortements sont le plus souvent rencontrés tardivement (entre 5 et 7 mois de gestation), même si ils peuvent survenir de 2 mois jusqu'au terme de la gestation. Pour 72 avortons infectés par *Neospora caninum*, les lésions observées était d'autant plus importantes et touchaient d'autant plus d'organes que le fœtus était jeune, et le nombre de PCR positives, tout comme la charge parasitaire et l'intensité des lésions diminuent de manière équivoque avec l'avancée de la gestation (Collantes-Fernandez *et al.* (37)). Quelques données peuvent expliquer cette observation : d'une part les très jeunes avortons sont rarement soumis à analyses donc peut être sous estimés ; d'autre part, la transmission de *Neospora caninum* serait plus à même de se produire en fin de gestation. En effet, lors d'une infection endogène, qui est la voie principale de transmission, la recrudescence de l'infection serait favorisée par l'avancée de la gestation et la baisse d'immunité concomitante (Innes *et al.* (89)). La majorité des transmissions naturelles interviendrait donc en fin de gestation, ce qui donnerait naissance majoritairement à des veaux cliniquement sains et néanmoins infectés, mais provoquerait également quelques avortements ; cette hypothèse reste encore à confirmer.

2.4.3.2. De manière expérimentale : influence de la dose et de la voie d'inoculation

Lors des différentes expérimentations, les lésions les plus graves et les plus rapides ont été observées après inoculation par voie intraveineuse, par comparaison avec la voie intramusculaire (Macaldowie *et al.* (115)). De même, une corrélation entre la dose inoculée et la gravité des lésions a pu être mise en évidence lors d'inoculation par voie sous cutanée (Bartley *et al.* (17)). Le même lien dose/effet a été retrouvé lors d'ingestion d'oocystes. En effet, les premières expérimentations, où le nombre d'oocystes ingéré était faible, n'ont pas provoqué de transmission verticale (Bergeron *et al.* (20)). Dans une autre étude expérimentale, la dose d'oocystes ingérée a pu être corrélée au taux de transmission verticale et à la survenue d'avortement chez la vache (Gondim *et al.* (76))

2.4.3.3. Séroprévalence individuelle

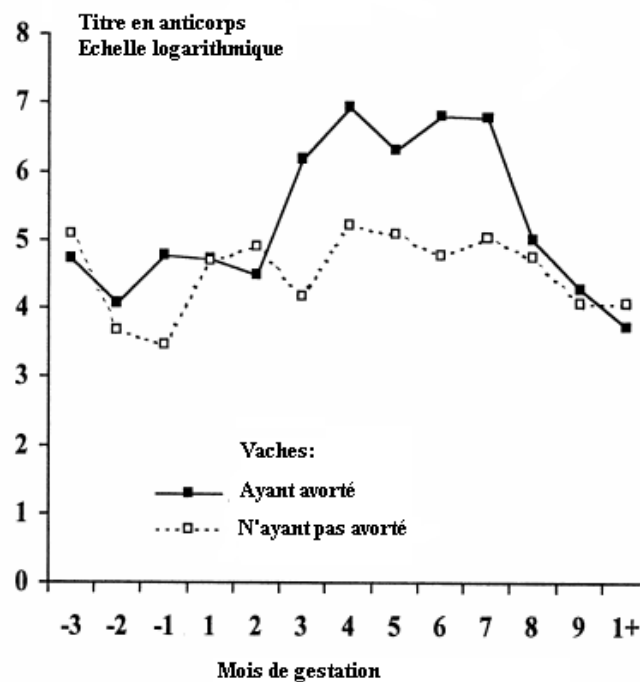
Les vaches séropositives vis-à-vis de *Neospora caninum* ont clairement un risque plus élevé d'avorter que les vaches séronégatives ((70) ; (82) ; (111) ; (139) ; (170) ; (186)) et cette association entre séropositivité et risque d'avortement a été démontrée aussi bien dans les études prospectives que rétrospectives. Le facteur de risque peut varier grandement, d'un risque 3 fois plus élevé jusqu'à 19 fois plus élevé d'avortement chez les séropositives, en fonction du groupe d'étude et des valeurs seuil de positivité choisies. Cependant, il apparaît clairement que le risque d'avortement s'accroît avec l'intensité du titre en anticorps anti *Neospora caninum* (Dubey *et al.* (64) ; Gondim *et al.* (76) ; MacAllister *et al.* (123) ; Quintanilla-Gozalo *et al.* (150)).

Chez les vaches avortant, une augmentation du taux d'anticorps est observée à partir du troisième mois de gestation, et se maintient à une valeur maximale à partir du septième mois de gestation. L'élévation du taux d'anticorps anti-*Neospora* est plus marquée chez les vaches qui avortent (Voir figure 8). Cette différence des valeurs en anticorps, plus élevées

chez les vaches avortant par rapport aux vaches n'avortant pas (mais séropositives), laisse à penser que les anticorps présents seraient non protecteurs (64).

Dans les troupeaux étudiés par Quintanilla-Gozalo (150), la très grande majorité des avortements (74,5%) est survenue lors du troisième trimestre de gestation, lorsque les taux en anticorps étaient au plus haut. Dans le cadre des infections latentes, il semble évident d'après les études prospectives que l'intensité et la durée de l'élévation du taux d'anticorps spécifique anti-*Neospora caninum* au cours de la gestation est corrélé au risque de mort fœtale (Dubey *et al.* (64)). C'est pourquoi, l'étude du taux d'anticorps anti-*Neospora caninum* pourrait être un outil pour identifier les animaux à haut risque d'avortement dans un troupeau atteint.

Figure 8 : Cinétique de la réponse en anticorps chez des bovins gestant infectés naturellement par *Neospora caninum*, pour 10 bovins ayant avorté et 12 bovins n'ayant pas avorté.
D'après Quintanilla-Gozalo *et al.* (150)



2.4.3.4.

Séroprévalence de troupeau

Il existe de nombreuses études et de nombreux cas rapportés qui ont mis en évidence la corrélation entre séroprévalence du troupeau et avortement à *Neospora caninum* (Dubey *et al.* (64)). Ceci serait dû à la fois au risque d'avortement accru chez les vaches infectées permanentes (voir plus haut) et au risque de nouvelle infection dans le troupeau. Cependant, une exposition récente à *Neospora caninum*, mise en évidence soit par une épizootie d'avortement dans le troupeau, soit par des séroconversions, n'implique pas forcément un taux d'avortement plus élevé les années suivantes. Les études menées sur les troupeaux après une épizootie montrent que le taux d'avortement du troupeau n'augmente que très peu l'année d'après (Dubey *et al.* (64)). Par contre, les avis divergent concernant les années suivantes. Selon Wouda *et al.* (186), les veaux nés de mères atteintes ont un risque 3,13 fois plus élevé d'avorter par la suite. Le taux d'avortement du troupeau va donc augmenter quelques années après l'exposition à *Neospora caninum*. Au contraire, dans d'autres études comme celle de Dijkstra *et al.* (40), la séroconversion du troupeau n'a pas été suivie d'une élévation du taux d'avortement. Cela pourrait être mis en relation avec une contamination horizontale massive, qui n'engendre pas de transmission endogène lors des gestations suivantes. L'épidémiologie de *Neospora caninum* et les notions de transmissions endogène ou exogène n'étaient pas encore connues au moment de ces études d'où les imprécisions. Certains points restent néanmoins encore à éclairer concernant l'épidémiologie des avortements à *Neospora caninum*.

2.4.3.5.

Age et parité

Dans certaines études, il apparaît que, lors d'avortements de type épizootique, le risque d'avorter s'élève avec l'âge (Wouda *et al.* (184)). Cependant, lors d'enzootie d'avortement, l'association avec l'âge semble être contraire. En effet, il a été rapporté un risque 7,4 fois plus élevé pour des génisses infectées congénitalement d'avorter lors de leur première mise à la reproduction (Thurmond *et al.* (170)), alors que ce risque est seulement 1,7 fois plus élevée pour la gestation lors de la première lactation. Dans une autre étude,

(Hernandez *et al.* (85)) il est observé un risque d'avortement 2,8 fois plus élevé au cours de la deuxième gestation pour des vaches infectées, mais aucune modification n'a été notée pour la première, la troisième et les gestations suivantes.

2.4.3.6. Présence de l'hôte définitif

La présence d'un chien dans les exploitations, leur nombre et la fréquence des observations de défécations des chiens dans la zone d'alimentation ont été associés à une augmentation du risque d'avortement, lors d'une étude portant sur 6 troupeaux des Pays-Bas entre 1995 et 1997 (Wouda *et al.* (184)). Lors des études épidémiologiques, la présence d'un hôte définitif à l'origine de l'exposition des vaches à l'infection, avait été fortement suspectée lors d'épidémie d'avortement, mais le rôle du chien n'était pas encore connu. Au contraire, dans d'autres études, aucun lien entre chien et avortements n'a été mis en évidence (Dubey *et al.* (64)). Cependant, comme les avortements à *Neospora* sont plus souvent le fait d'une recrudescence de l'infection chez des infectés permanent que le résultat d'une transmission horizontale, il n'est pas étonnant de ne pas toujours retrouver une corrélation.

Dans une étude de Wouda *et al.* (185), il a été observé une forte corrélation entre la séropositivité vis-à-vis de *Neospora caninum* chez le chien et une forte prévalence en anticorps anti-*Neospora caninum* chez les bovins. Dans les exploitations où aucun chien n'était présent, la séroprévalence était significativement plus faible chez les bovins, par rapport aux exploitations où vivaient un ou plusieurs chiens. Dans ce cas, les chiens étaient présents dans des exploitations où sévissaient les deux formes épidémiologiques, épizooties et enzooties d'avortements.

Au contraire, l'observation de canidés sauvages ou la présence de chats sur une exploitation semble être un facteur protecteur vis-à-vis de l'infection à *Neospora caninum* (64). Ceci serait probablement dû au fait que la présence des canidés sauvages ou de chats dans une exploitation serait souvent synonyme d'absence de chien, le chien étant supposé facteur de risque.

Des facteurs tels que la saison, le climat, l'alimentation, le type d'élevage, les conditions de vêlage, la fréquence des non délivrances ont été étudiés afin de savoir s'ils pouvaient être corrélés au risque d'avortement à *Neospora caninum*, sans réponse certaine (rapporté par Dubey (64)).

Il semblerait que les facteurs de stress, comme la sous-alimentation ou la saison des pluies puissent être associés à un taux plus élevé d'avortements, peut être en favorisant une recrudescence de l'infection (Dubey *et al.* (64)). Cependant, d'autres études doivent être menées afin d'identifier clairement les différents facteurs de risques.

2.5. Mise en cause de *Neospora caninum* lors d'avortements, établissement d'un lien de cause à effet

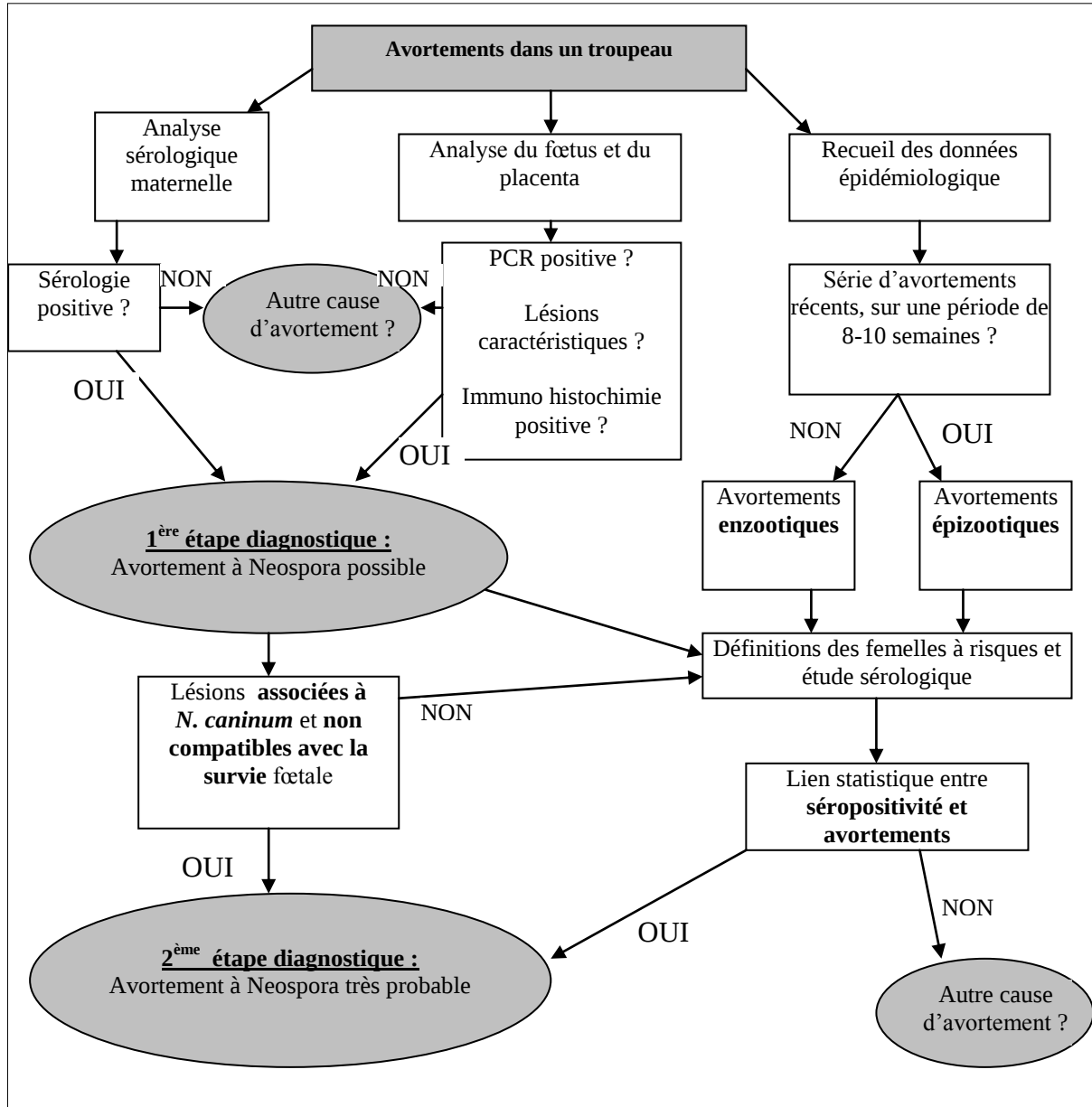
Les avortements sont un problème majeur en élevage, cependant, même pour des laboratoires bien équipés, la cause d'un avortement sur deux reste inconnue. Etablir une relation de cause à effet entre avortement et *Neospora caninum* est complexe, car les affections asymptomatiques sont courantes, et trouver le parasite ou son ADN ne signifie pas que celui-ci ait pu causer l'avortement.

Le diagnostic d'orientation d'un avortement à *Neospora caninum* repose sur des examens sérologiques, immuno-histochimiques et d'autres méthodes permettant de démontrer l'infection sur la mère et sur le fœtus. Pour parfaire cet objectif, il est important de démontrer la présence de *Neospora caninum* dans les lésions et d'exclure une autre cause d'avortement du diagnostic. Il faut ainsi considérer l'examen du sérum maternel et des fluides fœtaux, au même niveau que l'examen histologique ou l'analyse par PCR. Si les lésions observées sont jugées comme non compatibles avec la survie du fœtus, si elles peuvent être reliées par immuno-histochimie ou PCR au parasite *Neospora caninum* et si les autres causes sont exclues, alors on peut conclure à un avortement à *Neospora caninum* (63) (voir Figure 9).

Dans les cas où le fœtus ne pourrait être soumis à l'examen (autolyse notamment), il est important d'examiner le problème des avortements en fonction du contexte épidémiologique. En effet, l'implication de *Neospora caninum* dans des avortements peut également être confirmée par des études statistiques et épidémiologiques permettant d'associer les avortements dans un groupe « à risque » et une sérologie positive vis-à-vis de *Neospora caninum*. (Dubey et Schares (63) ; Schares *et al.* (156)).

Le groupe des femelles à risque doit être défini en fonction de la forme épidémiologique des avortements : dans le cas d'épidémie, il s'agit des femelles entre 58 et 260 jours de gestation au moment de l'épidémie alors que pour les avortements enzootiques, il s'agit de l'ensemble des femelles gestantes pendant la période étudiée (156). S'il existe un lien statistiquement significatif entre sérologie positive vis-à-vis de *Neospora caninum* et avortement dans ce groupe à risque, alors le parasite peut être mis en cause (voir Figure 9 : arbre de diagnostic).

Figure 9: Arbre diagnostic des avortements à *Neospora caninum*.
D'après Dubey et Scharles (63)



2.6. Autres conséquences de l'infection à *Neospora caninum* sur la reproduction chez les bovins

2.6.1. Influence de *Neospora caninum* sur la fertilité.

En dehors de l'impact de *Neospora caninum* sur la fécondité des bovins, une étude s'est intéressée aux effets du parasite sur la fertilité. Pour cela, 7518 inséminations ont été réalisées, 6556 inséminations sur des vaches séronégatives et 962 sur des vaches séropositives. Si une différence notable du point de vue de la survenue des avortements a été observée (7,1 fois plus d'avortements dans le groupe positif), aucune différence n'a été notée concernant la fertilité : le taux de réussite en première insémination du groupe des vaches positives était de 34%, contre 32,6% de réussite pour les vaches séronégatives. Il semblerait que *Neospora caninum* n'affecte pas la fertilité chez la vache (Lopez Gatius *et al.* (112)).

2.6.2. Influence de *Neospora caninum* sur la production laitière.

L'effet d'un avortement sur la production laitière est complexe. En effet, si un intervalle vêlage-vêlage allongé réduit le nombre de lactations sur une période d'années donnée, un avortement peut également prolonger la lactation au cours de laquelle il survient. C'est pourquoi, l'impact de *Neospora caninum* sur la production laitière est difficilement quantifiable. Cependant, d'après la synthèse sur le sujet de Chi *et al.* (34), il est apparu sur un troupeau que l'infection à *Neospora caninum* avait réduit de 4% la production laitière en première lactation, alors que dans une autre étude comparant les productions lactières pour différents numéro de lactation (première, seconde et troisième ou plus), aucune différence de production n'a été notée. En étudiant 25 troupeaux de vaches laitières en Ontario, la production laitière (test des trois premiers jours de lactation) s'est avérée inchangée, quelque soit la prévalence vis-à-vis de la néosporose. Par contre, le même test effectué par la même équipe quelques temps après a montré que la production laitière était diminuée pour les troupeaux à forte prévalence et avec un taux d'avortement élevé, alors qu'elle était inchangée pour les troupeaux séropositifs ayant un taux d'avortement normal (34). A l'heure actuelle, l'impact de *Neospora caninum* sur la production laitière est donc flou, et nécessite de plus amples investigations.

2.7. Contrôle de la transmission verticale de *Neospora caninum* chez les bovins.

Différentes méthodes ont été proposées et récemment comparées afin de contrôler les infections à *Neospora caninum*, et surtout les avortements qui en découlent. Ces méthodes incluent une lutte offensive (faire disparaître la maladie) et défensive (éviter l'entrée de la maladie).

2.7.1. Mesures de lutttes offensives visant à contrôler les avortements à *Neospora caninum*

2.7.1.1. Chimiothérapie curative: aucune molécule efficace disponible actuellement

Stratégiquement, il peut être intéressant de tester l'efficacité d'un traitement des veaux nouveau-nés issus de mères séropositives avec un médicament approprié. Le but d'une telle métaphylaxie est d'anticiper afin d'éliminer les tachyzoïtes qui se sont développés après la naissance et ainsi prévenir la mise en place d'une infection chronique. Cette méthode pourrait aider à produire des lignées indemnes de *Neospora caninum* indépendamment du statut de la mère. Les sulfamides ont d'abord été proposés comme molécules curatives, associées ou non au triméthoprim, mais leur efficacité semble très limitée. Des essais concernant le toltrazuril et son dérivé le ponazuril ont été menés ou sont en cours. Dans le cerveau des veaux traités avec du ponazuril, le parasite est revenu à un seuil indétectable (Kritzner *et al.* (99)); chez la souris infectée expérimentalement, le toltrazuril serait capable de bloquer la transmission transplacentaire (rapporté par Dubey *et al.* (64)). Aucune molécule n'a actuellement prouvé son efficacité sur le terrain

2.7.1.2. Contrôle de l'infection par réforme préférentielle des animaux positifs

Une analyse statistique visant à évaluer les différentes méthodes de contrôle a été réalisée en Suisse en 2006 (Haesler *et al.* (81)). Une politique de réforme annuelle de tous les animaux séropositifs d'un effectif réduirait la prévalence de la néosporose efficacement et rapidement en Suisse de 12% à moins de 1% dès la première année de simulation. Cependant, cette méthode peut paraître difficile à appliquer d'un point de vue économique.

2.7.1.3. Autres moyens de lutte offensive contre *Neospora caninum*

Le transfert embryonnaire, de mère infectée à une receveuse saine semble protéger le fœtus de l'infection (64). Cependant, cette méthode est peu réalisable à grande échelle.

La prévention des possibles facteurs favorisant une recrudescence de l'infection, telles que le stress, une contamination alimentaire de type mycotoxine, ou une sous nutrition, pourrait également avoir un effet bénéfique (64).

2.7.2. Mesures de lutttes défensives visant à contrôler les avortements à *Neospora caninum*

2.7.2.1. Prophylaxie vaccinale, un outil d'avenir en développement

La recherche d'un vaccin est l'une des priorités concernant la lutte contre *Neospora caninum*. Idéalement, un vaccin contre la néosporose devrait protéger contre les pertes embryonnaires et contre la transmission verticale. En outre, ce vaccin devrait permettre la différenciation entre animaux vaccinés et infectés.

Il existe des preuves claires montrant que certaines vaches infectées hors gestation par *Neospora caninum* sont capables de développer un degré d'immunité suffisant pour empêcher la transmission du parasite lors des gestations suivantes (Innes *et al.* (88) ; Innes *et al.* (89)). La transmission verticale du parasite a été prévenue chez la souris par l'inoculation de parasite vivant ou par immunisation à l'aide de parasite non viables, avant la gestation (Miller *et al.* (130); Ramaroorthy *et al.* (152)). Chez le Bovin, une protection vis-à-vis de la transmission verticale a été observée, après inoculation de tachyzoïtes à des vaches avant leur gestation : sur les 3 vaches inoculées avant la gestation, aucune n'a transmis le parasite une fois mise à la reproduction, alors que la transmission verticale du parasite a été effective pour les groupes d'animaux inoculés en milieu et en fin de gestation. (Innes *et al.* (90))

Les recherches s'orientent actuellement vers le développement d'un vaccin inactivé. En effet, même s'ils sont plus à même de déclencher une réponse immunitaire à médiation cellulaire appropriée, les vaccins vivants présentent le désavantage d'être plus durs à produire et à stocker. De plus, le potentiel zoonotique de *Neospora caninum* n'est pas exclu, donc un vaccin vivant pourrait être un risque pour la santé humaine en cas d'inoculation accidentelle. Il nécessiterait de plus des recherches poussées en termes de limite en résidus des denrées alimentaires.

