

Année 2007

**CARACTERISATION ET DIVERSITE GENETIQUE
DES EHRLICHIOSES CANINES EN GUADELOUPE**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le

par

Claire, Marie SALADIN

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Melle M. ABITBOL

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Assesseur : M. H.J. BOULOUIS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles

Professeurs honoraires: MM. BORDET Roger, BUSSIERAS Jean, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, THERET Marcel

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur

-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur* M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mlle ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, AERC	- 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 PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur	- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences
-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur * Mme COMBRISON Hélène, Professeur M. TIRET Laurent, Maître de conférences	-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur
-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences	-DISCIPLINE : GENETIQUE MEDICALE ET CLINIQUE Melle ABITBOL Marie, Maître de conférences contractuel
-DISCIPLINE : BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, 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. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjoint : M. POUCHELON Jean-Louis , Professeur

-UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Melle MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel	- 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 Mlle RAVARY Bérangère, AERC (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel
- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur * M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences Mme CARSTANJEN Bianca, Maître de conférences contractuel Mme GIRAUDET Aude, Professeur contractuel Melle VIREVIALLE Hameline, Maître de conférences contractuel	- UNITE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, 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 Melle CONSTANT Fabienne, AERC (rattachée au DPASP) Melle LEDOUX Dorothee, Maître de conférences Contractuel (rattachée au DPASP)	-UNITE D'OPHTALMOLOGIE M. CLERC Bernard, Professeur Melle 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 MARNIGAC Geneviève, Maître de conférences contractuel
	- DISCIPLINE : ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur M. GRANDJEAN Dominique, Professeur Mme BLANCHARD Géraldine, Professeur contractuel

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

Chef du département : M. CERF Olivier, Professeur - Adjoint : M. BOSSE Philippe, Professeur

-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* M. TOMA Bernard, Professeur Mme HADDAD/ H0ANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, 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 D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur M. CERF Olivier, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, 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 M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences
- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences	

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements :

A notre Président de thèse, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Au Docteur Abitbol et au Professeur Boulouis, qui nous ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer notre travail,

Aux Docteurs Lefrançois et Vachiéry, qui m'ont accueillie au sein de leur laboratoire du CIRAD-EMVT Guadeloupe, et qui ont permis l'élaboration de cette thèse,

A toute l'équipe du laboratoire du CIRAD-EMVT Guadeloupe, en particulier à Yane et à Valérie, pour leur disponibilité et leurs conseils,

Aux vétérinaires praticiens de Guadeloupe, et plus particulièrement au Docteur Roy, qui ont rendu cette étude possible,

A ma famille,

A mes amis,

A Marc.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des figures	5
Liste des tableaux	7
Liste des abréviations	9
Introduction	11
<u>Première Partie: Etude bibliographique des ehrlichioses canines</u>	
I.1. Généralités sur les ehrlichioses	15
I.1.1. Les principales ehrlichioses	15
I.1.2. Classification phénotypique des <i>Ehrlichieae</i>	15
I.1.3. Classification phylogénétique des <i>Ehrlichieae</i>	18
I.1.3.1. Groupe 1 ou Groupe Ehrlichia	18
I.1.3.2. Groupe 2 ou Groupe Anaplasma	19
I.1.3.3. Groupe 3 ou Groupe Neorickettsia	19
I.1.3.4. Groupe Wolbachia	20
I.1.4. Caractéristiques phénotypiques des <i>Ehrlichieae</i>	21
I.1.4.1. Morphologie, cycle de développement	21
I.1.4.2. Principaux antigènes, réactions croisées	22
I.1.5. Vecteurs et répartition géographique des ehrlichioses canines	23
I.2. Les ehrlichioses canines	27
I.2.1. L'ehrlichiose monocyttaire canine à <i>Ehrlichia canis</i>	27
I.2.1.1. Etiologie	27
I.2.1.2. Pouvoir immunogène	28
I.2.1.3. Pathogénie	28
I.2.1.3.1. Pathogénie des troubles hématologiques	28
I.2.1.3