Une préparation à base de parasites tués adjuvée par POLYGENTM a été la seule à produire chez les bovins des taux d'interféron gamma identiques à ceux obtenus par infection expérimentale. Cependant, son utilisation s'est soldée par un échec en matière de prévention de la transmission transplacentaire chez la vache inoculée en milieu de gestation (Andrianarivo *et al.* (4)). Une autre préparation à base de tachyzoïtes tués adjuvée par Havlogen (NeoguardTM) a été récemment approuvée par le département américain de l'agriculture. Après administration à 56 et 77 jours de gestation, il a montré une efficacité modérée – de l'ordre de 46% – en matière de prévention des avortements chez des vaches et des génisses inoculées à 95 jours de gestation. Cependant, ce vaccin s'est montré incapable d'empêcher la transmission du parasite au fœtus (Innes *et al.* (88) ; Dubey *et al.* (64)).

Les mesures hygiéniques de défense vis-à-vis de l'infection à *Neospora caninum* visent à prévenir la transmission du chien – et des autres hôtes définitifs potentiels – aux bovins, ainsi que la transmission via l'alimentation. Pour cela, on recommande d'éviter au maximum les contacts entre les fèces de chien (et surtout les chiots) et l'alimentation ou l'eau destinée aux bovins. Les chiens, ou autres hôtes définitifs, ne devraient pas avoir accès aux tissus infectés issus des hôtes intermédiaires (Dubey *et al.* (64) ; Gondim *et al.* (77)).

2.7.3.

En conclusion : contrôle de la néosporose sur le terrain

Afin d'évaluer l'impact des différentes stratégies de contrôle sur la séroprévalence vis-à-vis de *Neospora caninum* dans le cheptel laitier suisse, un modèle dynamique de simulation déterministe a été développé en 2006 (Haesler *et al.* (81)). Ce modèle a été utilisé pour évaluer quatre stratégies de contrôle possibles : l'abattage des animaux positifs, l'exclusion des génisses ou des vaches issues d'une mère séropositive pour le renouvellement du troupeau, le traitement médical des veaux nouveau-nés issus de mères séropositives (traitement non disponible), et la vaccination de tous les animaux, indemnes ou infectés (non disponible en Europe).

Toutes les stratégies testées par Haesler montrent une efficacité concernant la baisse de la prévalence de la maladie, même si la réforme totale de toutes les positives semble être la plus efficace (une politique de réforme annuelle de tous les animaux séropositifs d'un effectif réduirait la prévalence efficacement et rapidement en Suisse de 12% à moins de 1% dès la première année de simulation). Cependant, cette méthode peut paraître difficile à appliquer d'un point de vue économique. Il semblerait que le dépistage de l'ensemble du troupeau, puis l'exclusion de la reproduction de tous les veaux femelles issus de mères positives serait la solution la plus économique. Le traitement médical de tous les veaux infectés congénitaux (métaphylaxie) pour anticiper la mise en place d'une infection chronique, s'il était disponible, à montré le rapport coût bénéfice le plus élevé, et serait donc une solution d'avenir (Haesler *et al.* (81) ; Kritzner *et al.* (99)).

Neospora caninum est reconnu comme l'un des agents infectieux les plus impliqués lors d'avortements bovins. L'infection endogène transplacentaire par l'intermédiaire de tachyzoïtes maternels réactivés est le mode le plus fréquent de transmission de la mère au fœtus, même si la transmission exogène après une infection primaire est possible. Les troubles observés apparaissent lorsque le parasite se multiplie dans le placenta et le fœtus, en générant en parallèle une réponse immunitaire maternelle délétère à la survie fœtale. Les pertes économiques causées par l'infection à *Neospora caninum*, en grande partie liées aux pertes générées par les avortements, sont majeures, d'où l'intérêt d'un plan de lutte organisé. Le parasite *Neospora caninum* est d'emblée apparu comme un parasite très efficacement transmis entre mère et fœtus chez les bovins. Cependant, il est également caractérisé par son très large tropisme d'hôtes. On peut donc être amené à étudier, par comparaison avec les bovins, la transmission verticale entre la mère et le fœtus pour les autres hôtes intermédiaires touchées par *Neospora caninum*, afin de définir si les troubles observés chez les bovins pourraient être généralisés.

3. Transmission verticale de *Neospora* sp. chez de nombreux hôtes intermédiaires autres que le bovin : un agent de plus en plus incriminé lors de troubles de la reproduction

3.1. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez les ovins : des troubles de la reproduction avérés

3.1.1. Mise en évidence d'une transmission verticale chez les ovins

Le potentiel infectieux de *Neospora caninum* pour l'espèce ovine fut découvert très tôt. Dès 1990 (Dubey et Lindsay (54)), le parasite fut mis en évidence sur un agneau atteint de paralysie. Le potentiel de transmission du parasite fut rapidement étudié expérimentalement, afin de savoir si le mouton pouvait être un modèle d'étude de la néosporose bovine. La première preuve d'une transmission à la descendance fut apportée par Dubey et Lindsay, en 1990. Deux brebis furent inoculées, l'une par voie intra veineuse et l'autre par voie sous cutanée, à l'aide de tachyzoïtes de *Neospora caninum*, à environ 90 jours de gestation. Les deux chèvres avortèrent chacune de deux fœtus à 25 et 26 jours post inoculation. Les lésions retrouvées sur les avortons étaient compatibles avec celle observées lors de néosporose bovine. Le parasite fut mis en évidence dans le système nerveux central des 4 avortons (54). Diverses expérimentations ont ensuite confirmé la possibilité d'une transmission verticale, mais seulement quelques observations de terrain ont été publiées. *Neospora caninum* a ainsi été identifié sur des moutons et leur fœtus de manière sporadique au Japon en 2001 (Kobayashi *et al.* (98)), en Amérique du Sud en 2003 (Moore (132)), en Suisse en 2005 (Hassig *et al.* (83)) et pour trois cas d'avortements spontanés de moutons en Nouvelle Zélande en 2005 (West *et al.* (182)); confirmé par Howe *et al.* en 2008 (87).

3.1.2. Efficacité et conséquence de la transmission verticale de *Neospora caninum* chez les Ovins

3.1.2.1. Efficacité de la transmission verticale

Tout comme chez les bovins, la transmission verticale du parasite peut conduire à diverses situations : avortement, naissance d'un agneau atteint de néosporose ou naissance d'un agneau cliniquement sain. De manière expérimentale, il semble que l'infection soit très facilement transmissible à la descendance. Lors de la première expérimentation, le parasite provoqua l'avortement des deux brebis inoculées (Dubey et Lindsay (54)). Dans une autre étude de McAllister *et al.* publiée en 1996, 36 brebis furent inoculées à des stades de gestation différents. Des lésions compatibles avec la multiplication de *Neospora caninum* furent retrouvées pour 90% de l'ensemble des agneaux et la parasite avait été observé pour 38% des avortons, 25% des agneaux atteints de néosporose à la naissance et pour 39% des agneaux cliniquement sains (124). Sur l'ensemble des études menées, il semblerait que le taux de transmission de *Neospora caninum* à la descendance, après infection expérimentale, soit supérieur à 90% ((29) ; (95) ; (124)), ce qui se rapproche du taux de transmission de *Neospora caninum* chez les bovins.

3.1.2.2. Conséquences de la transmission verticale

Comme chez les bovins, la transmission verticale de *Neospora caninum* peut soit provoquer un avortement, soit donner naissance à un agneau infecté. Dans l'étude de McAllister (124), après inoculation à 36 brebis, à côté des avortements, des naissances d'agneaux faibles, incapables de téter et à potentiel de croissance faible ont eu lieu, ainsi que des naissances d'agneaux cliniquement sains, pour lesquels le parasite a néanmoins été mis en évidence par histologie.

3.1.3. Mécanismes à l'origine d'une transmission verticale chez les ovins

3.1.3.1. Un mode de transmission exogène avéré

La transmission exogène expérimentale du parasite est un fait avéré dans l'espèce ovine. En effet, après inoculation à la brebis gestante le parasite a peut être retrouvé à la fois dans les tissus fœtaux et les placentas (MacAllister *et al.* (124) ; Buxton *et al.* (29)), ce qui prouve son passage de la mère au fœtus au cours de la gestation. Par contre, le mode de contamination à l'origine des avortements observés de manière naturelle reste inconnu, même si, par analogie avec ce que l'on observe chez les bovins, une contamination via les fèces de chien au cours de la gestation est fortement suspectée (87). De plus, les chiens sont couramment rencontrés dans les élevages ovins.

3.1.3.2. Un mode de transmission endogène suspecté

Une seule étude, publiée par Joley *et al.* en 1999, porte sur la possibilité de transmission répétée du parasite chez la brebis (95). Pour cela, des brebis utilisées lors d'une expérimentation précédente, qui avaient été inoculées au cours de leur gestation en 1995 (McAllister *et al.* (124)) furent réutilisées en 1996. Quatre brebis infectées en 1995 furent remises à la reproduction sans être réinfectées, cinq brebis infectées en 1995 furent réinfectées par des tachyzoïtes au cours de leur gestation en 1996, 2 brebis qui n'avaient jamais été infectées furent nouvellement inoculées en 1996. Au cours de l'expérimentation, 7 brebis sur 11 avortèrent : deux des quatre brebis infectées uniquement en 1995, trois des cinq brebis infectées en 1995 et 1996 et les deux brebis nouvellement infectées en 1996. Des lésions typiques de néosporose furent retrouvées sur tous les agneaux et sur 7 avortons sur 11 (les 4 autres étant autolysés). Le parasite fut mis en évidence par histologie sur au moins un animal par groupe (voir tableau 16). Cette étude a ainsi démontré la possibilité d'une transmission verticale de *Neospora caninum* d'une mère infectée latente au fœtus, le parasite ayant pu être transmis de façon répétée sur deux gestations successives en l'absence de nouvelle infection.

L'ensemble des brebis infectées en 1995 avait gardé, au moment de la nouvelle expérimentation, un taux en anticorps anti-*Neospora* élevé, qui n'a pas protégé des infections congénitales. Une élévation notable du taux d'anticorps, à partir de 95 jours de gestation fut notée pour les 9 brebis précédemment infectées, même pour les brebis n'ayant pas reçu une nouvelle inoculation de tachyzoïtes (voir tableau 16). Ces résultats sont compatibles avec la recrudescence d'une infection au cours de la gestation, comme dans l'espèce bovine. On peut quand même remarquer que 2 brebis déjà infectés, n'ont pas avorté lors de la deuxième épreuve, alors que les brebis témoins ont avorté. La mise en place d'une immunité partielle serait donc possible.

Tableau 16 : Naissance ou avortement pour des brebis après inoculation sur une ou deux gestations de $1,7.10^5$ tachyzoïtes de *Neospora caninum* à 65 jours de gestation par voie intraveineuse et suivi du titre en anticorps
D'après Jolley *et al.*, 1999, (95)

Brebis	Inoculation		Nombre Agneaux/Avortons	Lésions/parasite détectés	Titre en anticorps	
	1995	1996			A 67j de gestation	à 95-110 de gestation
A1	+	-	1 Agneau, décédé après mise bas	+/+	ND	1:12 800
A2	+	-	1 agneau	+/+	1:400	1:3200
A3	+	-	1 avorton	+/+	1:400	1:800
A4	+	-	1 avorton	+/-	1:800	1:800
B1	+	+	1 agneau	+/+	1:400	1:800
B2	+	+	1 agneau	+/-	1:1600	1:3200
B3	+	+	1 avorton	+/+	1:1600	1:6400
B4	+	+	2 avortons	-/ND -/ND	1:400	1:3200
B5	+	+	2 avortons	+/- +/-	1:1600	1:6400
C1	-	+	2 avortons	-/ND -/ND	<1:50	1:6400
C2	-	+	2 avortons	+/- +/-	<1:50	1:12 800

On peut noter qu'au moment de cette étude, la pathogénie des avortements à *Neospora caninum* chez les bovins était mal connue. En effet, chez les bovins, on sait maintenant que seule l'infection congénitale peut conduire à des transmissions endogènes répétées et qu'une infection préalablement à une gestation apporterait plutôt une immunité pour les gestations suivantes. Chez les ovins, de manière expérimentale, il semblerait au contraire qu'une recrudescence de l'infection puisse avoir lieu chez des animaux primo-infectés à l'âge adulte.

Pour McAllister *et al.* (124), une transmission endogène par des mères infectées de manière congénitale serait envisageable : en effet, certaines brebis infectées ont donné naissance à des agneaux cliniquement sains mais infectés par *Neospora*, qui pourraient, comme c'est le cas chez les bovins, transmettre l'infection lorsqu'ils seront mis à la reproduction. Cependant, des études sur le long terme n'ont pas été menées.

Les données de ces études sont à prendre avec précautions, d'une part car le nombre d'animaux utilisés est faible, et d'autre part car les animaux avaient reçu des très fortes doses de tachyzoïtes par voie intraveineuse, ce qui est peu compatible avec les conditions naturelles.

Il n'existe aucune publication concernant des avortements répétés liés à *Neospora caninum* chez les ovins observés sur le terrain.

3.1.4. Pathogénie des avortements à *Neospora caninum* chez les ovins

3.1.4.1. Dommmages placentaires causés par *Neospora caninum*

Comme chez les bovins, des lésions de placentite nécrotique, parfois associées à des minéralisations sont rapportées (Howe *et al.* (87), McAllister *et al.* (124)). Une infiltration diffuse, modérée voire sévère, de type leucocytaire est souvent présente. Des tachyzoïtes ont été observés sur des coupes histologiques de placentas.

Les lésions observées lors de transmissions verticales chez les ovins sont semblables à celles observées chez les bovins. L'autolyse des fœtus est fréquente, mais des lésions typiques de néosporose ont été mises en évidence. Une encéphalite multifocale, avec infiltration lymphocytaire est la lésion le plus souvent retrouvée, avec parfois une méningite associée (McAllister *et al.* (124)). Ces lésions sont le plus communément présentes dans le cortex, le thalamus, le mésencéphale le tronc cérébral.

Les muscles squelettiques, le diaphragme, le myocarde et la langue sont souvent altérés par des infiltrations leucocytaires multifocales, non suppurées. Des hépatites périvasculaires ou périportales concomitantes à l'avortement à *Neospora caninum* sont également rapportées (McAllister *et al.* (124)).

Comme chez les bovins, deux grands mécanismes peuvent expliquer la survenue d'avortement : soit la multiplication du parasite et les lésions associées est à l'origine de l'arrêt de la gestation, soit la réponse immunitaire induite par l'infection à *Neospora caninum* est à l'origine du rejet du fœtus. Cette dernière hypothèse n'a pas fait l'objet d'études spécifiques chez les ovins, mais les avortements à *Neospora* chez les ovins semblent, comme chez les bovins, être fortement influencés par le stade de gestation, et donc par le statut immunitaire de la mère et du fœtus.

Lors des expérimentations, les infections précoces (avant 65 jours de gestation) ont quasiment toutes (23/24) menées à l'avortement (exclusion faites des infections répétées où une certaine immunité a pu se mettre en place) (Buxton *et al.* (29); Jolley *et al.* (95); McAllister *et al.* (124)). Les infections tardives (à 120 jours de gestation) ont toutes menées à la naissance d'agneaux cliniquement sains, pour lesquelles une infection a parfois été mise en évidence (McAllister *et al.* (124)).

Lors d'une infection en milieu de gestation (à environ 90 jours de gestation), les brebis ont soit avorté, soit donné naissance à un agneau malade, soit donné naissance à un agneau sain (Buxton *et al.* (29) ; Dubey et Lindsay (54); McAllister *et al.* (124)) (voir tableau 17)

Tableau 17 : Déroulement de la gestation après inoculation de tachyzoïtes ($1,7.10^5$ à $1,7.10^6$) par voie intraveineuse chez des brebis à différents stades de gestation.

Nombre Brebis	Jours de gestation lors de l'inoculation	Nombre de brebis ayant avorté (Nombre d'agneaux)	Nombre de brebis ayant mis bas des agneaux cliniquement atteints (Nombre d'agneaux)	Nombre de brebis ayant mis bas des agneaux cliniquement sains (Nombre d'agneaux)	référence
12	65	12 (19)	0	0	(124)
12	90	8 (10)	2 (4)	2 (3)	
12	120	0	0	12 (15)	
2	65-67	2 (4)	0	0	(95)
8	45	8 (10)	0	0	(29)
8	65	7 (10)	0	1 (1)	
8	90	6 (7)	2 (1)	2 (1)	

L'influence du stade de gestation sur la survenue des avortements est probablement à mettre en lien, comme c'est le cas chez les bovins, avec l'évolution de la relation hôte/parasite au cours de la gestation et les modifications immunitaires fœtales et maternelles associées.

3.1.5. Approche épidémiologique des avortements à *Neospora caninum* chez les ovins

La prévalence de la néosporose ovine est faible de part le monde. Au Royaume-Uni, la prévalence vis-à-vis de *Neospora caninum* dans la population de brebis ayant subi des avortements n'était que de 0,45% en 2002 (3 sérums positifs sur 600 brebis ayant avorté) (Helmick *et al.* (84)). Elle serait évalué à 2% en Italie (Masala *et al.* (119)) ; de 3,2 à 9,5% au Brésil (Figliuolo *et al.* (69)) et à 10,3% dans des troupeaux à avortements enzootiques en Suisse (rapporté par Dubey *et al.* (64)). La néosporose n'est donc pas une maladie majeure en élevage ovine. Les agents infectieux les plus couramment mis en cause lors d'avortements dans l'espèce ovine sont des bactéries, comme *Chlamydophila abortus*, *Coxiella burnetti*, *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Brucella abortus*, *Listeria* sp., des virus comme le virus de la fièvre catarrhale ovine (Bluetongue), et des parasites comme *Toxoplasma gondii*. Cependant, il reste de nombreux avortements dont la cause reste inexpliquée, ce qui laisse une place pour des investigations plus poussées concernant *Neospora*.

3.1.6. Autres conséquences de l'infection à *Neospora caninum* sur la reproduction dans l'espèce ovine

La fertilité des ovins pourrait être affectée par des infections latentes à *Neospora caninum*. En effet, les brebis déjà infectées auparavant, remises à la reproduction ont montré une fertilité diminuée (Jolley *et al.* (95)) : seules deux paires de jumeaux sur 9 gestations (taux de fertilité de 122%, contre 140 à 160% attendus pour l'espèce étudiée) soit 22 % des gestations lors de la gestation suivant l'infection, contre 39% lors de la première mise à la reproduction. Cependant, le nombre d'animaux étudiés est faible, et d'autres investigations sont nécessaires pour confirmer l'effet de *Neospora* sur la fertilité ovine.

Le parasite *Neospora* est fortement transmissible de la mère au fœtus chez les ovins, et montre une grande similitude de pathogénie par rapport aux observations faites chez les bovins. La néosporose peut raisonnablement être prise en compte dans le diagnostic différentiel des avortements dans cette espèce.

3.2. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez les caprins : des troubles de la reproduction occasionnellement observés

3.2.1. Mise en évidence d'une transmission verticale chez les caprins.

La transmission verticale de *Neospora caninum* chez les caprins est suspectée dès 1992, après observation d'avortements à protozoaires sur deux chèvres (Barr *et al.* (10)). Les fœtus présentaient des lésions semblables à celles observées chez les bovins et le parasite fut mis en évidence sur coupe histologique de cerveau. La même année, le parasite fut identifié dans le cerveau d'un chevreau prématuré, faible et présentant des signes neurologiques (Dubey (44)). Par la suite, le parasite fut incriminé lors d'avortement sur une chèvre laitière en 1996 (Dubey *et al.* (60)).

La transmission verticale fut prouvée expérimentalement en 1995 (Lindsay *et al.* (106)), par inoculation de souches de tachyzoïtes à 6 chèvre naines. *Neospora caninum* fut alors retrouvé sur tous les placentas et avortons analysés.

3.2.2. Pathogénie des avortements à *Neospora caninum* chez les caprins

3.2.2.1. Dommages placentaires causés par *Neospora caninum*

Le parasite est couramment retrouvé dans le placenta après infection expérimentale, associé à une placentite nécrotique multifocale qui s'apparente aux lésions décrites chez les bovins (106). De manière naturelle, le parasite sous forme tachyzoïte a été identifié sur des coupes histologiques de placenta (10).

Les lésions typiques de néosporose sont retrouvées chez les caprins, de même que l'autolyse fœtale. A l'examen anatomo-pathologique, on observe une méningo-encéphalite multifocale, nécrotique, avec infiltration cellulaire périvasculaire et gliose ((44) ; (66) ; (106)). Des kystes à bradyzoïtes sont fréquemment rencontrés dans le système nerveux central, associés ou non aux lésions inflammatoires. Des minéralisations ectopiques sont parfois décrites ((44) ; (106)). Une hypoplasie cérébelleuse avec hydrocéphalie a été rapportée par Dubey *et al.*, sur le cas décrit en 1996 (60).

Des kystes tissulaires ont été observés sur des coupes de muscles squelettiques par Dubey *et al.* en 1992 (44), mais ils n'ont pas été retrouvés sur les autres cas décrits. Une inflammation du cortex rénal a été notée pour l'un des fœtus (Dubey *et al.* (44)), ainsi qu'une myocardite avec dégénérescence nécrotique (Eleni *et al.* (66))

3.2.3. Approche épidémiologie des avortements à *Neospora caninum* chez les caprins

La séroprévalence individuelle vis-à-vis de *Neospora caninum* est faible chez les caprins, elle serait de 0,7% au Sri-Lanka (Naguleswaran *et al.* (135)) , de 6,6% en Argentine (Moore *et al.* (133)) et jusqu'à 15% au Brésil (Uzeda *et al.* (175)), où l'affection semble être plus courante. La séroprévalence de troupeau est plus importante, la moitié des troupeaux testés en Argentine (53%), avait au moins un animal positif. Une séroprévalence de 6,5% a été trouvée dans le troupeau du Costa Rica où avait eu lieu l'avortement décrit par Dubey *et al.* (60). Cependant, la séropositivité comme facteur de risque d'avortement n'a pas pour l'instant été étudiée. Il apparaît tout de même que la séropositivité ne serait pas corrélée avec l'âge mais plutôt répartie de manière uniforme chez les caprins, d'où un mode de transmission plutôt vertical dans cette espèce.

Les avortements à *Neospora caninum* sont rarement observés de manière naturelle dans l'espèce caprine : avortements à protozoaires s'apparentant à *Neospora caninum* en 1992 (Barr *et al.* (10)), un avortement sur une chèvre naine en 1992 (Dubey *et al.* (44)), un cas d'avortement sur une chèvre laitière en 1996 au Costa Rica (Dubey *et al.* (60)), un cas d'avortement à *Neospora* en Italie en 2004 (Eleni *et al.* (66)). Un cas de prématuré, souffrant de troubles neurologiques et mort quelques heures jours après la naissance a été rapporté, au Brésil en 2001 (Corbellini *et al.* (38)).

Même si la séroprévalence est faible et que peu d'avortement à *Neospora* ont été décrits à l'heure actuelle, beaucoup d'avortements restent inexplicables dans cette espèce. Dans une étude de Masal *et al.* (119), sur l'ensemble des échantillons provenant de chèvres ayant avorté, seuls 17% ont été positifs pour au moins un des agents pathogènes majeurs testés. Sur les 31 échantillons où un agent pathogène avait été incriminé par PCR, *Neospora caninum* a été détecté dans 8,6% des cas, contre 13% des fœtus et 25% des placentas pour *Toxoplasma gondii*, 12,5% des placentas pour *Chlamydia abortus* et 12,5% des placentas pour *Coxiella burnetii*. Des recherches supplémentaires concernant *Neospora caninum* et son implication lors d'avortement chez les caprins pourraient se révéler intéressantes.

3.3. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez les autres ruminants : un agent à suspecter lors de troubles de la reproduction

3.3.1. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez l'antilope (*Tragelaphus imberis*) à l'origine de néomortalité

Chez l'antilope, l'infection par *Neospora caninum* a été diagnostiquée sur deux jumelles antilopes (*Tragelaphus imberis*) mort-nées en décembre 1999 ainsi que sur un autre mort-né mâle, tous trois provenant du zoo de Hanovre (Allemagne). Les avortons ne présentaient pas de lésions macroscopiques, mais les lésions microscopiques observées étaient typiques de néosporose : méningo-encéphalite multifocale nécrotique, minéralisations

ectopiques, myocardite, hépatite, avec infiltrations cellulaires périvasculaires. Le parasite a été incriminé par PCR et/ou par sérologie pour chacun des trois avortons (Peters *et al.* (142)).

La transmission verticale de *Neospora caninum* est donc possible chez l'antilope. De plus, l'absence de lésions macroscopiques sur les petits examinés laisse suggérer, selon Peters *et al.*, que l'infection à *Neospora caninum* pourrait dans cette espèce, conduire à la naissance d'animaux infectés mais cliniquement sains, à l'origine de la persistance de l'infection, comme c'est le cas chez les bovins (142).

3.3.2. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez les ruminants sauvages, cerf (*Cervus eldi siamensis*) et daim (*Dama dama*).

Des kystes tissulaires apparentés à *Neospora caninum* ont été retrouvés dans le cerveau d'un cerf mort-né provenant d'un zoo français, associé à des lésions d'encéphalite non suppurée typiques de néosporose. Le diagnostic a été confirmé par immuno-histochimie, mettant en évidence la présence d'antigènes spécifiques de *Neospora caninum*. (Dubey *et al.* (62))

La transmission verticale du parasite a également été suspectée chez le daim : des kystes tissulaires ont été retrouvés en 2004 sur un daim de trois semaines présentant des troubles neurologiques. Le diagnostic fut confirmé par PCR et immuno-histochimie. (Soldati *et al.* (165))

3.3.3. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez les camélidés, Alpaga (*Vicugna pacos*) et Lama (*Lama glama*) : des avortements récemment décrits

Cinquante fœtus provenant de deux régions d'élevage de camélidés péruviens où les avortements étaient nombreux ont été soumis à analyse (Serrano-Martinez *et al.* (161)). Pour 26% des échantillons (13/50), des lésions suggestives d'un avortement à protozoaires ont été

observées. Une infection à *Neospora caninum* a été détectée par PCR et/ou immuno-histochimie pour 28% des fœtus (14/50), dont 8 montrant des lésions associées à des protozoaires, alors qu'aucun fœtus n'a été contrôlé positif pour *Toxoplasma gondii*. L'infection à *Neospora caninum* était plus fréquente lors de la deuxième moitié de gestation, ce qui est concordant avec les avortements observés de manière naturelle chez les bovins.

Les résultats de cette étude montrent que le parasite peut être transmis par voie transplacentaire chez les camélidés et que son rôle doit être considéré lors d'avortement dans ces espèces.

3.4. Transmission verticale de *Neospora* sp. chez les équidés: un agent émergent lors de troubles de la reproduction.

3.4.1. Mise en évidence d'une transmission verticale chez les équidés

La première mise en évidence du parasite chez le cheval se fit sur un avorton, en 1990, par Dubey et Porterfield (61) ce qui démontra également la possibilité d'une transmission verticale dans cette espèce. Des tachyzoïtes de *Neospora*, appelés à ce moment *Neospora caninum*, furent retrouvés sur des coupes histologiques de poumon d'un fœtus avorté deux mois avant terme. Ces tachyzoïtes réagissaient fortement en immuno-histochimie vis-à-vis de *Neospora caninum* mais pas pour *Toxoplasma gondii*.

Un autre avortement à *Neospora* a été identifié en Normandie, par Pronost *et al.* en 1999 (148) ce qui est actuellement le seul cas décrit en France. Cependant, d'après une étude de 2003, le parasite a été identifié par PCR sur 3 cerveaux de fœtus (sur 91 analysés), 2 cœurs (sur 77 analysés) et 1 placenta pour 91 avortons collectés entre 1999 et 2002 en Normandie, même si la cause des avortements n'a pas pu être reliée de manière certaine à *Neospora* (Pitel *et al.* (146)).

En 1996, le parasite fut identifié sur une pouliche de 1 mois de race Quarter-Horse, qui présentait des troubles neurologiques depuis sa naissance. Des kystes tissulaires, identifiés par immuno-histochimie comme étant des kystes de *Neospora caninum*, furent retrouvés dans le cerveau et dans les muscles oculaires, ce qui est une localisation inhabituelle du parasite (109).

Il est important de noter que pour l'instant on ne sait pas quelle est l'implication respective de *Neospora caninum* ou *Neospora hughesi* dans ces avortements ((109) ; (155))

3.4.2. Pathogénie des avortements à *Neospora* sp. chez les équidés

Peu de données sont disponibles concernant la pathogénie des avortements à *Neospora caninum* chez les équidés. Comme chez les bovins, les lésions observées sont majoritairement d'ordre microscopique et circonscrites au système nerveux central, avec une méningo-encéphalite nécrotique multifocale dominante ((148) ; (155)). Des lésions d'hépatite multifocale nécrotique, de néphrite et d'adénite des nœuds lymphatiques mésentériques sont décrites chez une pouliche infectée de manière congénitale, mais n'ont pas été retrouvées sur les fœtus avortés (109)

Sur l'avorton français, une légère congestion de l'allanto-chorion et un épanchement péritonéal modéré (100ml) ont été retrouvés à l'autopsie. (Pronost *et al.* (148))

3.4.3. Approche épidémiologique des avortements à *Neospora* sp. chez les équidés

La séroprévalence de *Neospora* sp. chez les chevaux est relativement élevée – elle est estimée à 11,5% pour 536 chevaux en Alabama (33), 11,9% pour 800 chevaux en Israël (97), 23% pour 434 chevaux en Normandie (145) et 32% pour 208 chevaux de différentes régions des Etats-Unis (IFAT) (177) – alors que le nombre d'avortements publiés est faible. Le

potentiel de transmission de *Neospora caninum* serait plus faible chez le cheval que chez la vache. En effet, dans une même zone géographique, les séquences ADN de *Neospora caninum* sont plus fréquemment détectées par PCR chez les avortons bovins que chez les avortons équins, alors que les séroprévalences des juments et des vaches sont identiques (Pitel *et al.* (146)). De plus, le parasite se transmettrait moins facilement d'une mère séropositive au fœtus. Le risque de transmission serait non décelable (Duarte *et al.* (42)) ou faible: au cours de l'année 2006, des anticorps pré-colostraux ont été détectés sur seulement 2 poulains sur 5 nés de mères séropositives et la prévalence de poulain positifs nés de mères séropositive ne serait pas plus élevée que la prévalence de poulains positifs dans la population générale. (Locatelli-Ditrich *et al.* (110)).

Pourtant, différentes études épidémiologiques mettent en avant l'implication probable de *Neospora caninum* lors d'avortements dans l'espèce équine. En effet, les juments séropositives seraient 1,7 fois (Duarte *et al.* (42)) et 1,67 fois (McDole et Gay (126)) plus sujettes à avoir avorté auparavant. De plus, la séropositivité vis-à-vis de *Neospora caninum* a été évaluée comme significativement plus élevée pour des groupes de juments ayant avorté par rapport aux groupes témoins : séroprévalence de 13% chez les juments ayant avorté contre 8% chez les juments sans troubles de la reproduction pour McDole et Gay au Etats-Unis (126); séroprévalence de 15,1% chez les juments présentant des troubles de la reproduction contre 5,8% chez le groupe témoin pour Villalibos *et al.* au Brésil (178) séroprévalence de 37,7% chez les juments ayant avorté contre 11,9% dans la population générale pour Kligler *et al.* en Israël (97) ; titre en anticorps supérieur à 1/80 pour 29,6% des juments ayant avorté contre 17% et 13% dans les populations témoins et titre les plus élevés plus souvent retrouvés dans le groupe des juments à troubles de la reproduction pour Pitel *et al.* en France (145)

Pour l'ensemble des études menées, *Neospora – caninum ou hughesi* – apparaît comme un agent pathogène émergent lors de troubles de la reproduction dans l'espèce équine. Les recherches visant à préciser le rôle de *Neospora caninum* et son impact sur la reproduction chez les équidés sont donc d'un intérêt majeur.

3.5. Transmission verticale expérimentale de *Neospora caninum* : des troubles de la reproduction induits chez l'animal de laboratoire

3.5.1. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez les rongeurs de laboratoire et baisse de la fécondité

3.5.1.1. La souris, modèle de transmission verticale de *Neospora caninum*

Différents modèles murins de transmission verticale de *Neospora caninum* ont été rapidement développés afin d'étudier plus facilement le parasite. Les souris de lignées non consanguines sont relativement résistantes au parasite et ne déclenchent pas de symptômes cliniques ((30) ; (153)), contrairement aux lignées consanguines pour lesquelles des néosporoses aiguës sont observées. Par contre, la transmission verticale du parasite survient dans les deux types de lignées, de manière très efficace.

Lors d'infection expérimentale pendant la gestation, on rapporte un taux de transmission de 100% chez la souris C57BL/6 après inoculation intra péritonéale de 1,5. 10⁷ tachyzoïtes (151), 85% chez la souris « Swiss Webster » (36), 76% chez la souris BALB/c (187), 75%, 76%, 67% et 76% pour quatre groupes de souris Quackenbush (Qs) ayant reçu 1.10⁶ tachyzoïtes par voie sous cutanée à 5 jours de gestation (130).

Lors d'infection avant la mise à la reproduction, le parasite serait transmis efficacement à la descendance lors de la gestation suivante pour 50% de la descendance chez la souris BALB/c (137), 90,5% de la descendance chez la souris C57BL/6 après inoculation intra péritonéale de 1,5. 10⁷ tachyzoïtes (183), 25% de la descendance lors d'expérimentation sur la souris « Swiss Webster » (36). Une recrudescence de l'infection lors de la gestation est donc également possible chez la souris. Cette affirmation est appuyée par le fait qu'après inoculation lors d'une première gestation, une transmission verticale est survenue chez la

souris BALB/c pour 86% de la descendance lors de la mise à la reproduction suivante. Ces souris étaient restées asymptomatiques entre les deux gestations. (Omata *et al.* (137))

Comme chez les autres hôtes intermédiaire, la transmission verticale du parasite peut soit être à l'origine d'avortements, comme le témoigne la diminution de la taille de la portée des souris infectées, témoin de la résorption placentaire ((36) ; (114) ; (137) ; (151)) soit la naissance de souriceaux cliniquement sains, soit la naissance de souriceaux atteints cliniquement de néosporose (retards de croissance, défaut de développement du système pileux, symptômes nerveux) (151).

3.5.1.2. Pathogénie des avortements à *Neospora caninum* chez la souris

3.5.1.2.1. Evolution de la relation hôte parasite au cours de la gestation, influence du stade de gestation sur la survenue d'avortements

Comme chez les bovins et les autres hôtes intermédiaires, la transmission verticale du parasite est grandement influencée par le stade de gestation. Pour les différentes études menées, la transmission la plus efficace est observée lors des deux premiers tiers de gestation, avec les conséquences les plus importantes sur la descendance : transmission accrue et diminution nette de la taille de la portée lors d'une infection à 7 jours de gestation par rapport à une infection à 14 jours de gestation (Lopez-Perez *et al.* (114)) ; pour la première moitié de gestation par rapport à la seconde moitié de gestation (Cole *et al.* (36)) ; lors d'une infection entre 8 et 12 jours de gestation alors qu'une infection entre 12 et 15 jours de gestation n'est transmise que partiellement à la descendance (Lidell *et al.* (102)) ; mort de la totalité de la portée avant l'âge de 2 mois lors d'infection à 7 jours de gestation contre 69% de mortalité lors d'infection le premier jour de gestation et 46% lors d'infection à 14 jours de gestation (Lopez Perez *et al.* (113)).

Parallèlement, les recherches concernant les modifications d'ordre immunologique rencontrées lors d'infection à *Neospora caninum* chez la souris montrent que si la réponse de type Th1 (pro-inflammatoire) est présente lors d'infection chez la souris non gestante, une orientation vers une réponse de type Th2 (anti-inflammatoire) est observée lors de la gestation. La réponse immunitaire à médiation cellulaire, présente lors d'une infection en milieu de gestation, est orientée vers la production accrue d'interleukine 4 (IL-4), par comparaison avec la souris non gestante. Une baisse concomitante des cytokines de type Th1 (IFN- γ , IL-12, TNF- α) est alors observée, et serait à l'origine du déséquilibre hôte/parasite permettant la multiplication parasitaire, de la même manière que ce qui est observé chez les bovins. (Quinn *et al.* (149))

3.5.1.2.2. Lésions causées par *Neospora caninum* après transmission verticale chez la souris

Les avortons sont rarement soumis à l'étude histologique car les résorptions sont fréquentes. Les lésions prédominantes sont localisées au cerveau, au foie et aux poumons : encéphalite nécrotique, hépatite, pneumonie interstitielle, myocardite (151)

3.5.2. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez le porc et avortement

L'infection expérimentale de la truie par *Neospora caninum* au cours de la gestation a été réalisée en 1998 par Jensen *et al.* (93). Six truies reçurent $2,5 \cdot 10^6$ tachyzoïtes par voie intramusculaire, à trois périodes de gestation différentes. Une transmission transplacentaire fut mise en évidence pour une des truies inoculées le plus précocement (vers 48 jours de gestation). Une endométrite nécrotique multifocale fut observée à l'autopsie, de manière concomitante avec l'évolution d'une nécrose des trophoblastes pour deux fœtus. Des lésions compatibles avec la multiplication de *Neospora caninum* ont été retrouvées pour ces deux fœtus (encéphalite nécrotique multifocale) et de manière moins marquée pour un troisième fœtus (hépatite nécrotique). La présence du parasite a été confirmée par immuno-histochimie sur les fluides fœtaux et les tissus des trois fœtus.

De manière naturelle, les troubles de la reproduction liés à *Neospora caninum* sont suspectés chez la truie. Une investigation sérologique portant sur 454 truies présentant des troubles de la reproduction a révélé un taux de séropositivité pour *Neospora caninum* par ELISA de 8,8%, cette séropositivité n'a pas été confirmée par IFAT. (Helmick *et al.* (84))

3.5.3. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez le chat et avortement

Une seule étude publiée, datant de 1989, a évaluée la possibilité d'une transmission par voie transplacentaire du parasite *Neospora caninum* chez le chat. Une chatte gestante fut inoculée au 47^{ème} jour de gestation par voie sous-cutanée à l'aide de 2.10^6 tachyzoïtes de *Neospora caninum*. Elle mit bas un unique chaton qui mourut de néosporose généralisée à l'âge de 2 jours. Après autopsie, un fœtus autolysé fut retrouvé dans l'utérus de la mère, parallèlement à une endométrite et une placentite sévère. Une deuxième chatte fut nourrie à l'aide de tissus contaminés par des kystes de *Neospora caninum* est mise à la reproduction 111 jours plus tard. Elle mit bas 3 chatons cliniquement sains, mais le parasite fut mis en évidence directement par histologie sur un des chatons et de manière indirecte par sérologie sur les trois chatons (Dubey et Lindsay (52)). Cette étude indique que la parasite *Neospora caninum* peut être transmis par voie transplacentaire chez le chat, dont la placentation est similaire à celle du chien et provoquer des avortements dans cette espèce.

3.5.4. Transmission verticale expérimentale de *Neospora caninum* chez les primates et avortement

Une transmission verticale expérimentale de *Neospora caninum* a été obtenue chez un primate. En 1994, Conrad *et al.* inoculent par voie sous-cutanée et intraveineuse un total de $1,6.10^7$ tachyzoïtes à deux femelles macaques rhésus au 43^{ème} jour de gestation. Au cours de l'autopsie pratiquée 67 à 70 jours après l'inoculation, l'infection à *Neospora caninum* a été identifiée pour les deux fœtus. Une méningo-encéphalite multifocale nécrotique, accompagnée d'une inflammation nécrotique modérée de l'amnios était présente pour chacun des fœtus. La présence du parasite a été confirmée par isolement in vitro et immunohistochimie (Barr *et al.* (12)).

Cette expérience soulève la question du potentiel pouvoir zoonotique de *Neospora caninum*. En effet, le système de placentation humain est très semblable à celui des macaques rhésus, les mécanismes observés chez le primate pourraient donc s'appliquer dans l'espèce humaine, mais aucun cas de néosporose humaine n'a été pour l'instant décrit. Des études complémentaires sont à mener pour clarifier l'éventuel rôle de *Neospora caninum* chez l'homme.

Le parasite *Neospora caninum* est capable de se transmettre de la mère au fœtus pour un très grand nombre d'hôtes intermédiaires, peut-être même pour tous et cela quelque soit le type de placentation. Son implication lors de troubles de la reproduction est avérée chez les ruminants domestiques et sauvages, mais aussi les équidés et les camélidés. De manière expérimentale des troubles de la reproduction ont été induits chez les rongeurs le porc, le macaque rhésus, mais aussi le chat, carnivore domestique dont la physiologie est très proche de celle du chien. Il est donc naturel de s'interroger sur l'implication de *Neospora caninum* lors de troubles de la reproduction chez le chien, hôte définitif.

4. Transmission verticale de *Neospora* sp., conséquences pour l'espèce canine : un agent à suspecter lors de troubles de la reproduction ?

Il est clair que *Neospora caninum*, par sa multiplication sous la forme tachyzoïte, est un parasite fortement impliqué lors de troubles de la reproduction dans l'espèce bovine et pour de nombreux autres hôtes intermédiaires. Pour envisager un tel rôle dans l'espèce canine, il implique donc de savoir si, comme le bovin, le chien peut multiplier le parasite sous forme tachyzoïte et le transmettre via le placenta de manière efficace, et donc jouer exactement le rôle d'hôte intermédiaire dans le cycle parasitaire.

4.1. Le chien, un hôte intermédiaire multipliant le parasite sous forme tachyzoïte

Neospora caninum fut décrit pour la première fois sur une portée de chien, en Norvège, en 1984 (Bjerkas *et al.* (23)). Un protozoaire sous forme kystique, associé à des lésions du système nerveux central avait été décrit sur 6 chiots issus de la même mère de race Boxer. Excepté l'un d'entre eux, tous avaient développé des troubles neurologiques conduisant à une parésie, entre 2 et 6 mois, alors qu'ils paraissaient cliniquement sains à la naissance. A l'autopsie, des lésions inflammatoires diffuses étaient présentes dans toutes les zones du système nerveux central ainsi que sur des coupes de muscles squelettiques. Un parasite s'apparentant à *Toxoplasma gondii* était présent en grand nombre dans le système nerveux central, le plus souvent en association avec les lésions inflammatoires. On le retrouvait plus rarement dans les muscles squelettiques. Pourtant, aucun des chiots n'était séronpositif vis-à-vis de *Toxoplasma gondii*.

En 1991, des coupes histologiques provenant de 23 chiens provenant du centre hospitalier vétérinaire de Boston (Angell Memorial Animal Hospital) furent passées en revue par Dubey

et al. (47). Tous étaient décédés suite à une maladie s'apparentant à une toxoplasmose. *Toxoplasma gondii* fut identifié pour 13 d'entre eux, mais un nouveau parasite, structuralement distinct de *Toxoplasma*, fut identifié pour 10 de ces chiens. Le nouveau parasite était présent directement dans le cytoplasme des cellules de l'hôte, sans vacuole parasitophore, il se divisait par endodyogénie, contenait plus de 11 rhoptries et ne réagissait pas avec les anticorps anti-*Toxoplasma*. Ce nouveau parasite fut alors nommé *Neospora caninum*.

Chez le chien, la multiplication du parasite se manifeste le plus communément par une ataxie postérieure chez le jeune, pouvant progresser et toucher les membres antérieurs ou les muscles faciaux ((6) ; (49) ; (147)). L'animal cliniquement sain à la naissance développe des troubles neurologiques, généralement entre 1 et 10 mois, même si des cas de néosporose sur des très jeunes chiots de 15 jours environ ont également été décrits (55). Sous des formes moins fréquentes, la néosporose peut se manifester par un collapsus brutal lié à une myocardite et, particulièrement chez l'adulte, par une maladie neurologique généralisée, des pneumonies ou des dermatites ((5) ; (28) ; (49) ; (59) ; (80)).

Tous ces symptômes sont liés à la multiplication parasitaire et aux lésions qu'elle engendre. En 1996, Barber *et al.* (5) ont évalué la présence du parasite sur 6 chiens cliniquement atteints de néosporose. Le parasite est le plus couramment retrouvé dans le cerveau et le système nerveux. Il a également été mis en évidence dans les muscles temporaux et le quadriceps de tous les chiens examinés, ainsi que dans le triceps, le biceps et les muscles du cou pour un cas. Le cœur, le foie, le poumon, les reins, l'œsophage sont également le siège de la multiplication parasitaire. Des tachyzoïtes ont été retrouvées de manière sporadique dans le pancréas, les surrénales et les thyroïdes d'un animal examiné. Il est important de noter, pour l'aspect de la néosporose qui nous intéresse, que le parasite a été retrouvé sous sa forme tachyzoïte dans les ovaires et l'utérus de la femelle atteinte.

Neospora caninum est donc capable de se multiplier sous sa forme tachyzoïte chez le chien, comme chez n'importe quel hôte intermédiaire.

4.2. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez le chien : un potentiel de transmission variable

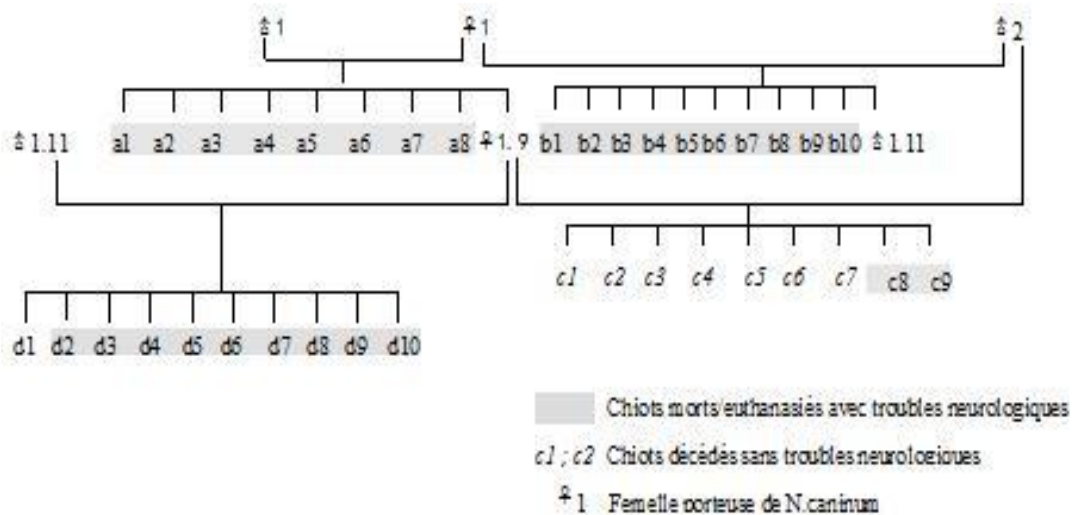
4.2.1. Transmission verticale de *Neospora caninum* chez le chien : naissance de chiots cliniquement atteints

La première observation d'une transmission verticale d'un protozoaire s'apparentant à *Neospora caninum* chez le chien fut apportée par Cummings *et al.* en 1987 (39). Un protozoaire avait alors été observé sur 5 chiots Labrador atteint de polyradiculonévrite sévère. En 1988, la même chienne est remise à la reproduction avec le même mâle et donne naissance à 7 chiots, qui eurent une croissance normale jusqu'à l'âge de 5 à 6 semaines, âge pour lequel ils développèrent tous des signes neurologiques de néosporose (Dubey *et al.* (50)). Trois de ces chiots furent euthanasiés et soumis à examen ; le parasite *Neospora caninum* fut observé sur coupe histologique et isolé sur culture cellulaire. Depuis, les observations de chiots infectés congénitalement sont nombreuses, par exemple : Dubey *et al.* en 1990 (51) ; Barber et Trees en 1996 (6) ; Dubey *et al.* en 1998 (49) ; Lindsay et Dubey en 2000 (103). En Europe, 27 cas ont été décrit entre 1990 et 1995 (6) et un cas de néosporose sur un chien Braque Allemand a été publié en France par Pluye en 1999 (147), mais les cas non publiés sont courants.

La transmission verticale de *Neospora caninum* est observée chez la chienne comme chez les autres hôtes intermédiaires de manière répétée à la descendance. Ainsi, la chienne Labrador étudiée par Dubey *et al.* en 1988 a transmis le parasite à ses chiots sur deux portées successives ((39) ; (50)). De la même manière, une équipe menée par Dubey a étudié la transmission du parasite dans un élevage de chien de race Pointer de manière rétrospective, sur 4 portées apparentées (51). Les différentes portées obtenues sont schématisées en figure 10. Sur les 39 chiens de l'élevage, 29 ont présenté une paralysie postérieure. Six chiots de deux portées distinctes furent autopsiés et présentaient une encéphalomyélite ; des tachyzoïtes et des kystes tissulaires de *Neospora caninum* furent retrouvés dans le cerveau et la moelle épinière de chacun des chiens. Par immuno-histochimie, l'organisme réagissait fortement vis-

à-vis des anticorps anti-*Neospora* mais pas vis-à-vis des anticorps anti-*Toxoplasma gondii*, à l'exception d'un cas.

Figure 10 : Transmission transplacentaire répétée de *Neospora caninum* à la descendance dans un élevage de Pointer d'après Dubey *et al.* (51)



Dans cet élevage, le parasite s'est transmis sur plusieurs portées successives, de manière très efficace. Le fait que plusieurs portées soient atteintes, de manière successive, suggère une réactivation d'une infection subclinique chez la mère, et le passage de l'infection lors de la gestation.

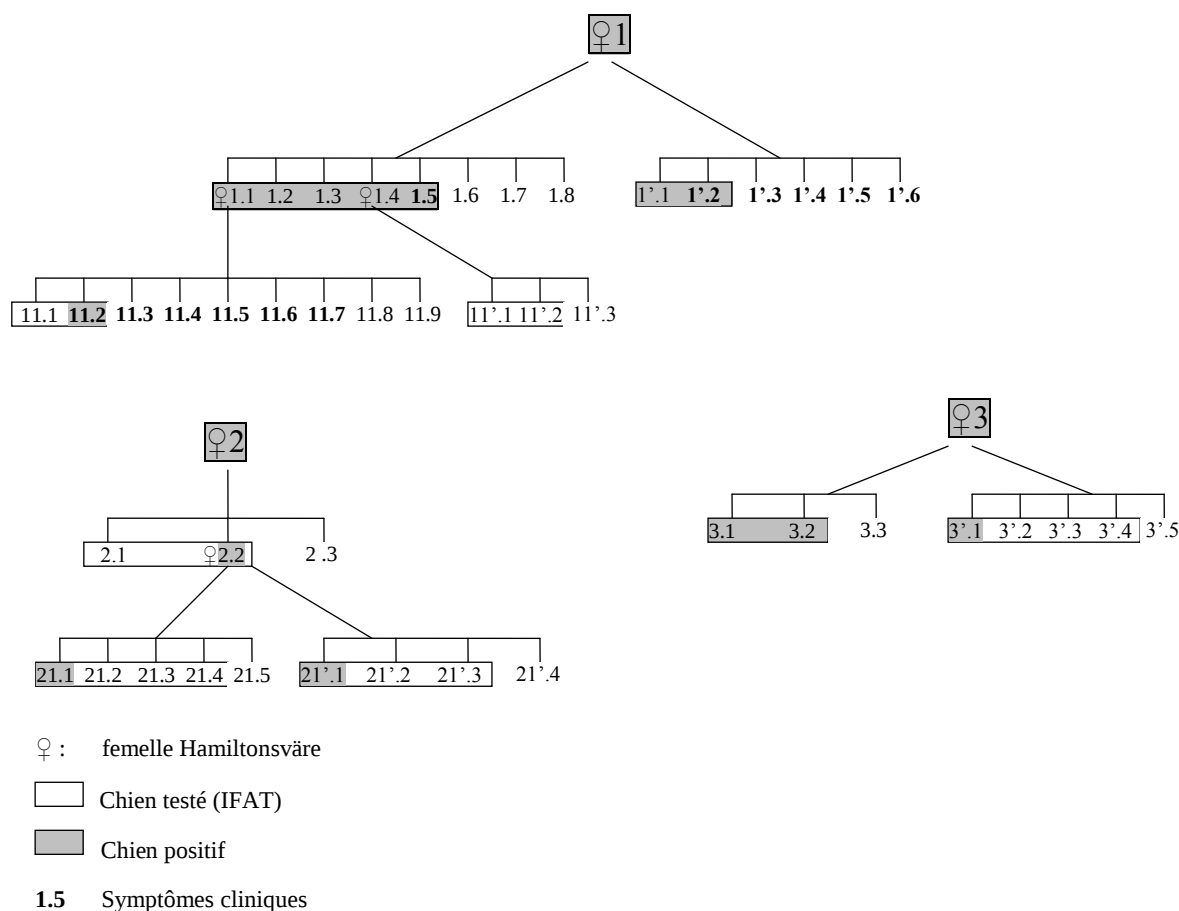
4.2.2. Une transmission non systématique, pouvant se répéter sur plusieurs générations

Une étude a été menée à relativement grande échelle par Barber et Trees afin d'évaluer le potentiel de transmission de *Neospora caninum* à la descendance (7). Pour cela, une étude rétrospective fut menée sur les portées de 6 chiennes de race Hamiltonstövare et sur les portées de 7 autres chiennes de races diverses, après diagnostic de néosporose sur des chiots dans les deux cas. Parallèlement, une étude prospective fut réalisée sur 17 chiennes séropositives qui furent mise à la reproduction.

Afin de déterminer le caractère séropositif des chiots et donc d'établir le diagnostic de transmission transplacentaire, la recherche d'anticorps sur prise de sang pré-colostrale est la méthode de choix. Un titre en IFAT supérieur à 1/50 a été considéré comme témoin d'une infection à *Neospora caninum*. En effet, les titres en anticorps par IFAT avant infection sont toujours en dessous de cette valeur et ils deviennent supérieurs à cette valeur après infection expérimentale (Cole *et al.* (35)). La prise de sang pré-colostrale s'est révélée peu réalisable en pratique pour l'étude de terrain de Barber et Trees, car les chiennes qui appartenaient à des propriétaires privés, n'étaient pour la plupart pas gardées dans les conditions de laboratoire nécessaires. Une prise de sang à partir de l'âge de 5 semaines a été souvent préférée dans cette étude, pour exclure l'interférence avec les anticorps d'origine maternelle. Il semblerait que le taux d'anticorps colostraux anti-*Neospora* diminue rapidement après la naissance ; Dubey et Lindsay ont en effet remarqué qu'un chiot né de mère fortement positive était devenu séronégatif lors de la prise de sang réalisée à 17 jours, ce qui indiquerait que les anticorps colostraux diminueraient aux alentours de 17 jours (53). Cependant cette observation n'est issue que d'une unique étude et n'a été retrouvée que pour l'un des chiots étudiés. Dans d'autres maladies, Parvovirose notamment, il est connu que le taux d'anticorps maternel peut persister jusqu'à 8 à 10 semaines après la naissance. Le choix d'effectuer la prise de sang dès 5 semaines d'âge lors de l'étude de Barber et Tress, visant à ne pas interférer avec les anticorps maternels, peut donc être critiqué.

Un total de 26 chiots provenant de 9 portées issues des 6 chiennes Hamiltonstövare séropositives furent testés sur une période de 9 années. La taille de la portée moyenne était de 5,1 +/- 2,2 chiots. Au total, 54% (14/26) des chiots testés étaient séropositifs et 26% (12/46) ont développé une néosporose clinique. Trois chiennes séropositives ont produit deux portées successives, chacune comportant des chiots atteints. Une infection congénitale s'est répétée sur la génération suivante à trois reprises. (Voir Figure 11)

Figure 11 : Variabilité de transmission de *Neospora caninum* à la descendance chez 6 femelles Hamiltonsväre, d'après étude rétrospective.
Barber et Trees (7)



La race Hamiltonsväre, d'origine suédoise, est peu représentée en Grande Bretagne, zone de l'étude, et de ce fait une certaine consanguinité a permis de maintenir l'infection dans l'effectif de la race. Pour évaluer la prévalence de l'infection au niveau de la race, 69 chiens furent testés par IFAT, soit 58% de la population d'Hamiltonsväre de Grande Bretagne, parmi lesquels 26% (18/69) furent séropositifs. Trois de ces chiens développèrent des signes cliniques de néosporose et furent traités, dont une chienne qui fut par la suite mise à la reproduction. Quatre chiots de sa portée moururent avant l'âge de 12 semaines en ayant présentés des troubles neurologiques compatibles avec une néosporose et un autre chiot, qui mourut quelques temps après, fut diagnostiqué rétrospectivement comme étant atteint de néosporose (7).

Dans l'étude rétrospective portant sur les 7 chiennes séropositives de races diverses, la taille moyenne de la portée était de 6 +/- 2,8 chiots, 51% de ces chiots (18/35 testés) étaient séropositifs et 24% (10/42 nés) présentaient des signes cliniques (7).

Concernant l'étude prospective, 373 femelles reproductrices ont été testées, et 50 avaient un titre en anticorps supérieur à 1/50 par IFAT. Dix-sept de ces femelles furent mises à la reproduction. Un total de 20 portées a été étudié, avec une taille moyenne de 6,5 +/- 2,8 chiots, pour lesquelles l'ensemble des sérums des chiots n'a malheureusement pas pu être collecté. Quatre chiots sur 188 testés (3%) étaient séropositifs et 3% des chiots nés ont présenté des symptômes cliniques (Voir tableau 18).

Tableau 18: Variabilité de transmission de *Neospora caninum* à la descendance d'après étude prospective sur 17 chiennes reproductrices
D'après Barber et Trees (7)

Chienne	Titre IFAT	Taille portée	Nombre Morts-Nés	Nombre testés	Age lors du test	Nombre séropositifs	Nombre malades
1 (i)	800	10	1	8	16 sem	0	2 ^a
1 (ii)	800	7		6	14 sem	0	1 ^b
2	800	7		6	5 sem	3	
3	200	8		8	7 sem ^c	0	
4	200	7	4	7	PC	0	
5	200	5		5	7 sem	0	
6	200	2		2	7 sem	0	
7	50	12		12	PC	0	
8	50	8		6 ^d	PC	0	
9	50	9		5	PC	0	
10	50	3		3	5 sem	0	
11	50	7		7	6 sem	0	
12	50	7		6	PC	0	
13	50	10		10	PC	0	
14	50	7		7	PC	0	
15	50	2		2	12 sem	0	
16 (i)	50	6		6 ^e	PC	0	1 ^f
16 (ii)	50	6		6	6 sem	0	
17 (i)	50	4		4	5 sem	1	
17 (ii)	50	2		2	6 sem	0	
Total		129	6	118		4 (3%)^g	4 (3%)^h

PC prise de sang pré-colostrale

^a Sérum non disponible pour les 2 chiots

^b Un cas confirmé par immuno-histochimie

^c Cinq chiots également testés négatifs à la naissance

^d Dont sang cardiaque de deux morts-nés

^e Deux chiots re-testés à 10 semaines, négatifs

^f Cas confirmé par sérologie et réponse au traitement

^g Pourcentage de chiens positifs parmi les chiens testés

^h Pourcentage de chiens malades parmi les chiens nés

En définitive, même si l'infection a pu se transmettre de génération en génération, 80% des chiots nés de mères séropositives ne présentaient pas un titre en anticorps détectable, ce qui montre que la transmission de *Neospora caninum* à la descendance est variable et ne permettrait pas à elle seule le maintien de l'infection dans l'espèce canine. Comme chez les bovins, la transmission post-natale semble être une obligation pour maintenir le niveau de séroprévalence observé. Cependant, les résultats de cette étude sont à prendre avec précaution, car ils ne prennent en compte que le nombre de chiots nés, et non les éventuelles pertes embryonnaires.

4.2.3. Un potentiel de transmission corrélé au titre en anticorps

Un titre en anticorps anti-*Neospora caninum* supérieur à 1/50 par IFAT est généralement considéré comme seuil de positivité ((7) ; (35) ; (143)). Selon Barber et Trees, (7) les anticorps anti-*Neospora caninum* ont persisté à des seuils élevés plus de 4 années pour 9 chiens sur 13 inclus dans l'étude. Par contre, pour les quatre chiennes faiblement positives lors de la sérologie initiale, le taux d'anticorps est descendu en dessous de la limite de positivité après 1 ou 2 ans.

Si on regarde la proportion de chiots infectés congénitalement par *Neospora caninum* en fonction du titre en anticorps de la mère, on note qu'il existe une forte corrélation entre ces deux paramètres. Selon Barber et Trees, le pourcentage d'animaux infectés nés de mère faiblement positive est de 5% (% estimé : 4-14%), alors qu'il est de 89%(% estimé 35-96%) pour les mères fortement positives (voir tableau 18 et 19). Le coefficient de corrélation entre proportion de chiots séropositifs et titre en anticorps (IFAT) de la mère serait alors de 0,980.

Tableau 19 : Proportion de chiots séropositifs en fonction du titre en anticorps anti-*Neospora caninum* par IFAT de la mère
D'après Barber et Trees, 1998, (7)

Titre en anticorps IFAT de la mère	Nombre de chiots nés	Nombre de chiots testés	Nombre de chiots séropositifs	Pourcentage séropositifs/testés	Intervalle possible*
50	91	82	4	5	4-14
200	46	41	9	22	20-30
800	57	47	15	32	26-44
12800	23	9	8	89	35-96
Total	217	179	36	20	17-34

*minimum calculé à partir de nombre de séropositif/nombre nés ; maximum calculé en supposant que tous les chiens non testés sont séropositifs.

Le parasite est d'autant plus transmis à la descendance que le titre en anticorps de la mère est fort, d'où l'intérêt de la détection des femelles à risques dans un élevage.

4.3. Des troubles de la reproduction avérés lors des expérimentations

4.3.1. Transmission verticale de *Neospora caninum* en milieu de gestation et naissance de chiots non viables

En dehors des transmissions naturellement observées dans l'espèce canine, des études expérimentales ont été menées pour mieux comprendre l'influence de *Neospora caninum* sur la reproduction dans cette espèce. Cependant, ces études sont coûteuses et difficiles, le nombre de données publiées est ainsi très restreint.

La première transmission verticale expérimentale de *Neospora caninum* chez la chienne gestante fut réalisée par Dubey et Lindsay, en 1989 (53). Ils inoculèrent un total de $1,5 \cdot 10^6$ tachyzoïtes par voie sous cutanée et intramusculaire à une chienne beagle au 35^{ème} jour de gestation. Celle-ci mis bas 8 chiots 28 jours après inoculation, dont un mort-né, le plus chétif de la portée, probablement décédé *in utero*. Le 2^{ème} chiot mourut 2 jours après la mise-bas. Le 3^{ème} et le 4^{ème} chiot furent euthanasiés à 2 et 3 jours, respectivement, pour cause d'hypothermie et de non alimentation. Le 5^{ème} chiot fut euthanasié pour cause de mauvais état général à 20 jours. A 49 jours, les chiots 6, 7 et 8 étaient cliniquement normaux.

Seul le chiot 5 présentait des lésions macroscopiques : lésions hépatiques, cardiaques, pulmonaires, épanchement péritonéal, compatibles avec la multiplication de *Neospora caninum*. Microscopiquement, tous les chiots présentaient une pneumonie interstitielle et une myocardite focale nécrotique était présente pour les chiots 1 et 5. Des lésions d'encéphalite avec gliose et infiltration périvasculaire ainsi qu'une hépatite furent également observées sur le chiot 5.

Les tachyzoïtes de *Neospora caninum* furent retrouvés pour le chiot 5 et *Neospora caninum* fut mis en évidence sur culture cellulaire à partir de tissus des 5 chiots examinés, ainsi qu'à partir des placentas, ce qui prouve la présence du parasite à la fois dans les tissus fœtaux et maternels.

4.3.2. Transmission verticale de *Neospora caninum* en début de gestation et avortements

La première expérimentation menée par Dubey et Lindsay (53) a mis en évidence la possibilité de passage transplacentaire en milieu de gestation, et les conséquences qui en résultent. Celle-ci avait été réalisée très tôt, un an seulement après que le parasite *Neospora caninum* ait été décrit. Or on sait maintenant que, pour les autres espèces et les bovins notamment, les troubles de la reproduction les plus sévères – dont les avortements – surviennent lorsque le parasite est transmis tôt dans la gestation.

Une seconde expérimentation fut réalisée par Cole *et al.* (35) pour évaluer l'impact de l'infection par *Neospora caninum* de manière plus précoce lors de la gestation. Six femelles furent inoculées par voie sous cutanées à l'aide de 5.10^6 tachyzoïtes, au 21^{ème} jour de gestation et leur gestation fut suivie par échographie. Dès que la mort des fœtus était constatée au contrôle échographique, la chienne était euthanasiée puis soumise à autopsie. Sur ces 6 chiennes, seules deux portaient finalement des chiots viables : une seule termina sa gestation et donna naissance à 3 chiots à terme, mais présentant tous des signes neurologiques plus ou moins sévères ; l'autre fut euthanasiée à 39 jours de gestation. Douze fœtus étaient présents, dont 3 fœtus résorbés qui n'ont pu être analysés. Sur les 9 fœtus soumis à examens, 2 fœtus étaient viables, 4 décédés et la viabilité des 3 derniers n'a pu être établie (voir tableau 20).

A l'examen histologique, le parasite a été mis en évidence pour 8 chiots sur 9 et 4 placentas sur 12, ce qui est notable du fait de la difficulté d'observation du parasite par histologie.

Pour les 4 autres chiennes, seuls des fœtus macérés ou momifiés ont été retrouvés à l'autopsie (voir Tableau 20). La chienne 1 fut autopsiée 10 jours après la date prévue du terme, 1 avorton macéré et 3 fœtus résorbés étaient présents dans l'utérus. La chienne 2 fut tuée à 43 jours de gestation et portait 6 fœtus macérés ; *Neospora caninum* fut mis en évidence pas histologie sur un des cerveaux. La chienne 4 fut retrouvée morte à 38 jours de gestation, des lésions de néosporose aigue furent constatées à l'autopsie, ainsi que 3 fœtus résorbés *in utero*. La chienne 5 fut autopsiée à 54 jours de gestation, 4 fœtus résorbés furent également retrouvés. Le nombre de fœtus des chiennes 4 et 5 n'a pas pu être déterminé avec certitude, du fait de l'avancement de la résorption.

Tableau 20: Avortements et mort fœtales après infection expérimentale de 6 chiennes par *Neospora caninum* à 21 jours de gestation
D'après Cole *et al.* (35)

Femelle (j)	Titre IFAT	Nombre chiots	statut
1 (73)	400	4	1 macéré 3 résorbions
2 (43)	400	6	6 macérés
3	200	3	3 nés vivants
4 (38)	ND	3	3 résorbés
5 (54)	100	4	4 résorbés
6 (39)	400	12	7 morts (3 résorbions), 2 vivants, 3 ND parasites identifiés pour 8/9 chiots et 4/12 placentas

(j) nombre de jours de gestation lors de l'observation (euthanasie)
femelle 3 euthanasiée 99j post mise bas
ND non déterminé

Les résultats de ces études démontrent clairement que l'infection par *Neospora caninum* en début de gestation peut conduire à des morts fœtales ainsi que des résorptions. Si les conséquences post-natales de la néosporose sur les jeunes chiots sont à ce jour bien documentées ((6) ; (47) ; (49) ; (51) ; (103) ; (147)) l'étude de Cole *et al.* (35) est actuellement la seule publiée concernant les décès *in utero* liés à la multiplication du parasite, alors que ceux-ci sont bien étudiés chez de nombreux hôtes intermédiaires.

4.3.3. Dommages placentaires et fœtaux causés par *Neospora caninum* lors des avortements

Peu de données existent concernant la pathogénie des avortements à *Neospora caninum* chez le chien. Il semble tout de même que, comme chez les hôtes intermédiaire, le stade de la gestation au moment de l'infection soit un facteur primordial. Ainsi, lors de l'étude de Dubey et Lindsay, à 35 jours de gestation (53), la transmission du parasite a conduit à la naissance de chiots atteints, alors que l'infection à 21 jours de gestation pratiquée par Cole *et al.* a été suivie d'avortements (35). Cependant, les mécanismes immunitaires à l'origine de ces avortements n'ont pas été étudiés chez le chien ; seuls les dommages placentaires et fœtaux sont rapportés pour expliquer la mort fœtale.

Chez le fœtus, les résorptions et macérations sont fréquentes et rendent l'examen difficile. *Neospora caninum* a néanmoins été mis en évidence sur des coupes histologiques fœtales de cœur, de foie, de poumon, de méninges, de cerveau (substance grise et blanche), de nœud lymphatique, de moelle épinière, de muscle, d'intima des vaisseaux sanguins, de sinus, de choroïde et de sclère oculaire, d'intestin, de pancréas, de cartilage, de rein et de peau ((35) ; (51)). Sur ces fœtus, les réactions inflammatoires étaient souvent absentes, probablement du fait de l'immaturation du système immunitaire fœtal.

Au niveau placentaire, le parasite ainsi que des lésions de nécrose focales, touchant les trophoblastes fœtaux et la lamina propria maternelle ont été retrouvées à l'examen histologique (35).

Concernant les chiots atteints cliniquement de néosporose à la naissance ou les mort-nés, les lésions microscopiques typiques de néosporose sont couramment observées : méningoencéphalite, polyradiculonévrite, myosite. Le plus souvent, ces lésions sont multifocales, nécrotiques, accompagnées d'une infiltration cellulaire périvasculaire. ((35) ; (53) ; (103))

4.4. *Neospora caninum* et troubles de la reproduction chez le chien, une voie de recherche à développer

4.4.1. Les arrêts de gestation en élevage canin, un défi diagnostic

4.4.1.1. Des arrêts de gestation fréquents mais souvent non diagnostiqués

Les arrêts de gestation (ou « avortements » au sens large) peuvent survenir à tout moment de la gestation chez le chien et se manifester par une mort embryonnaire avec résorption, l'avortement d'un fœtus mort ou vivant, l'expulsion de chiots mort-nés, la mort du fœtus avec momification et rétention dans la cavité utérine. Le fait que le fœtus soit résorbé, avorté, mort-né ou momifié dépend de la cause de l'arrêt de gestation, du stade de gestation pour lequel la mort du fœtus est survenue et de la réponse immunitaire maternelle et fœtale (94). L'incidence exacte des pertes fœtales et embryonnaires chez le chien est difficile à évaluer. En effet, si la mort fœtale survient dans la première moitié de gestation, les résorptions ou morts fœtales passent souvent inaperçues. Les propriétaires peuvent ne pas savoir que la chienne était préalablement gestante, car les signes d'arrêt de gestation sont minimes. De plus, comme il n'existe pas de test permettant de diagnostiquer précocement les gestations (c'est-à-dire pas avant 2 semaines de gestation voire 3 semaines de manière courante), les vétérinaires eux-mêmes ne peuvent pas affirmer facilement le diagnostic d'avortement précoce. Dans une revue de 2001 sur le sujet, Jonhston *et al.* (94) rapportent qu'à l'examen des utérus de 22 chiennes Beagles, entre 22 et 54 jours après l'accouplement, 11% des fœtus et embryons (13/117) étaient à différents stade de résorptions. Dans une autre étude, après hystérotomie de 12 chiennes beagle à 48 jours de gestation, 13 résorptions sur 98 implantations fœtales ont été observées (13%) (94)

Lorsque la mort fœtale survient dans la seconde moitié de gestation, elle conduit soit à un avortement au sens strict soit à la naissance de chiots mort-nés. L'avortement au sens strict est défini par l'expulsion d'un conceptus mort ou incapable de survivre de manière

indépendante. Même si l'avortement est associé à des pertes utérines, son diagnostic peut être difficile, surtout si la chienne a consommé ou caché les avortons. Si l'avorton n'est pas expulsé, une macération fœtale avec emphysème peut avoir lieu.

L'incidence des chiots mort-nés serait de 2,2 à 4,6 % (94), sans lien avec le sexe du fœtus, mais augmenterait avec les mise-bas dystociques. La chienne peut également mettre bas des chiots faibles ou malades qui mourront rapidement durant la période néonatale, comme c'est le cas lors de chiots atteint congénitalement par *Neospora caninum*.

Lorsque la mort fœtale survient tardivement au cours de la gestation et qu'elle n'est pas associée à un avortement ou une macération, elle peut être suivie d'une momification fœtale. Celle-ci ne peut avoir lieu dans la première moitié de gestation, car le décès du conceptus avant ossification est souvent suivi de résorption. La momification a lieu lorsque le fœtus, maintenu dans l'utérus, s'autolyse, que les fluides fœtaux-placentaires sont absorbés et le que placenta maternel s'involve. Les momifications fœtales sont décrites chez la chienne, notamment après infection par *Neospora caninum* (35) mais leur incidence est inconnue.

4.4.1.2. Diagnostic différentiel des avortements en élevage canin : une place pour *Neospora caninum*

Le diagnostic différentiel des avortements regroupe les causes infectieuses et non infectieuses. Les causes infectieuses ont été plus étudiées, de part leur incidence plus élevée et leur plus grande facilité de diagnostic (94). Le diagnostic peut être difficile à établir, surtout si les tissus nécessaires n'ont pas été collectés correctement ou ne sont pas disponibles. Idéalement, l'avorton et le placenta doivent être acheminés sous couvert du froid, mais non congelés, pour être soumis au diagnostic. Parallèlement, le sérum maternel devrait être prélevé et soumis aux examens sérologiques. Il est important de noter que chez l'homme, la cause d'approximativement 60% des pertes fœtales reste inconnue (94), le même défaut de diagnostic existe à fortiori dans l'espèce canine.

Les différentes causes infectieuses d'avortements sont synthétisées dans le tableau 21, elles incluent les causes bactériennes, virales et parasitaires ((75) ; (94)). Les causes non infectieuses d'avortements regroupent les anomalies endocrines à l'origine d'une insuffisance lutéale, les causes médicamenteuses, les facteurs immunologiques – le lupus serait associé à une élévation de l'incidence des avortements – les facteurs génétiques, les facteurs environnementaux, les facteurs nutritionnels. L'influence de ces différents facteurs est plus souvent suspectée que réellement appuyée par des études scientifiques, car les études sont peu nombreuses à ce sujet.

Dans les différentes revues ou articles récents portant sur le diagnostic des avortements dans l'espèce canine, le parasite *Neospora caninum* est à chaque fois mis en avant ((75) ; (94) ; (160)). Même si son rôle lors d'arrêt de la gestation n'a été pour l'instant mis en évidence que de manière expérimentale, *Neospora caninum* pourrait être un agent à inclure dans le diagnostic différentiel lors d'avortement chez le chien. Il est en plus important de noter que le parasite bénéficie d'une forte prévalence dans de nombreux pays (voir 1.6.1.2.), et que celle-ci pourrait en plus être sous-estimée (73).

Tableau 21 : Diagnostic différentiels des avortements dans l'espèce canine
(75) ; (94)

Causes infectieuses		Remarque
Bactérie	<i>Brucella canis</i>	Mort embryonnaire, mort fœtale tardive ou Résorption Avortements entre 7 et 9 semaines de gestation avec pertes vulvaires prolongées
	<i>Streptococcus</i> β-hémolytique	Flore normale vaginale Rôle lors d'avortement, de mortalité néonatale, d'infertilité
	<i>Campylobacter</i>	Portage asymptomatique possible
	<i>Salmonella</i> sp.	Pathogène primaire ou secondaire lors d'avortement (infection ascendante) Rôle lors d'avortement, mort-nés et néomortalité
	<i>Escherichia coli</i>	Flore normale du vagin, présente lors de métrite et pyomètre Rôle possible des endotoxines lors d'avortement
	<i>Mycoplasma</i> et <i>Ureaplasma</i>	Portage asymptomatique possible Rôle lors de résorption, avortement, mort-nés et néomortalité
Virus	Herpesvirus canin	Rôle lors de mort fœtale tardive, résorption, momification, néomortalité Infection par sécrétions durant la gestation ou recrudescence d'une infection latente
	Parvovirus canin de type 1 (Virus minute)	Rôle lors de résorption, néomortalité, mort-nés,
	Morbilivirus (Virus distemper canin)	Rôle lors de résorption, néomortalité, mort-nés
Protozoaires	<i>Toxoplasma gondii</i>	Placentite puis infection fœtale
	<i>Neospora caninum</i>	Avortements, mort-nés, momifications induites expérimentalement Néomortalité
Causes non infectieuses		
Défauts endocriniens	Défaut de maintien lutéal	Chute du taux de progestérone lors de la gestation Rôle suspecté lors de résorption, avortement, mise-bas prématurée
	Hypothyroïdisme	Infertilité, avortement et momification rapportées dans un élevage
Cause médicamenteuse	Molécules abortives	
Facteurs immunologiques		Cause émergente en médecine humaine ; rôle chez le chien inconnu
Facteurs génétiques	Anomalie chromosomique Maladies génétiques	
Facteurs environnementaux		Nombreux chez l'homme : exposition au tabac, pesticides, métaux lourds
Facteurs alimentaires		Utilisation de conservateurs antioxydant incriminés par les éleveurs

4.4.2. Actuellement, le rôle de *Neospora caninum* lors de troubles de la reproduction sur le terrain est inconnu

La séroprévalence de *Neospora caninum* a été étudiée dans de nombreux pays. Cependant, contrairement à ce qu'il existe chez les bovins ou d'autres espèces, il n'y a pas de données publiées concernant un lien entre séropositivité et troubles de la reproduction. En effet, s'il est sûr que l'environnement est un facteur de risque chez le chien (séroprévalence plus élevée en zone rurale), tout comme une association statistique a pu être faite entre signes neurologique et séroprévalence vis-à-vis de *Neospora caninum* (voir 1.6.1.2), aucune étude n'a publié de résultats concernant la séroprévalence chez les femelles reproductrices ayant avorté par rapport à la séroprévalence générale.

En outre, les données concernant l'impact de *Neospora caninum* sur la reproduction, en dehors des expérimentations, sont très limitées. Dans leur étude prospective, Barber et Trees ont noté 6 chiots mort-nés sur les 122 naissances totales (7), soit 5%, ce qui n'est pas particulièrement plus élevé que dans la population générale. La taille de la portée n'a pas semblé être affectée par l'infection à *Neospora caninum*, et cela pour l'étude prospective et rétrospective menée par Barber et Trees (7). Une diminution de la taille des portées des chiennes séropositives par rapport aux standards de la race n'a d'ailleurs jamais été rapportée dans la littérature ((6) ; (7) ; (103)), mais aucune étude précise à ce sujet n'a été entreprise. Il est sûr néanmoins que des chiennes séropositives ayant eu des portées atteintes ont été remises à la reproduction sans problèmes particuliers. Barber et Tress (7), dans leur étude rétrospective portant sur les chiennes Hamiltonsväre, rapporte le cas de trois femelles atteintes ayant mis bas deux fois de suite. La taille de la portée était normale et les gestations se sont déroulées sans anomalies. L'infection congénitale s'est répétée à chaque fois lors des deux gestations successives, avec un taux d'infection des chiots similaire. Dans l'étude prospective, trois chiennes furent suivies sur deux gestations consécutives. Aucun problème n'est rapporté au sujet du déroulement de ces gestations. Cependant, deux d'entre elles donnèrent naissance à un chiot atteint lors de leur première gestation, mais l'ensemble de la portée était saine lors de la deuxième gestation. Dubey *et al.* (51) rapportent le cas de deux chiennes Berger Allemand infectées ayant mis bas deux fois de suite, sans problèmes particuliers (voir figure 10, 4.2.1) L'intervalle entre les deux gestations n'est précisé que pour l'une des chiennes.

Celui-ci, d'une durée de 2 ans, n'a pas empêché la répétition de l'infection lors des deux gestations successive.

Pourtant, dans d'autres études, des troubles de la gestation où l'implication de *Neospora caninum* pouvait être suspecté ont été rapportés . Dans la même étude de Barber et Trees (7), deux des chiennes qui avaient mis bas une portée infectée spontanément par *Neospora caninum* ont très probablement avorté et résorbé leurs fœtus lors de la mise à la reproduction suivante avec des signes d'infection utérine, mais la cause de l'avortement n'a pas été formellement établie. Dans ce cas, l'incidence des avortements n'était pas plus élevée que dans la population générale, mais les auteurs soulignent que cette incidence n'a pas pu être parfaitement évaluée. En effet, il est difficile pour le propriétaire de suspecter un arrêt de gestation si le fœtus n'est pas expulsé ou si la chienne ne présente pas de signes cliniques. Seule un suivi échographique précoce pourrait mettre en évidence les résorptions embryonnaires.

Un article récent soulève la possibilité de l'émergence du parasite *Neospora caninum* lors d'avortement chez le chien. Une chienne ayant mis bas une portée infectée de 10 chiots (5 atteints et 5 cliniquement sains), fut remise à la reproduction. Lors des deux gestations suivantes, la chienne montra des signes d'avortement vers 45 jours de gestation. L'hypothèse d'une néosporose congénitale avec avortement a été appuyée par des tests immuno-histochimique – la présence du parasite a été démontré sur les placentas et les tissus fœtaux – et des tests sérologiques (Fioretti *et al.* (71)). Le lien de causalité entre *Neospora caninum* et avortement n'a pas été formellement établi, mais c'est à présent l'unique cas probable d'avortement spontané à *Neospora caninum* décrit chez la chienne.

L'implication de *Neospora caninum* en élevage canin n'a pas encore fait l'objet d'études particulières. Même si le rôle de *Neospora caninum* lors d'avortement est reconnu expérimentalement et fortement suspecté naturellement, on ne sait actuellement rien de la forme épidémiologique, de la prévalence et des implications de ces arrêts de gestation à *Neospora caninum*.

4.4.3. Aucun traitement ne permet de protéger le fœtus de l'infection à *Neospora* à l'heure actuelle.

Certains traitements se sont montrés efficace vis-à-vis des formes nerveuses de néosporose, lorsqu'ils sont commencés précocement. Dans une étude sur le sujet, Lindsay et Dubey (103) rapportent qu'une association de triméthoprim et de sulfadiazine, à la posologie standard de 15mg/kg deux fois par jour avec de la pyremethamine à la posologie de 1 mg/kg une fois par jour, pendant 4 semaines, a permis la guérison de la paralysie postérieure chez certains chiens. La clindamycine s'est également montrée efficace dans certains cas de formes nerveuses, mais aussi pour la forme cutanée de néosporose (59). Cependant, ces traitements n'ont été efficaces que sur un nombre restreint de chiens– sur 27 cas, 16 ont pu être traités, avec une amélioration clinique pour seulement 10 d'entre eux (Barber et Trees (6)) – et ils ne protègent en aucun cas la transmission placentaire du parasite.

En effet, une femelle qui avait donné naissance à une portée atteinte fut traitée contre *Neospora caninum* après sa mise-bas puis traitée à intervalle hebdomadaire pendant la gestation suivante, ce qui n'a pas empêché la transmission du parasite à trois de ses chiots (Mayhew *et al.* (121)). Barber et Trees (7) décrivent également le cas d'une jeune chienne atteinte de néosporose et traitée précocement, dont les symptômes ont disparus, et qui fut mise quelques années plus tard à la reproduction. La chienne donna naissance à une portée atteinte de néosporose.

En élevage, aucun traitement n'est efficace pour prévenir la transmission de la néosporose de la mère aux fœtus. Seule une meilleure connaissance du parasite et de sa transmission, afin de définir et de dépister les femelles à risques, peut apporter une solution aux problèmes engendrés par la néosporose en élevage canin.

4.4.4. Le chien, clé épidémiologique des avortements à *Neospora* chez les bovins

Le rôle précis des chiens dans l'épidémiologie de la néosporose bovine n'est pas parfaitement connu. On estime à environ 5 à 9% le taux d'infection postnatale nécessaire chez les bovins pour que l'infection à *Neospora caninum* soit maintenue dans un troupeau (French *et al.* (72)). Or, le chien est actuellement la seule voie possible de contamination horizontale (ou post natale) chez les bovins. Plusieurs études ont mis en avant le fait que la présence d'un chien dans une exploitation était un facteur de risque pour la néosporose bovine et que le nombre de chiens présents était corrélé aux avortements à *Neospora caninum* (Dubey *et al.* (64)). Non seulement la transmission horizontale est nécessaire au maintien de l'infection dans le troupeau, mais elle est souvent également nécessaire pour l'introduction du parasite dans l'élevage : la transmission verticale du parasite et les avortements associés ne sont possible que si le parasite a été préalablement introduit dans l'exploitation (Lindsay et Dubey (103) ; Schares *et al.* (159)). Le chien, via l'excrétion d'oocystes, est une des clés épidémiologiques de l'entrée et du maintien de l'infection à *Neospora caninum* dans un troupeau. Au regard des lourdes conséquences engendrées par la néosporose en élevage bovins, les études concernant la néosporose canine et sa transmission chez le chien seraient ainsi utiles au contrôle de l'infection bovine.

4.4.5. Pistes d'études possibles concernant *Neospora caninum* en élevage canin

De nombreuses voies de recherches sont possibles concernant *Neospora caninum* et son implication en élevage canin. En effet, son rôle lors de troubles de la reproduction chez le chien est de plus en plus suspecté, mais les études de terrain sont très peu nombreuses. On peut en premier lieu remarquer que la séroprévalence vis-à-vis de *Neospora caninum* n'a jamais été étudiée en élevage. De manière plus précise, il pourrait être extrêmement intéressant d'étudier l'éventuelle corrélation entre séropositivité et troubles de la reproduction des chiennes reproductrices. En effet, de telles études ont déjà été menées chez les bovins,

mais aussi chez les chevaux ou les petits ruminants. Une étude à grande échelle visant à évaluer la séroprévalence des mères en élevage canin pourrait être réalisée par prélèvement systématique lors des visites vétérinaires. Une comparaison entre séroprévalence vis-à-vis de *Neospora caninum* chez les mères « saines » et séroprévalence chez les mères ayant subi des avortements ou sujettes aux troubles de la reproduction (chiennes qui n'arrivent pas à « remplir »), pourrait alors être réalisée, ce qui serait une première approche de l'impact de *Neospora caninum* lors de troubles de la reproduction en élevage canin. Une recherche systématique du parasite sur les avortons ou placentas pourrait par la suite préciser le rôle et surtout l'importance de *Neospora caninum* lors d'avortement chez le chien.

Une étude concernant l'impact de *Neospora caninum* sur la fertilité chez la chienne pourrait également être intéressante. En effet, aucune étude n'a été publiée concernant la taille de la portée et l'infection par *Neospora caninum*.

Les mécanismes mêmes à l'origine des avortements à *Neospora caninum* chez le chien sont en grande partie non élucidés. Aucune étude n'existe concernant les mécanismes immunitaires mis en jeu par l'infection à *Neospora* chez le chien en fonction du stade de gestation. De plus, on ne sait pas pour l'instant si l'infection à *Neospora caninum* chez le chien peut conduire, comme chez les bovins, à la mise en place d'une immunité et donc protéger de la transmission placentaire. Or on sait que chez le bovin le moment de l'infection est primordial et peut conduire soit à la mise en place d'une immunité, soit à la transmission de l'infection au fœtus. Cette donnée est fondamentale pour la lutte contre *Neospora caninum*, car justifie le développement d'une stratégie vaccinale. Chez le chien, on ne sait actuellement pas si le développement d'un vaccin pourrait être justifié sur le plan immunologique.

De plus, on sait chez le bovin que seules les femelles infectées *in utero* sont susceptibles de transmettre l'infection de manière répétée à leur descendance. Chez le chien, les modalités de transmission de *Neospora caninum* à la descendance sont encore très floues et mériteraient d'être approfondies. Des infections expérimentales, sur un plus grand nombre de chiennes et surtout sur plusieurs gestations, pourraient être extrêmement intéressantes.

On peut pour conclure ce paragraphe souligner que les études à grande échelle concernant la transmission de *Neospora caninum* sont certainement plus difficiles à mettre en œuvre chez le chien que chez les bovins. En effet, il est difficile et onéreux de maintenir des chiens dans les conditions de laboratoires nécessaires aux études expérimentales. De plus, les avortements sont souvent difficiles à diagnostiquer chez le chien, en dehors d'un contrôle échographique strict. Au contraire, chez les bovins, les avortements sont soumis à déclaration obligatoire, de part les risques de zoonose encourus. De plus, l'impact majeur des avortements bovins sur le plan économique a incité les laboratoires à développer les recherches à ce sujet. On peut alors penser que si les investigations concernant les avortements chez le chien étaient réalisées à aussi grande échelle que le sont les avortements chez les bovins, de nouveaux agents pathogènes, et notamment *Neospora caninum*, pourraient apparaître comme des pathogènes émergents.

Tout comme les différents hôtes intermédiaires connus de *Neospora caninum*, le chien multiplie le parasite sous forme tachyzoïte et le transmet à sa descendance. La naissance de chiots atteints de néosporose est un témoin relativement bien étudié de cette transmission verticale. Par contre, les troubles de la reproduction, fréquemment décrits chez d'autres hôtes intermédiaires, sont moins connus chez le chien, même si des arrêts de gestation ont été provoqués expérimentalement. Les arrêts de gestation sont des problèmes majeurs en élevage canin alors qu'il existe des lacunes concernant leur diagnostic étiologique. Il semble alors justifié de développer les recherches concernant le parasite *Neospora caninum* en élevage canin.

CONCLUSION

Le parasite *Neospora caninum* est transmis très efficacement à la descendance au cours de la gestation chez les mammifères. Les modifications immunitaires complexes qu'il engendre lorsqu'il se multiplie au sein de l'organisme maternel gestant, ainsi que les lésions fœtales directes qu'il provoque chez le fœtus, sont à l'origine d'avortements, pouvant se répéter au cours des gestations successives. La transmission verticale de *Neospora caninum* a fait l'objet de nombreuses études chez les bovins, ce qui en fait un exemple d'étude du parasite. Cependant, son implication lors d'avortement a été mise en évidence pour de nombreux hôtes, sur des observations de terrain chez les ovins, les caprins, les équidés, les ruminants sauvages, les camélidés et de manière expérimentale chez les rongeurs, les primates, le porc, le chat.

Le chien est un point clé du cycle épidémiologique de *Neospora caninum* car il en est le seul hôte définitif connu à ce jour. Cependant, son rôle dans le cycle parasitaire est plus complexe, car il est également l'hôte de la multiplication du parasite sous forme tachyzoïte, comme n'importe quel hôte intermédiaire. Ainsi, les conséquences observées et maintenant bien connues chez les hôtes intermédiaires sont attendues dans cette espèce. La prévalence de la néosporose est relativement élevée chez le chien, le parasite est facilement transmis à la descendance, comme en témoignent les cas d'atteintes congénitales de chiots et les rares études expérimentales réalisées à ce jour. De plus, les troubles de la reproduction – avortements compris – sont probablement plus fréquents qu'il n'y paraît en élevage canin et représentent une réelle perte économique pour l'éleveur. Ces différents constats posent de réelles questions, qui sont encore sans réponse, concernant l'éventuelle émergence de *Neospora caninum* en élevage canin. Le développement de la recherche concernant le parasite *Neospora caninum* et son implication lors de troubles de la reproduction chez le chien pourrait être un enjeu majeur de la médecine vétérinaire de collectivité dans un futur proche.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALMERIA S., DE MAREZ T., DAWSON H., ARAUJO R., DUBEY J.P., GASBARRE L.C. (2003) Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunology*, **25**, 383-392.
2. ANDERSDON M.L., ANDRIANARIVO A.G., CONRAD P.A. (2000) Neosporosis in cattle. *An. Reprod. Sc.*, **60-61**, 417-431.
3. ANDERSON M.L., REYNOLDS J.P., ROWE J.D., SVERLOW K.W., PACKHAM A.E., BARR B.C. *et al.* (1997) Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. Infection in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **210**, 1206-1210.
4. ANDRIANARIVO A.G., ROWE J.D., BARR B.C., ANDERSON M.L., PACKHAM A.E., SVERLOW K.W. (2000) A POLYGENTM-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int. J. Parasitol.* **30**, 985-990.
5. BARBER J.S., PAYNE-JONHSON C.E., TREES A.J. (1996) Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. *J. Small An. Pract.*, **37**, 568-574.
6. BARBER J.S., TREES A.J. (1996) Clinical aspect of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet. Rec.*, **139**, 439-443.
7. BARBER J.S., TREES A.J. (1998) Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 57-64..
8. BARR B.C., ANDERSON M.L., BLANCHARD P.C., DAFT B.M., KINDE H., CONRAD P.A. (1990) Bovine foetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.*, **27**, 354-361.
9. BARR B.C., ANDERSON M.L., DUBEY J.P., CONRAD P.A. (1991) *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.*, **28**, 110-116.
10. BARR B.C., ANDERSON M.L., WOODS L.W., DUBEY J.P., CONRAD P.A. (1992) *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**, 365-367.
11. BARR B.C., CONRAD P.A., DUBEY J.P., ANDERSON M.L. (1991) *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure and immunoreactivity. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**, 39-46.

12. BARR B.C., CONRAD P.A., SVERLOW K.W., TARANTAL A.F., HENDRICKX A.G. (1994) Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Laboratory Investigation*, **71** (2), 236-242.
13. BARR B.C., ROWE J.D., SVERLOW K.W., BONDURANT R.H., ARDANS A.A., OLIVER M.N. *et al.* (1994) Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 207-215.
14. BARTELS C.J.M., ANAIZ-SECO J.I., RUIZ-SANTA-QUITERA A., BJORKMAN J., FROSSLING J., VON BLUMRODER D. *et al.* (2006) Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, the Netherlands, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol.*, **137**, 17-27.
15. BARTELS C.J.M., VAN MAANEN C., VAN DER MEULEN A.M., DIJKSTRA T., WOUDE W. (2005) Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Vet. Parasitol.*, **131**, 235-246.
16. BARTELS C.J.M., WOUDE W., SCHUKKEN Y.H. (1999) Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*, **52**, 1247-1257.
17. BARTLEY P.M., KIRVAR E., WRIGHT S., SWALES C., ESTEBAN-REDONDO I., BUXTON D., *et al.* (2004) Maternal and foetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mild-gestation. *J. Comp Path.*, **130**, 81-91.
18. BASSO W., VENTURINI L., VENTURINI M.C., HILL D.E., KWOK O.C.H., SHEN S.K., *et al.* (2001) First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.*, **87**, 612-618.
19. BASZLER T.V., KNOWLES D.P., DUBEY J.P., GAY J.M., MATHISON B.A., MCELWAIN T.F. (1996) Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1423-1428.
20. BERGERON N., FECTEAU G., VILLENEUVE A., GIRARD C., PARE J. (2001) Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.*, **97**, 145-152.
21. BJERKAS I., DUBEY J.P. (1991) Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of norwegian dogs. *Acta Vet. Scand*, **32**, 407-410.

22. BJERKAS I., JENKINS M.C., DUBEY J.P. (1994) Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoites antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **1**, 214-221.
23. BJERKAS I., MOHN S.F., PRESTHUS J. (1984) Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs *Z. parasitenkd*, **70**, 271-274.
24. BJERKAS I., PRESTHUS J. (1988) Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoan associated with encephalomyelitis and myositis in a dog. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, **96**, 445-454.
25. BJORKMAN C., HEMPHILL A. (1998) Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies. *Parasit. Immunol.*, **20**, 73-80.
26. BJORKMAN C., HOLDMAHL O.J.M., UGGLA A. (1997) An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstrating antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol.*, **68**, 251-260.
27. BJORKMAN C., NASLUND K., STENLUND S., MALEY S.W., BUXTON D., UGGLA A. (1999) An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 41-44.
28. BOYD P., BARR P.A., BROOKS W., ORR J.P. (2005) Neosporosis in a young dog presenting with dermatitis and neuromuscular signs. *J. Sm. Anim. Pract.*, **46**, 85-88.
29. BUXTON D., MALEY S.W., WRIGHT S., THOMSON K.M., RAE A.G., INNES E.A. (1998) The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J. Comp. Path.*, **118**, 267-279.
30. BUXTON D., MC ALLISTER M., DUBEY J.P. (2002) The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in parasitol*, **18**, 546-552.
31. CANADA N., MEIRELES C.S., FERREIRA P., CORREIA DA COSTA J.M., ROCHA A. (2006) Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. *Vet. Parasitol.*, **139**, 109-114.
32. CHEADLE M.A., LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L. (1999) Short communication: Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Vet Parasitol.* **325**, 325-330.
33. CHEADLE M.A., LINDSAY D.S., ROWE S., DYKSTRA C.C., WILLIAMS M.A., SPENCER J.A. *et al.* (1999) Prevalence of antibodies to *Neospora sp.* in horses from Alabama and characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. *Int. J. Parasitol.*, **126**, 263-269.

34. CHI J., VANLEEUEWEN J.A., WEERSINK A., KEEFE G.P. (2002) Direct losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leucosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*. *Preventive Veterinary Medicine*, **55**, 137-153.
35. COLE R. A., LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., SORJONEN D. C., DUBEY J. P. (1995) Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Parasitol.*, **81**, 208–211. .
36. COLE R.A., LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., DUBEY J.P. (1995) Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J. Parasitol.*, **81**, 730-732.
37. COLLANTES-FERNANDEZ E., RODRIGUEZ-BERTOS A., ARNAIZ-SECO I., MORENO B., ADURIZ G., ORTEGA-MORA L.M. (2006) Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. *Theriogenology*, **65**, 629–641.
38. CORBELLINI L.G., COLODEL E.M., DRIEMEIER D. (2001) Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 416-419.
39. CUMMINGS J.F., DE LAHUNTA A., SUTER M.M., JACOBSON R.H. (1988) Canine protozoan polyradiculoneuritis. *Acta Neuropathol.*, **76**, 46-54.
40. DIJKSTRA T., BARKEMA H.W., BJORKMAN C., WOUDA W. (2002) A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. *Vet. Parasitol.*, **109**, 203-211.
41. DIJKSTRA T., EYSKER M., SCHARES G., CONRATH F.J., WOUDA W., BARKEMA H.W. (2001) Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 747-752.
42. DUARTE P.C., CONRAD P.A., BARR B.C., WILSON W.D., FERRARO G.L., PACKHAM A.E. *et al.* (2004) Risk of transplacental transmission of *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in California horses. *J. Parasitol.*, **90**, 1345-1351.
43. DUBEY J.P. (1999) Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, **84**, 349-367.
44. DUBEY J.P., ACLAND H.M., HAMIR A.N. (1992) *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. *J. Parasitol.*, **78**, 532-534.

45. DUBEY J.P., BARR B.C., BARTA J. R., BJERKAS I., BJORKMAN C., BLAGBURN B.L., *et al.* (2002) . Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol.*, **32**, 929–946.
46. DUBEY J.P., BUXTON D., WOUDA W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. (2006) *J.Comp. Path.*, **134**, 267-289.
47. DUBEY J.P., CARPENTER J.L., SPEER C.A., TOPPER M.J., UGGLA A. (1988a) Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **192**, 1269–1285.
48. DUBEY J.P., CHAPMAN J.L., ROSENTHAL B.M., MENSE M., SCHUELER R.L. (2006) Clinical *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis canis*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* infections in dogs. *Vet. Parasitol.*, **137**, 36-49.
49. DUBEY J.P., DOROUGH K.R., JENKINS M.C., LIDDELL S., SPEER C.A., KWOC O.C.H, *et al.* (1998) Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int. J. Parasitol.*, **28**,293–304.
50. DUBEY J.P., HATTEL A.L., LINDSAY D.S., TOPPER M.J. (1988) Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **193**, 1259–1263.
51. DUBEY J.P., KOESTNER A., PIPER R.C. (1990) Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **197**, 857–860.
52. DUBEY J.P., LINDSAY D.S. (1989) Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *J. Parasitol.*, **75**, 765-771.
53. DUBEY J.P., LINDSAY D.S. (1989) Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 1578-1579.
54. DUBEY J.P., LINDSAY D.S. (1990) *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**, 230-233.
55. DUBEY J.P., LINDSAY D.S. (1996) A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, **67**, 1–59.
56. DUBEY J.P., LINDSAY D.S., ANDERSON M.L., DAVIS S.W., SHEN S.K. (1992) Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **201**, 709-713.
57. DUBEY J.P., LINDSAY D.S., HILL D., ROMAND S., THULLIEZ P., KWOK O.C.H. *et al.* (2001) Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *J. Parasitol.*, **87**, 345-353.

58. DUBEY J.P., LINDSAY D.S., LIPSCOMB T.P. (1990) Neosporosis in cats. *Vet. Pathol.*, **27**, 335-339.
59. DUBEY J.P., METZGER F.L., HATTEL A.L., LINDSAY D.S., FRITZ D.L. (1995) Canine cutaneous neosporosis: clinical improvement with Clindamycin. *Vet. Dermatol.*, **6**, 37-43.
60. DUBEY J.P., MORALES J.A., VILLALOBOS P., LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., TOPPER M.K. (1996) Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J. Vet. Med.Assoc.*, **208**, 263-265.
61. DUBEY J.P., PORTERFIELD M.L. (1990) *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J. Parasitol.*, **76**, 732-734.
62. DUBEY J.P., RIGOLET J., LAGOURETTE P., GEORGE C., LONGEART L., LENET J.L. (1996) Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). *J. Parasitol.*, **82**, 338-339.
63. DUBEY J.P., SCHARES G. (2006) Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.*, **140**, 1-34.
64. DUBEY J.P., SCHARES G. ORTEGA-MORA L.M. (2007) Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, **20**, 323-367.
65. DUBEY J.P., SREEKUMAR C., KNICKMAN E., MISKA K.B., VIANNA M.C.B., KWOK O.C.H. et al (2004) Biologic, morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int. J. Parasitol.* **34**:1157–1167.
66. ELENİ C., CROTTI S., MANUALI E., COSTARELLI S., FILIPPINI G., MOSCATI L., et al. (2004) Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. *Vet. Parasitol.*, **123**, 271–274.
67. ENRICAN G. (2001) Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.*, **126**, 79-94.
68. FERROGLIO E., PASINO M., RONCO F., BENA A., TRISCIUGLIO A. (2007) Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in urban and rural dogs in north-west Italy. *Zoonoses Public Health*, **54** (3-4) 135-139.
69. FIGLIUOLO L.P.C., KASAI N., RAGOZO A.M.A., DE PAULA V.S.O., DIAS R.A., SOUZA S.L.P., GENNNAEI S.M. (2004) Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from Sao Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.*, **123**, 161-166.

70. FIORETTI D.P., PASQUALI P., DIAFERIA M., MANGILI V., ROSIGNOLI L. (2003) *Neospora caninum* infection and congenital transmission : serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *J. Vet. Med. B*, **50**, 399-404.
71. FIORETTI D.P., VERONESI F., DIAFERIA M., VITELLOZZI G. (2006) On a naturally occurring repeated vertical transmission with probable abortive manifestations of *Neospora caninum* in a bitch. *Summa, Animli da Compagnia*, **23**, 45-53.
72. FRENCH N.P., CLANCY D., DAVISON H.C., TREES A.J. (1999) Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int. J. Parasitol.*, **29**, 1691-1704.
73. GHALMI F., CHINA B., KAIDI R., DAUBE G., LOSSON B. (2008) Detection of *Neospora caninum* in dog organs using real time PCR systems. *Vet. Parasitol.*, **155**, 161-167.
74. GIBNEY H., KIPAR A., ROSBOTTOM A., GUY C.S., SMITH R.F., HETZEL U., *et al.* (2008) The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *Int. J. Parasitol.*, **38**, 579-588.
75. GIVENS M.D., MARLEY M.S.D. (2008) Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, **70**, 270-285.
76. GONDIM L.F., MCALLISTER M.M., ADESON-SPRECHER R.C., BJORKMAN C., LOCK T.F., FIRKINS L.D. *et al.* (2004) Transplacental transmission and abortion in cows administred *Neospora caninum* oocysts. *J. Parasitol.*, **90**, 1394-13.
77. GONDIM L.F.P., GAO L., MCALLISTER M.M. (2002) Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattles, and in vitro isolation from oocysts. *J. Parasitol.*, **88**, 1159-1163.
78. GONDIM L.F.P., GAO L., MCALLISTER M.M. (2004) Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, **34**, 159-161.
79. GONDIM L.F.P., MCALLISTER M.M., GAO L. (2005) Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Vet. Parasitol.*, **134**, 33-39.
80. GREIG B., ROSSOW K.D., COLLINS J.E., DUBEY J.P. (1995) *Neospora caninum* pneumonia in an adult dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc* , **206**, 1000-1001.

81. HAESLER B., REGULA G., STARK K.D.C., SAGER H., GOTTSTEIN B., REIST M. (2006) Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. *Prev. Vet. Med.*, **77**, 254-283.
82. HALL C.A., REICHEL M.P., ELLIS J.T. (2005) *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet. Parasitol.*, **128**, 231-241.
83. HASSIG M., SAGER M., REITT K., ZIEGLER D., STRABEL D., GOTTSTEIN B. (2003) *Neospora caninum* in sheep : a case herd report. *Vet. Parasitol.*, **88**, 1159-1163.
84. HELMICK B., OTTER A., MCGARRY J., BUXTON D. (2002) Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. *Res. Vet. Sci.*, **73**, 187-198.
85. HERNANDEZ J., RISCO C., DONOVAN A. (2001) Risk of abortion associated with *Neospora caninum* during different lactations and evidence of congenital transmission in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **221**, 1742-1746.
86. HOANE J.S., YEARGAN M.R., STAMPER S., SAVILLE W.J., MORROW J.K., LONDSAYD.S. *et al.* (2005) Recombinant NhSAG1 ELISA: a sensitive and specific assay for detecting antibodies against *Neospora hughesi* in equine serum. *J. Parasitol.*, **91**, 446-452.
87. HOWE L., COLLET M.G., TATTERSFIELD G., PATTISON R.S., POMROY W.E., KENYON P.R., *et al.* (2008) The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortion in the southern North Island of New Zealand. *Small Ruminant Research*, **75**, 115-122.
88. INNES E.A., ANDRIANARIVO A.G., BJORMAN C., CONRAD W., CONRAD P.A. (2002) Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitol.*, **18** (11), 497-404.
89. INNES E.A., WRIGHT S., BARTLEY P., MALEY S., MACALDOWIE C., ESTEBAN-REDONDO I., BUXTON D. (2005) The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **108**, 29–36.
90. INNES E.A., WRIGHT S.E., MALEY S., RAE A., SCHOCK A., BARTLEY P., *et al.* (2001) Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 1523-1534.
91. JARDINE J.E. (1996) The ultrastructure of bradyzoites and tissue cyst of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet. Parasitol.*, **62**, 231-240.

92. JENKINS M.C., CAVER J. A., BJÖRKMAN C., ANDERSON T. C., ROMAND S., VINYARD B., *et al.* (2000) Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. *Vet. Parasitol.*, **94**, 17–26.
93. JENSEN L., JENSEN T.K., LIND P., HENRIKSEN S.A., UGGLA A., BILLE-HANSEN V. (1998) Experimental porcine neosporosis. *A.M.I.S.*, **106**, 475-482.
94. JOHNSTON S.D., KUSTRITZ M.V.R., OLSON P.N.S. In: KERSEY R., editor. (2001) Canine and Feline theriogenology. *W.B.Saunders Company*, 66-104.
95. JOLLEY W.R., MCALLISTER M.M., MCGUIRE A.M., WILLS R.A. (1999) Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. *Vet. Parasitol.*, **82**, 251-257.
96. KLEIN B.U., MÜLLER E. (2001) Seroprävalenz von Antikörpern gegen *Neospora caninum* bei Hunden mit und ohne klinischem Neosporoseverdacht in Deutschland. *Prak. Tierarz.* **82**, 437-444.
97. KLIGER E.B., SHKAP V., BANETH G., MILDENBERG Z., STEINMAN A. (2007) Seroprevalence of *Neospora spp* among asymptomatic horses, aborted mares and horses demonstrating neurological signs in Israel. *Vet Parasitol.* **148**, 109-113.
98. KOBAYASHI Y., YAMADA M., OMATA Y., KOYOMA T., SAITO A., MATSUDA T. *et al.* (2001) Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J. Parasitol.*, **87**, 434-436.
99. KRITZNER S., SAGER H., BLUM J., KREBBER R., GREIF G., GOTTSTEIN B. (2002) An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrobiol.*, **1**, 4.
100. LALLY N.C., JENKINS M.C., DUBEY J.P. (1996) Evaluation of two recombinant antigens for Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of bovine neosporosis. *Clin. Diag. Lab.Invest.*, **3**, 275-279.
101. LELEU A. Infection à *Neospora caninum* dans la faune sauvage française. (2003) Thèse Med. Vet. Alfort, 107p.
102. LIDELL S., JENKINS M.C., DUBEY J.P. (1999) Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *J. Parasitol.*, **85**, 550-555.
103. LINDSAY D.S., DUBEY J.P. (2000) Canine Neosporosis. *J. Vet. Parasitol.*, **14** (1), 1-10.

104. LINDSAY D.S., DUBEY J.P., DUNCAN R.B. (1999) Rapid communication – Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, **82**, 327-333.
105. LINDSAY D.S., DUBEY J.P., MCALLISTER M. (1999) *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, **21**, 317-321.
106. LINDSAY D.S., RIPPEY N.S., POWE T.A., SARTIN E.A., DUBEY J.P., BLAGBURN B.L. (1995) Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.*, **56**, 1176-1180.
107. LINDSAY D.S., RITTER D.M., BRAKE. (2001) Oocyst excretion in dogs fed mouse brain containing tissue cysts of cloned line of *Neospora caninum*. *J. parasitol.*, **87**, 909-911.
108. LINDSAY D.S., SPEER C.A., TOIVIO-KINNUCAN M.A., DUBEY J.P., BLAGBURN B.L. (1993) Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Vet. Res.* **54** , 103-106.
109. LINDSAY D.S., STEINBERG H., DUBIELZIG R.R., SEMRAD S.D., KONKLE D.M., MILLER P.E. *et al.* (1996) Central nervous system neosporosis in a foal. *J. vet. Diagn. Invest.*, **8**, 507-510.
110. LOCATELLI-DITRICH R., DITRICH J.R., RICHARTZ R.R.T.B., GASINO JOINEAU M.E., ANTUNES J., PINCKNEY R.D. *et al.* (2006) Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, **135**, 215-221.
111. LOPEZ-GATIUS F., PABON M., ALMERIA S. (2004) *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, **62**, 606–613.
112. LOPEZ-GATIUS. F., SANTOLARIA P., ALMERIA S. (2005) *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions. *J. Vet. Med. B*, **52**, 51-53.
113. LOPEZ-PEREZ I.C., COLLANTES-FERNANDEZ E., AGUADO-MARTINEZ A., RODRIGUEZ-BERTOS A., ORTEGA-MORA L.M. (2008) Influence of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice during pregnancy in post-natal development. *Vet. Parasitol.*, **155**, 175-183.

114. LOPEZ-PEREZ I.C., RISCO-CASTILLO V., COLLANTES-FERNANDEZ E., ORTEGA_MORA L.M. (2006) Comparative effect of *Neospora caninum* infection in Balb/c mice at three different gestation periods. *J. Parasitol.*, **92** (6) 1286-1291.
115. MACALDOWIE C., MALEY S.W., WRIGHT S., BARTLEY P., ESTEBAN-REDONDO., BUXTON., *et al* (2004) Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J. Comp. Path.*, **131**, 142-156.
116. MALEY S.W., BUXTON D., MACALDOWIE C.N., ANDERSON I.E., WRIGHT S.E., BARTLEY P.M., *et al.* (2006) Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J. Compa. Path.*, **135**, 130-41.
117. MALEY S.W., BUXTON D., RAE A.G., WRIGHT S.E., SCHOCK A., BARTLEY P.M. *et al.* (2003) The Pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mild gestation. *J. Comp. Path.*, **129**, 186-195.
118. MARSH A.E., BARR B.C., PACKHAM A.E., AND CONRAD P.A. (1998) Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J. Parasitol.*, **84**, 983-991.
119. MASALA G., PORCU R., DAGA C., DENTI S., CANU G., PATTA C. *et al.* (2007) Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **1**, 96-98.
120. MASUDA T., KOBAYASHI Y., MAEDA R., OMATA Y. (2007) Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 scid mice. *Vet. Parasitol.*, **149**, 130-133.
121. MAYHEW I.G., SMITH K.C., DUBEY J.P., GATWARD L.K., MCGLENNON N.J. (1991) Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter of puppies. *Journal of Small Animal Practice*, **32**, 609-612.
122. MCALLISTER M.M., DUBEY J.P., LINDSAY D.S., JOLLEY W.R., WILLS R.A. MCGUIRE A.M. (1998) Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1473-1478.
123. MCALLISTER M.M., HUFFMAN E.M., HIETALA S.K., CONRAD P.A., ANDERSON M.L., SALMAN M.D. (1996) Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 355-357.

124. MCALLISTER M.M., MCGUIRE A.M., JOLLEY W.R., LINDSAY D.S., TREES A.J., STOBART R.H. (1996) Experimental Neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet. Pathol.*, **33**, 647-655.
125. MCCANN C.M., MCALLISTER M.M., GONDIM L.F.P., SMITH R.F., CRIPPS P.J., KIPAT A. *et al.* (2007) *Neospora caninum* in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. *Int. J. Parasitol.*, **37**, 1631-1639.
126. MCDOLE M., GAY J.M. (2002) Seroprevalence of antibodies against *Neospora caninum* in diagnostic equine serum samples and their possible association with fetal loss. *Vet. Parasitol.*, **105**, 257-260.
127. MCGARRY J.W., STOCKTON M.C., WILLIAMS D.J.L., TREES A.J. (2003) Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J. Parasitol.* **89**, 628-630.
128. MCINNES L.M., IRWIN P., PALMER D.G., RYAN U.M. (2006) In vitro isolation and characterization of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. *Vet. Parasitol.*, **137**, 355-363.
129. MCNAMEE P., JEFFREY M. (1994) *Neospora*-associated bovine abortion in Northern Ireland. *Vet. Rec.*, **134**, 48.
130. MILLER C.M.D., QUINN H., RYCE C., REICHEL M.P., ELLIS J.T. (2005) Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. *Int. J. Parasitol.*, **35**, 821-828.
131. MOEN A.R., WOUDA W., MUL M.F., GRAAT E.A.M., VAN WERVEN T. (1998) Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology*, **49**, 1301-1309.
132. MOORE D.P. (2005) Neosporosis in South America. *Vet Parasitol.*, **127**, 87-97.
133. MOORE D.P., DE YANIZ M.G., ODEON A.C., CANO D., LEUNDA M.R., SPATH E.A.J. *et al.* (2007) Serological evidence of *Neospora caninum* infections in goats from La Rioja Province, Argentina. *Small Ruminant Research*, **73**, 256-258.
134. MOSKWA B., PASTUSIAK K., BIEN J., CABAJ W. (2007) The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitol. Res.*, **100**, 633-636.

135. NAGULESWARAN A, HEMPHILL A., RAJAPAKSE R.P.V.J., SAGER H. (2004) Elaboration of a crude antigen ELISA for serodiagnosis of caprine neosporosis: validation of the test by detection of *Neospora caninum* specific antibodies in goats from Sri-Lanka., *Vet. Parasitol.*, **126**, 257-262.
136. NIETFELD J.C., DUBEY J.P., ANDERSON M.L., LIBAL M.C., YAEGER M.J., NEIGER R.D. (1992) *Neospora*-like infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**, 223-226.
137. OMOTA Y., NIDAIRA M., KANO R., KOBAYASHI Y., KOYOMA T., FURUOKA H. *et al.* (2004) Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice in both acute and chronic infection. *Vet. Parasitol.*, **121**, 323-328.
138. ORTEGA-MORA L.M., FERRE I., DEL-POZO I. CAETANO-DA-SILVA A., COLLANTES-FERNADEZ E., REGIDOR-FERRILO J., *et al.* (2003) Rapid communication: Detection of *Neospora caninum* in semen of Bulls. *Vet. Parasitol.*, **177**, 301-308.
139. PABON M., LOPEZ-GATIUS F., GARCIA-ISPIERTO I., BECH-SABAT G., NOGAREDA C., ALMERIA S. (2007) Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3 years study. *Vet. Parasitol.*, **147**, 40-46.
140. PARADIES P., CAPELLI G., TESTINI G., CANTACESSI C., TREES A.J., OTRANTO D. (2007) Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. *Vet. Parasitol.*, **145**, 240-244.
141. PETERS M., LUTKEFELS E., HECKEROTH A.R., SCHARES G. (2001) Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 144–1148.
142. PETERS M., WOLHSEIN P., KNIERIEM A., SCHARES G. (2001) *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*) *Vet. Parasitol* , **97**, 153–157.
143. PINHEIRO A.M., COSTA M.F., PAULE B., VALE V., RIBEIRO M., NASCIMENTO A. *et al.* (2005) Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. *Vet. Parasitol.*, **130**, 73-79.
144. PITEL P.H., PRONOST S., HARY C., LEGENDRE M.F., BALLEST J.J., FORTIER G. (2001) Diagnostic de la néosporose bovine. In : *Comptes rendus de la Journée Bovine Nantaise*. Nantes, 11 octobre 2001, 1-7.

145. PITEL P.H., PRONOST S., ROMAND S., THULLIEZ P., FORTIER G., BALLET J.J. (2001) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France. *Equine Vet.*, **31**, 205-207.
146. PITEL P.H., ROMAND S., PRONOST S., FOUCHER N., GARGALA G., MAILLARD K. *et al.* (2003) Investigation of *Neospora sp.* antibodies in aborted mares from Normandy, France. *Vet. Parasitol.*, **118**, 1-6.
147. PLUYE A. (1999) Un cas de néosporose chez un chiot. *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.*, **34**, 597-602.
148. PRONOST S., PITEL P-H., ROMAND S., THULLIEZ P., COLLOBERT C., FORTIER G. (1999) *Neospora caninum*: Première mise en évidence en France sur un avorton équin. Analyse et perspectives. *Prat. Vet. Equine.*, **31**, 31-34.
149. QUINN H.E., MILLER C.M.D., ELLIS J.T. (2004) The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. *Vet. Parasitol.*, **34**, 723-732.
150. QUINTANILLA-GOZALO A.J., PEREIRA-BUENO J., SEIJAS-CABALLEDO A., COSTAS E., ORTEGA-MORA L.M. (2000) Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int. J. Parasitol.*, **30**, 900-906.
151. RAMAMOORTHY S., DUNCAN R., LINDSAY D.S., SRIRANGANATHAN N. (2007) Optimization of the use of C57BL/6 mice as a laboratory animal model for *Neospora caninum* vaccine studies. *Vet. Parasitol.*, **145**, 253-259.
152. RAMAMOORTHY S., SANAKKAYALA N., VEMULAPALLI R., DUNCAN R.B., LINDSAY D.S., SCHURIG G.S., *et al.* (2007) Prevention of lethal experimental infection of C57BL/6 mice by vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *Neospora caninum* antigens. *Int. J. Parasitol.*, **37**, 1521-1529.
153. RETTIGNER C., LECLIPTEUX T., DE MEERSCHMAN F., FOCANT C., LOSSON B. (2004) Survival, immune responses and tissue cyst production in outbred (Swiss white) and inbred (CBA/Ca) strains of mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Vet. Res.*, **35**, 225-232.
154. RODRIGUES A., GENNARI S.M., AGUIAR D.M., SREEKUMAR C., HILL D.E., MISKA K.B. (2004) Shedding of *Neospora caninum* oocyst by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalu bubali*) from Brazil. *Vet. Parasitol.*, **124**, 139-150.

155. ROMAND S., THULLIEZ P., DUBEY J.P. (1998) Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol. Res.*, **84**, 50-53.
156. SCHARES G., BARWALD A., STAUBACH C., SONDGEN P., RAUSER M., SCHRODER R., et al. (2002) p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum* –associated bovine abortion. *Vet. Parasitol.*, **106**, 293-305.
157. SCHARES G., HEYDORN A.O., CONRATH F.J., MEHLHORN H. (2001) Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts . *Parasitol. Res.*, **87**, 873-877.
158. SCHARES G., PANTCHEV N., BARUTZKI D., HEYDORN A.O., BAUER C., CONRATH F.J. (2005) Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *Int. J. Parasitol.*, **35**, 1525-1537.
159. SCHARES G., PETERS M., WURMS R., BÄRWALD A., CONRATHS F.J. (1998) The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques, *Vet. Parasitol.*, **80**, 87-98.
160. SCHLAFER D.H. (2008) Canine and feline abortion diagnostics. *Theriogenology*, **70**, 327-331.
161. SERRANO-MARTINEZ E., COLLANTES-FERNANDEZ E., CHAVEZ-VELASQUEZ A., RODRIGUES-BERTOS A., CASAS-ASTOS E., RISCO-CASTILLO V. et al. (2007) Evaluation of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in alpaca (*Vicuugna pacos*) and llama (*Lama glama*) aborted foetuses from Peru. *Vet. Parasitol.*, **150**, 39-45.
162. SERRANO-MARTINEZ E., FERRE I., OSORO K., ADRIZ G., MOTA R.A., MARINEZ A. et al. (2007) Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology*, **67**, 729-737.
163. SILVA D.A.O., LOBATO J., MINEO T.W.P., MINEO J.R. (2007) Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.*, **143**, 234–244.

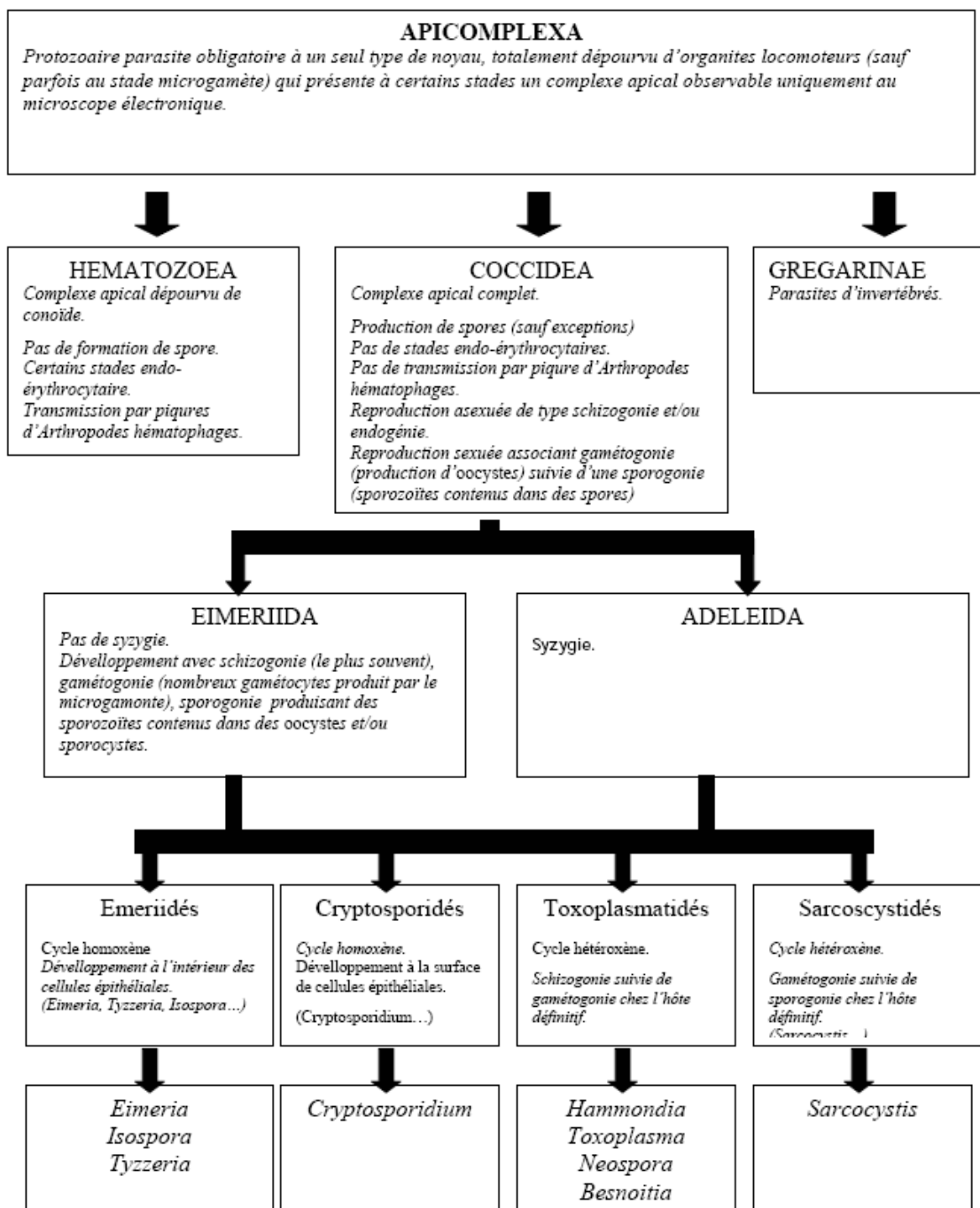
164. SLAPETA J.R., MODRY D., KYSELOVA I., HOREJS R., LUKES J., KOUDELA B. (2002) Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet. Parasitol.*, **143**, 157-167.
165. SOLDATI S., KIUPEL M., WISE A., MAES R., BOTTERON C., ROBERT N. (2004) Meningoencephalomyelitis caused by *Neospora caninum* in a juvenile fallow deer (*Dama dama*). *J Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, **51**, 280-283.
166. SPEER C.A., DUBEY J.P., MCALLISTER M.M., BLIXT J.A. (1999) Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **29**, 1509-1519.
167. THILSTEAD J.P., DUBEY J.P. (1989) Neosporosis-like abortion in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **1**, 295-209.
168. THORNTON R.N., GAJADHAR A., EVANS J. (1994) Neospora abortion in a dairy herd. *N.Z. Vet. J.*, **42**, 190-191.
169. THURMOND M.C., HIETALA S.K., BLANCHARD P.C. (1997) Herd based diagnosis of *Neospora caninum* –induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 44-49.
170. THURMOND M.C., SHARON K.H. (1997) Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am. J. Vet. Rec.*, **58** (12), 1381-1385.
171. TREES A.J., DAVIDSON H.C., INNES E.A., WASTLING J.M. (1999) Toward evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, **29**, 1195-1200.
172. TREES A.J., MCALLISTER M.M., GUY C.S., MCGARRY J.W., SMITH R.F., WILLIAMS D.J.L. (2002) *Neospora caninum* : oocyst challenge of pregnant cows . *Vet. Parasitol.*, **109**, 147-154.
173. TREES A.J., WILLIAMS D.J.L. (2005) Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitol.*, **21** (12), 558-561.
174. UGGLA A., STENLUND S., HOLMDAHL O.J.M., JAKUBEK E.B., THEBO P., KINDHAL H., *et al.* (1998) Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1467-1472.
175. UZEDA R.S., COSTA K.D.S., SANTOS S.L., PINHEIRO A.M., DE ALMEIDA M.A.O., MC ALLISTER M.M., *et al.* (2007) Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. *Korean Journal for Parasitology*, **45**, 295-299.

176. UZEDA R.S., PINHEIRO A.M., FERNANDEZ S.Y., AYRES M.C.C., GONDIM L.F.P., *et al.* (2007) Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. *Small Ruminant Research*, **70**, 257-259.
177. VARDELEON D., MARSH A.E., THORNE J.G., LOCH W., YOUNG R., JOHNSON P.J. (2001) Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. *Vet. Parasitol.*, **95**, 273-282.
178. VILLALOBOS E.M.C., UENO T.E.H., DE SOUZA S.L.P., CUNHA E.M.S., LARA M.C.C.S.H., GENNARI S.M., SOARES R.M. (2006) Association between the presence of serum antibodies against *Neospora* sp. and fetal loss in equines. *Vet. Parasitol.*, **142**, 372-375.
179. VON BLUMRODER D., SCHARES G., WILLIAMS D.J.L., ESTEBAN REDONDO I., WRIGHT S., BJORKMAN C., *et al* (2004) Comparison and standardisation of serological methods for the diagnostics of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet. Parasitol.*, **120**, 11-22.
180. WALSH C.P., DUNCAN R.B., ZAJAC A.M., BLAGBURN B.L., LINDSAY D.S. (2000) *Neospora hughesi*: experimental infections in mice, gerbils and dogs. *Vet. Parasitol.*, **92**, 119-128.
181. WAPENAAR W., BARKEMA H.W., VANLEUWEN J.A., MCCLURE J.T., O'HANDLEY R.M., KWOK O.C.H., *et al.* (2007) Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet Parasitol.*, **143**, 166-173.
182. WEST D.M., POMROY W.E., COLLET M.G., HILL F.I., RIDLER A.L., KENYON P.R., *et al.* (2006) A possible role for *Neospora caninum* in ovine abortion in New Zealand. *Small Ruminant Research*, **62**, 135-138.
183. WILLIAMS D.J., GUY C.S., MCGARRY J.W., TASKER L., SMITH R.F. MACEACHERN K. *et al.* (2000) *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitol.*, **121**, 347-358.
184. WOUDA W., BARTELS J.M., MOEN A.R. (1999) Characteristics of *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, **52**, 233-245.
185. WOUDA W., DIJKSTRA T., KRAMER A.M.H., VAN MAANEN C., BRINKHOF J.M. A. (1999) Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* **29**, 1677-1682.

186. WOUDA W., MOEN A.R., SHUKKEN Y.H. (1998) Abortion in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology*, **49**, 1311-1316.
187. YAEGER M.J., SHAWD-WESSELS S., LESLIE-STEEN P. (1994) *Neospora* abortion storm in a Midwestern dairy. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 506-508.

Annexe 1 : Classification simplifiée de l'embranchement des sporozoaires d'intérêt vétérinaire

D'après Bussieras et Chermette, repris de Leleu (101)



Annexe 2 : Tests de dépistage sérologique de *Neospora caninum* disponibles dans le commerce

D'après Dubey et Schares (137)

Test	Type de réaction	Préparation d'antigène	Commercialisation
BIOVET <i>Neospora caninum</i>	ELISA Indirect	Lysat de tachyzoïtes (Ultrasons)	BIOVET laboratories, Canada
CHEKIT <i>Neospora</i> IDEXX	ELISA Indirect	Lysat de tachyzoïtes (détergent)	IDEXX laboratories, Pays-Bas
CIVTEST BOVIS <i>NEOSPORA</i>	ELISA Indirect	Lysat de tachyzoïtes (Ultrasons)	HIPRA, Espagne
Cypress Diagnostics C.V. <i>Neospora caninum</i>	ELISA Indirect	Lysat de tachyzoïtes (détergent)	Cypress Diagnostics, Belgique
HerdCheck IDEXX	ELISA Indirect	Lysat de tachyzoïtes (Ultrasons)	IDEXX laboratories, Etats-Unis
MASTAZYME <i>Neospora</i>	ELISA Indirect	Paroi de tachyzoïte	MAST GROUP, Royaume-Uni
<i>Neospora caninum</i> Blocking ELISA	ELISA compétitif	Pas d'information	Insitut Pourquier, France
P38-ELISA	ELISA Indirect	Antigène de surface de haute affinité purifié (NcSRS2)	AFOSA GmbH, Allemagne
ImmunoComp bovine <i>Neospora</i> antibody	DOT-ELISA	Pas d'information	Biogal, Israël
SVANOVIR <i>Neospora</i> -Ab ELISA	ELISA Indirect	Antigène incorporé dans un ISCOM	SVANOVA Biotech AB, Suède
VMRD <i>Neospora caninum</i> cELISA	ELISA compétitif	Antigène de surface GP65 du tachyzoïte	VMRD, Etats-Unis
VMRD <i>Neospora caninum</i> FA substrate slide	IFAT	Paroi de tachyzoïte	VMRD, Etats-Unis

Annexe 3 : Test de dépistage ELISA (MAST Diagnostics)



MAST DIAGNOSTIC



MASTAZYME™ NEOSPORA

Test ELISA pour la détection des IgG anti-Neospora dans le sérum bovin.

Introduction

Neospora est un parasite protozoaire (1) qui est désormais reconnu comme l'agent majeur de l'avortement par infection dans l'élevage laitier au niveau mondial (2). C'est le micro-organisme le plus fréquemment responsable d'avortements dans le cheptel laitier en Grande Bretagne (3,4,5). Les avortements semblent apparaître de façon isolés ou bien sous forme d'épidémie dans les troupeaux affectés (C).

La prévalence des anticorps anti-Neospora chez un troupeau normal (sain) est de 1 à 3 % en Grande Bretagne (3). Parmi tous les avortements en Grande Bretagne, il est estimé que 4 à 10 % d'entre eux sont associés à une infection à Neospora. (3,4,5).

La biologie, la structure et le taux d'ADN de *Toxoplasma gondii* est très proche de Neospora. (10,11,12). Le cycle complet de Neospora n'est pas encore connu. A ce jour, les seuls stades du cycle de Neospora qui ont été décrits sont ceux des tachyzoïtes et des kystes de tissus et la seule voie de transmission est verticale (de la vache au veau.) A cause de sa similitude avec *T. gondii* on pense que Neospora pourrait avoir un hôte définitif carnivore qui excrète des oocystes dans l'environnement. Cependant aucun hôte définitif n'a encore été décrit. Neospora diffère de *T. gondii* sur un point important : une vache infectée peut transmettre l'infection à toute sa progéniture et un certain nombre d'entre elles font des avortements répétés. C'est pourquoi Neospora est d'une grande importance pour l'industrie laitière et un diagnostic fiable de l'infection est fondamental. Une infection à Neospora sur des foetus avortés ne peut être définitivement diagnostiquée qu'à l'issue d'un test immunocytochimique sur les tissus foetaux en utilisant des anticorps spécifiques du parasite (4). Il existe, une bonne corrélation entre les foetus qui sont positifs pour Neospora par immunocytochimie et la sérologie positive de la vache par immunofluorescence indirecte (IFI) à partir de sérums dilués au 1/640 ième ou plus (5,9).

Mastazyme™ NEOSPORA est un test ELISA pour la détection des IgG dirigés

spécifiquement contre les antigènes Neospora dans le sérum bovin. Le test a été développé en collaboration avec le Département de Parasitologie Vétérinaire de l'Ecole de Médecine Tropicale de Liverpool. Le test a une sensibilité de 95 % et une spécificité de 96 % par rapport à l'immunofluorescence indirecte.(8)

Principe du test

Le sérum bovin dilué est incubé dans les puits sensibilisés avec les tachyzoïtes de *Neospora caninum* (NC-LIV) (7). Au cours de l'incubation, tous les anticorps spécifiques de Neospora forment un complexe avec les tachyzoïtes immobilisés. Après lavage, pour éliminer le matériel en excès, un anticorps monoclonal de souris purifié par chromatographie d'affinité et conjugué à la peroxydase du raifort est ajouté dans les puits. Après l'incubation, les puits sont lavés pour éliminer le matériel en excès. Les complexes enzymatiques sont détectés par ajout de peroxyde d'hydrogène et du substrat chromogénique 33', 5,5' tétraméthylbenzidine (TMB). Au cours de l'incubation, les complexes présents réagissent avec le substrat en donnant une coloration bleue. La réaction est stoppée par ajout d'acide avec un virage de la coloration du bleu au jaune. L'intensité de coloration mesurée par un lecteur de microplaque spectrophotométrique est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps IgG spécifique de Neospora, présents dans l'échantillon.

Procédure

1. Diluer le tampon de lavage concentré au 1/10ème.
2. Diluer les échantillons de sérums à tester et les sérums de contrôle au 1/400 ème dans le diluant d'échantillon.
3. Distribuer 100 µl de diluants d'échantillon dans les puits A1, A2, B1 et B2. Distribuer 100 µl de contrôle négatif dans les puits C1 et C2.



- Distribuer 100 µl de contrôle positif dans les puits D1 et D2.
Distribuer 100 µl de contrôle positif fort dans les puits E1, E2, F1 et F2.
Distribuer 100 µl d'échantillon à tester dilué dans les puits suivants.
- Recouvrir la microplaque et incuber à 37 °C pendant 30 minutes
 - Diluer le conjugué concentré au 1/1000 ème dans le diluant pour conjugué.
 - Laver 3 fois les puits à l'aide du tampon de lavage préparé.
 - Distribuer 100 µl de conjugué dilué dans tous les puits à l'exception des puits A1 et A2. Distribuer 100 µl de diluant d'échantillon dans les puits A1 et A2.
 - Recouvrir la microplaque et incuber à 37°C pendant 30 minutes.
 - Préparer la solution de substrat en diluant à volume égal la solution A de TMB et la solution B de TMB.
 - Laver les puits trois fois à l'aide de la solution de lavage dilué.
 - Distribuer 100 µl de solution de substrat TMB dans tous les puits.
 - Incuber à température ambiante (18-25°C) pendant 10 minutes.
 - Distribuer 100 µl de solution d'arrêt dans tous les puits et agiter la microplaque pour une bonne homogénéisation de la phase.
 - Lire la microplaque à 450 nm dans les 30 minutes après l'arrêt de la réaction.

Validation et interprétation des résultats

1. Validation

Les valeurs attendues de DO pour les des contrôles sont les suivantes.

Contrôle	DO attendues
B1	≤ 0,047 - 0,077
CC	0,000 - 0,049
C-	0,038 - 0,117
C+	0,360 - 0,583
C++	0,741 - 1,322

2. Calcul et Interprétation des résultats

Les DO exprimées en pourcentage du contrôle positif fort (C++) correspondent au Pourcentage de Positivité (PP).

1. Calcul du PP de chaque échantillon

- Eliminer les valeurs faibles et élevées du contrôle positif fort (C++)
- Calculer le PP selon la formule suivante :

$$PP = \frac{DO \text{ de l'échantillon}}{DO \text{ moyenne de C++}} \times 100$$

2. Interprétation des résultats

PP > 25% : résultat positif

PP < 20% : résultat négatif

20% < PP < 25% : résultat douteux

Limites de la méthode

- Les résultats du test doivent être interprétés en fonction des autres données cliniques.
- Le taux d'anticorps Ig G anti-Neospora peut varier en fonction du cycle de reproduction et de l'âge de la vache. Il est recommandé que les sérums soit prélevés le plus tôt possible du moment de l'avortement.
- Une élévation du titre d'anticorps n'est pas significative d'une infection du cheptel par Neospora. De ce fait des prélèvements répétés sur de courtes périodes ne sont pas indiqués.

Conservation

Le coffret MASTAZYME™ NEOSPORA doit être stocké à 2-8 °C et peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret. La solution de lavage diluée se conserve cinq jours à température ambiante ou deux semaines à 2- 8 ° C. Ne pas congeler les réactifs.

Conditionnement

MASTAZYME™ NEOSPORA

Microplaque de 96 puits Code EIA1001
Microplaque de 12 x 8 puits Code EIA1002



MAST DIAGNOSTIC



Références

List No. 45, Int J Syst Bacteriol. 1993; 43: 398-399

Gilligan PH, Schidlow DV. The role of *Pseudomonas cepacia* in pulmonary disease of cystic fibrosis patients. Clin Microbiol News. 1984; 6: 42-44.

Carson LA, Favero MS, Bond WW, Petersen NJ. Morphological, biochemical and growth characteristics of *Pseudomonas cepacia* from distilled water. Appl Microbiol. 1973; 25: 476-483.

Gold R, Jin E, Levison H, Isles A, Fleming PC. Ceftazidime alone and in combination in patients with cystic fibrosis: lack of efficacy in treatment of severe respiratory infections caused by *Pseudomonas cepacia*. J Antimicrob Chemother. 1983; 12: 331-336.

Gilligan PH, Gage PA, Bradshaw LM, Schidlow DV, DeCicco BT. Isolation medium for the recovery of *Pseudomonas cepacia* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1985; 22: 5-8.

Pitt TL and Govan JRW. *Pseudomonas cepacia* and cystic fibrosis. PHLS Microbiology Digest. 1993; 10: 69-72

Fabriqué par : MAST DIAGNOSTICS - UK

Distribué par : MAST DIAGNOSTIC
115 rue Jules Barni
80000 AMIENS
Tél : 03 22 80 80 67
Fax : 03 22 80 99 22

JCB. version 01/27/06/97

Annexe 4 : Test de dépistage ELISA (IDDEX)

Neospora caninum Antibody Test Kit

Antistoftestkit voor *Neospora caninum*

Kit de détection des anticorps anti-*Neospora caninum*

Kit para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*

Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen *Neospora caninum*

Die deutsche Fassung der Gebrauchsinformation
ist entsprechend §17c TierStG zugelassen

Kit di rilevazione degli anticorpi contro la *Neospora caninum*

Herdchek®
IDEXX

Kit de détection des anticorps anti-*Neospora caninum*

Définition et application

HerdChek® anti-*Neospora* est le nom déposé par IDEXX d'un kit de dosage immuno-enzymatique destiné à la détection des anticorps anti-*Neospora caninum* dans le sérum bovin.

Information générale

Neospora caninum est un parasite protozoaire (Apicomplexan) récemment découvert, pouvant provoquer l'avortement, ainsi que la morbidité et la mortalité néonatales chez les bovins, ovins, caprins et équins.⁽¹⁾ On a constaté qu'en Californie (USA), l'infection par le *Neospora* constituait la cause la plus fréquemment diagnostiquée d'avortement chez les vaches laitières.^(2,3,4) On a constaté également dans d'autres pays que les États-Unis que la néosporose était une cause d'avortement.^(5,6,7) A l'heure actuelle, on ne connaît pas encore le mode de contamination de cet organisme dans les troupeaux et on ne sait s'il peut se transmettre d'un animal à un autre autrement que congénitalement.⁽⁸⁾

Un test ELISA a été mis au point pour le diagnostic sérologique de l'infection par le *Neospora* chez les bovins, ce qui peut se révéler utile pour les études épidémiologiques ou pour les mesures de contrôle et de traitement destinées à enrayer l'infection par le *Neospora* dans un troupeau. Puisqu'il est nécessaire d'isoler l'organisme pour établir un diagnostic définitif, le statut sérologique d'un animal ne constitue qu'un des nombreux critères devant être pris en compte dans le traitement global du troupeau.

Réactifs

Conserver tous les réactifs à 2° - 7°C.
Réservé à l'usage vétérinaire.

Volume

A. 2 Plaques sensibilisées avec l'antigène de *Neospora*. Incinérer le récipient et tous les composants non utilisés.

- | | |
|---|--------|
| C. Conjugué anti-bovin:
peroxydase de raifort (HRPO) | 30 ml |
| D. Contrôle Positif <i>Neospora</i> .
Sérum bovin anti- <i>Neospora</i> dilué
dans un tampon avec stabilisateurs de
protéines. Conservateur : azide de sodium. | 3 ml |
| E. Contrôle Négatif <i>Neospora</i> .
Sérum bovin ne réagissant pas avec
<i>Neospora</i> , dilué dans un tampon
phosphate avec stabilisateurs de protéines.
Conservateur : azide de sodium. | 3 ml |
| F. Diluant des Échantillons
Tampons avec stabilisateurs de protéines.
Conservateur : azide de sodium. | 250 ml |
| G. Solution de lavage, concentrée
10 fois : tampon phosphate/Tween.
Conservateur : gentamicine. | 250 ml |
| H. Substrat TMB | 60 ml |
| I. Solution d'arrêt
Acide fluorhydrique dilué (0,125 %) | 60 ml |

Description et principes

HerdChek anti-*Neospora* est un kit de dosage immuno-enzymatique destiné à détecter la présence d'anticorps anti-*Neospora* dans le sérum bovin. Il se présente sous la forme de 2 plaques de 96 cupules sensibilisées avec des antigènes de *Neospora*. Lors de l'incubation de l'échantillon à tester dans la cupule sensibilisée, les anticorps anti-*Neospora* forment des complexes Ag-Ac avec les antigènes fixés. Après avoir éliminé des cupules le matériel non lié par lavage, on ajoute un conjugué (sérum anti-bovin marqué à la peroxydase de raifort) qui se lie aux anticorps anti-*Neospora* bovin fixé dans les cupules. Au stade final du dosage, le conjugué non lié est éliminé par lavage, puis un substrat enzymatique (peroxyde d'hydrogène) et un chromogène 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine sont ajoutés aux cupules. La coloration qui en résulte est la proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon testé.

Matériel nécessaire mais non fourni

1. Pipettes de précision, capables de distribuer 5 µl, 100 µl et 500 µl ou des systèmes de pipettes multicanaux.
2. Embouts de pipette à usage unique.
3. Epruvette graduée : 500 ml pour la solution de lavage.
4. Lecteur de plaques à 96 cupules.
5. Tubes en verre ou en matière plastique pour la dilution des échantillons.
6. Eau distillée ou désionisée.
7. Système de lavage manuel, semi-automatique ou automatique.

Avertissements et précautions d'emploi

1. Bien que l'antigène ait été inactivé, manipuler tous les réactifs biologiques *Neospora* comme pouvant transmettre le *Neospora*.
2. Ne pas pipetter à la bouche.
3. Ne pas manger ni boire, ni fumer durant la manipulation des échantillons ou des réactifs du kit.
4. Le substrat TMB et les solutions acides peuvent être irritants pour la peau.
5. Certains composants du kit contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Prendre les précautions nécessaires pour éviter la contamination du conjugué anti-bovin:HRPO par ce conservateur.
6. Ne pas exposer la solution TMB à la lumière intense ou à des agents oxydants. N'utiliser que du matériel en verre ou en plastique propre pour la manipulation du substrat TMB.
7. Conserver tous les réactifs à 2° - 7°C. Amener à la température ambiante 15° - 30°C avant l'emploi et ramener à 2° - 7°C après utilisation.
8. Tous les déchets doivent être convenablement décontaminés avant élimination.
9. Prendre les précautions nécessaires pour éviter contamination des composants du kit.
10. Ne pas utiliser les composants au delà de la date de péremption et ne pas intervertir les composants issus de lots différents.
11. On obtiendra des résultats optimaux en respectant strictement ce protocole. Effectuer un pipetage, un minutage et un lavage soigneux tout au long de cette procédure de façon à maintenir la précision et l'exactitude du test.

Préparation des échantillons

Diluer les échantillons à tester cent fois (1:100) avec le diluant pour échantillon (ex. : diluer 5 µl d'échantillon avec 500 µl de diluant des échantillons). REMARQUE : ne pas diluer les contrôles.

Veiller à changer les embouts de pipettes pour chaque échantillon et à enregistrer la position de chaque échantillon sur la plaque en utilisant un plan de plaque HerdChek. Homogénéiser les échantillons avant leur distribution dans la plaque sensibilisée *Neospora*.

Préparation de la solution de lavage

La solution de lavage concentrée doit être amenée à la température ambiante et homogénéisée de façon à assurer la dissolution de tout sel précipité. La solution de lavage concentrée doit être diluée 10 fois avec de l'eau distillée/désionisée avant l'emploi (ex. : 30 ml de solution concentrée pour 270 ml d'eau par plaque à tester).

Mode opératoire

Tous les réactifs doivent être amenés à la température ambiante avant l'emploi. Homogénéiser les réactifs par agitation modérée ou au vortex.

1. Réserver la (les) plaque(s) sensibilisée(s) et enregistrer la position de chaque échantillon en utilisant un plan de plaque HerdChek.
2. Distribuer 100 µl de contrôle négatif NON DILUE dans les cupules A1 et A2.
3. Distribuer 100 µl de contrôle positif NON DILUE dans les cupules A3 et A4.
4. Distribuer 100 µl d'échantillon DILUE dans les cupules appropriées. Tous les échantillons doivent être testés en doubles exemplaires.
5. Laisser incubé 30 minutes à la température ambiante.
6. Aspirer le liquide de chaque cupule dans le réservoir à déchets approprié.
7. Laver chaque cupule quatre fois avec environ 300 µl de solution de lavage tamponnée au phosphate. Aspirer le liquide de chaque cupule après chaque lavage. Eviter la dessiccation des plaques entre les lavages et avant l'ajout du conjugué. Après aspiration du dernier liquide de lavage, tapoter doucement mais

fermement chaque plaque sur du papier absorbant de façon à éliminer la solution de lavage résiduelle.

8. Distribuer 100 µl de conjugué anti-bovin:HRPO dans chaque cupule.
9. Laisser incubé 30 minutes à la température ambiante.
10. Répéter les étapes 6 et 7.
11. Distribuer 100 µl de solution de substrat TMB dans chaque cupule des plaques à tester.
12. Laisser incubé 15 minutes à la température ambiante.
13. Distribuer 100 µl de solution d'arrêt dans chaque cupule des plaques à tester pour arrêter la réaction.
14. Faire le blanc de du spectrophotomètre sur l'air.
15. Mesurer et enregistrer la densité optique à 620 nm, 630 nm ou 650 nm.
16. Calculer les résultats.

Résultats

Pour que le test soit valide, la différence (P - N) entre la moyenne du contrôle positif (PCx) et la moyenne du contrôle négatif (NCx) doit être supérieure ou égale à 0,150. En outre, NCx doit être inférieure ou égale à 0,20.

En cas de résultats non valides, refaire le test en respectant attentivement le protocole indiqué dans la notice.

La présence ou l'absence d'anticorps anti-*Neospora* est déterminée en calculant le rapport Echantillon/Positif (E/P) pour chaque échantillon. Le contrôle positif a été étalonné et correspond à un taux significatif d'anticorps anti-*Neospora* dans le sérum bovin.

Voir le paragraphe CALCUL DES RESULTATS pour obtenir des exemples.

REMARQUE : IDEXX Laboratories, Inc. dispose d'instruments et de logiciels capables de calculer les moyennes et les rapports E/P, et de fournir le rapport des données.

Interprétation des résultats

1. Si le rapport E/P de l'échantillon de sérum est inférieur à 0,50, l'échantillon est classé comme NEGATIF pour les anticorps anti-*Neospora*.

2. Si le rapport E/P est supérieur ou égal à 0,50, l'échantillon est classé comme POSITIF pour les anticorps anti-*Neospora*.

Calcul des résultats

1. Calcul de la moyenne du contrôle négatif (NCx)

$$NCx = \frac{D.O.(650) A1 + D.O.(650) A2}{2}$$

$$\text{Exemple : } \frac{0,080 + 0,090}{2} = 0,085$$

2. Calcul de la moyenne du contrôle positif (PCx)

$$PCx = \frac{D.O.(650) A3 + D.O.(650) A4}{2}$$

$$\text{Exemple : } \frac{0,510 + 0,500}{2} = 0,505$$

3. Calcul du rapport E/P

$$E/P = \frac{D.O.(650) \text{ échantillon} - NCx}{PCx - NCx}$$

$$\text{Exemple : Moyenne des échantillons} = 0,450$$

$$E/P = \frac{0,450 - 0,085}{0,505 - 0,085} = 0,87$$

Bibliographie

1. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1993. Neosporosis. *Parasitology Today*, 8:452-458.
2. Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B.C. et al. 1991. Neospora-like Protozoan Infection as a Major Cause of Abortion in California Dairy Cattle. *Jnl. Amer. Vet. Med. Assoc.* 198:241-244.
3. Anderson, M.L., Palmer, C.W., Thurmond, M.C. et al. 1995. Evaluation of Abortions in Cattle Attributable to Neosporosis in selected Dairy Herds in California. *Jnl. Amer. Vet. Med. Assoc.* 207:1208-1210.
4. Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1996. Congenital Neospora caninum Infection in Dairy Cattle and Associated Calving Mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 80:133-139.
5. Thornton, R.N., Thompson, E.J., Dubey, J.P. 1991. Neospora abortion in New Zealand Cattle. *New Zealand Vet. Jnl.* 39:129-133.
6. Ogino H., Watanabe, E., Watanabe, S. 1992. Neosporosis in the Aborted Fetus and Newborn Calf. *Jnl. Comp. Pathol.* 107:231-237.
7. Jardine, J.E., Last, R.D., 1993. Neospora caninum in Aborted Twin calves. *Jnl. South African Vet. Assoc.* 54:101-102.
8. Holmdahl, O.J.M., Björkman, C., Uggla, A. 1995. A case of Neospora Associated Bovine Abortion in Sweden. *ACTA Vet. Scand.* 36:279-281.

Annexe 5 : Test de dépistage par agglutination directe (Vétoquinol)

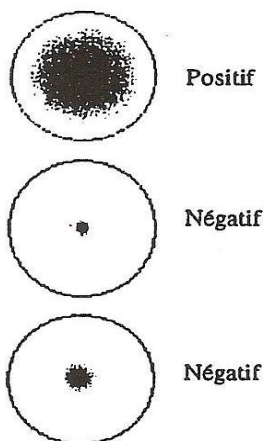
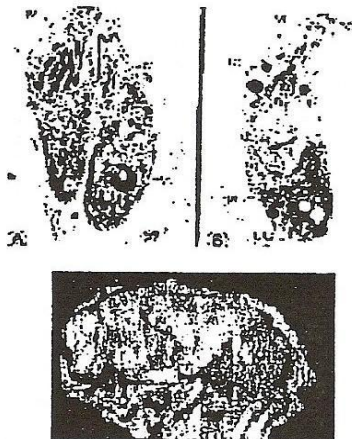


Neospora caninum – test sérologique

Des infections à *Neospora caninum* ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces animales. Elles sont une cause importante d'avortements, de morbidité et de mortalité néonatale chez les bovins, ovins, canins, caprins et équins.

Neospora caninum est un protozoaire qui a été isolé et identifié par Dubey et coll. en 1988. Ce parasite est morphologiquement proche de *Toxoplasma*. A l'heure actuelle, le cycle parasitaire demeure largement inconnu, le seul mode d'infestation connu est la voie transplacentaire, à l'origine d'infections congénitales.

VETOQUINOL a développé un test d'agglutination direct pour la détection des IgG spécifiques de l'antigène *Neospora* dans le sérum de différentes espèces animales.



Principe du test :

Les réactions d'agglutination sont réalisées dans des microplaques de 96 puits à fond rond. 50 µl de quatre dilutions séquentielles de raison 2 (1/40, 1/80, 1/160, 1/320) de chaque sérum à analyser sont mises en présence de 50 µl de suspension antigénique *Neospora caninum*. Les plaques sont agitées brièvement et mises à incuber à 30 °C pendant une nuit. La présence d'anticorps sériques entraîne la formation d'une agglutination parasitaire en voile, macroscopiquement visible dans les microcupules. L'absence d'anticorps se traduit par une sédimentation en bouton des parasites au fond des microcupules.

L'interprétation de la réaction est :

- Qualitative : présence ou absence de voile d'agglutination
- Quantitative : titration par dilutions séquentielles : le titre est donné par la dernière dilution du sérum donnant une agglutination des parasites.

Précautions d'utilisation :

Ce test ne peut être utilisé que pour un diagnostic "in vitro". Il est à usage vétérinaire exclusivement.

Les réactifs doivent être conservés entre 2°C et 8°C.

Les réactifs ne peuvent être garantis si leur date de péremption est dépassée ou s'ils n'ont pas été conservés dans les conditions recommandées.

Porter les réactifs à température ambiante au moins une demi-heure avant de mettre en oeuvre les réactions.

Le 2 - mercaptoethanol est à manipuler avec précaution.

Ne pas prélever les réactifs à la pipette avec la bouche.

Manipuler les échantillons à tester comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des maladies.

Vétoquinol

Protocole d'utilisation

Amener les réactifs à température ambiante au moins une demi-heure avant la mise en œuvre de la trousse.

Bien homogénéiser la suspension antigénique, soit en vortexant soit par retournement du flacon, avant de procéder à la dilution. Préparer l'antigène Neospora en diluant la suspension concentrée dans le tampon de dilution de l'antigène, le facteur de dilution figure sur le certificat de contrôle de qualité. On diluera la quantité nécessaire d'antigène pour la manipulation (compter 210 µl d'antigène prêt à l'emploi par sérum et prévoir 420 µl d'antigène pour le contrôle positif et le contrôle négatif). L'antigène dilué peut être conservé environ 3 mois à 4°C.

Préparation du tampon de dilution des échantillons :

Dans le flacon de 15 ml de tampon de dilution des échantillons, ajouter 210 µl de 2-mercaptoéthanol fourni dans la trousse. Homogénéiser la solution. Cette solution est stable pendant 6 semaines environ à 4°C.

Dilution des sérums : les sérums sont traités en ligne dans la microplaque.

Contrôle Négatif :

Déposer dans les cupules A1 et A2 50 µl de tampon de dilution des échantillons.

Contrôle Positif :

Déposer dans la cupule B1 100 µl de tampon de dilution des échantillons et dans les cupules B2 à B5 50 µl de ce même tampon. Ajouter 5 µl de Contrôle Positif dans la cupule B1. Bien homogénéiser par pipetage. Le Contrôle Positif est dilué à 1/20 dans le puits B1. Reprendre 50 µl du puits B1 et mettre dans le puits B2. Bien homogénéiser le mélange par pipetage. Refaire cette opération jusqu'au puits B5. Prendre 50 µl dans le puits B5 et les mettre dans le puits B6. Le Contrôle Positif est dilué à 1/40 dans le puits B2, 1/80 dans le puits B3, 1/160 dans le puits B4 et 1/320 dans le puits B5. Le puits B6 ne sera pas utilisé.

Echantillons :

Procéder de la même manière que pour le Contrôle Positif en plaçant les échantillons dans les puits C, D, E etc.

Ajouter 50 µl d'antigène dilué dans les cupules contenant les dilutions au 1/40, 1/80, 1/160 et 1/320 du Contrôle Positif et des échantillons et 50 µl dans les puits A1 et A2 pour le Contrôle Négatif. Mélanger brièvement les dilutions par agitation manuelle ou mécanique de la plaque. Ne pas mélanger par pipetage à refoulement.

Couvrir la plaque et incuber 1 nuit à 30°C.

Lecture et interprétation :

La lecture est réalisée le lendemain à l'œil. L'utilisation d'une source lumineuse est fortement conseillée pour faciliter la lecture des voiles d'agglutination dans les cupules.

Interprétation Qualitative :

Une réaction négative (absence d'anticorps) provoque la sédimentation en bouton des parasites au fond de la microcupule et l'absence de voile d'agglutination.

Une réaction positive (présence d'anticorps) entraîne la formation d'un voile complet d'agglutination des parasites à la surface de toute la cupule. Dans de rares cas, des sérums souillés peuvent donner un bouton de sédimentation accompagné d'un voile d'agglutination, ces sérums seront considérés comme positifs.

Interprétation Quantitative :

Le titre de chaque sérum est donné par la dernière dilution du sérum donnant une réaction positive. Pour les sérums dont le titre est > 1/320, un titre exact peut être calculé en réalisant des dilutions séquentielles de raison 2 à partir d'une dilution au 1/100 de l'échantillon.

Pour les sérums bovins, le seuil de positivité a été fixé au 1/80. Les échantillons de sérums ayant un titre inférieur ou égal à 1/40 sont considérés comme négatifs. Les échantillons ayant un titre égal à 1/80 sont considérés comme douteux et les échantillons ayant un titre supérieur ou égal à 1/160 sont considérés comme positifs.

La mise en évidence d'IgG spécifiques dans un échantillon est le témoin d'une infection à Neospora caninum récente ou ancienne, mais n'est pas prédictive d'un risque significatif chez un animal donné. A l'échelle d'un troupeau, des taux élevés d'anticorps sont significativement corrélés à la survenue d'avortements liés à une infection à Neospora caninum.

TRANSMISSION VERTICALE DE *NEOSPORA* SP. CHEZ LES MAMMIFERES

QUELLES CONSEQUENCES POUR L'ELEVAGE CANIN ?

NOM et Prénom : SARRAZIN Claire

Résumé

Le parasite *Neospora caninum*, protozoaire du phylum des Apicomplexa est un parasite de découverte relativement récente décrit chez de très nombreux mammifères. Sa transmission verticale est à l'origine de troubles de la reproduction sévères et répétés. La pathogénie des avortements à *Neospora caninum*, qui a fait l'objet d'études détaillées chez le bovin, est complexe et peut intervenir après une infection primaire ou plus communément suite à la réactivation du parasite au cours de la gestation chez une femelle infectée chronique.

En dehors des bovins, les troubles de la reproduction liés à *Neospora caninum* ont été décrits chez de nombreux hôtes intermédiaires. Chez le chien, *Neospora caninum* est transmis efficacement à la descendance et des avortements ont été provoqués expérimentalement. Des études supplémentaires sont nécessaires pour savoir si *Neospora caninum* pourrait être un parasite émergent à rechercher lors de troubles de la reproduction en élevage canin.

Mots clés : *NEOSPORA* / *NEOSPORA CANINUM* / *NEOSPORA HUGHESI* / NEOSPOROSE / REPRODUCTION / AVORTEMENT / GESTATION / TRANSMISSION VERTICALE / BOVIN / ELEVAGE CANIN / CHIEN

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Alain Fontbonne

Assesseur : Dr. Bruno Polack

Adresse de l'auteur :
23 rue des bouleaux
51140 Muizon

VERTICAL TRANSMISSION OF *NEOSPORA* SP. IN MAMMALS

WHAT CONSEQUENCES FOR CANINE BREEDING?

SURNAME : SARRAZIN

Given name :Claire

Summary

The parasite *Neospora caninum*, protozoan of Apicomplexa's phylum was recently discovered and has been described in quite many mammals. Its vertical transmission causes serious and repeated problems of reproduction. The pathogenesis of the abortions due to *Neospora caninum*, which was studied in details in cattle, is complex et can follow a primary infection or, more commonly, the recrudescence of the parasite load during the pregnancy in a chronic infected female.

Except from cattle, *Neospora caninum*-related reproduction troubles are described in many intermediate hosts. In dogs, *Neospora caninum* is transmitted efficiently to the descendants and some abortions were experimentally provoked. Additional studies are needed to check whether *Neospora caninum* could be an emergent parasite which has to be searched for when reproduction troubles appears in canine breeding

Keywords: *NEOSPORA* / *NEOSPORA CANINUM* / *NEOSPORA HUGHESI* / NEOSPOROSIS / REPRODUCTION / ABORTION / GESTATION / VERTICAL TRANSMISSION / CATTLE / CANINE BREEDING / DOG

Jury :

President : Pr.

Director : Dr. Alain Fontbonne

Assessor : Dr. Bruno Polack

Author's address:

23, rue des bouleaux

51140 MUIZON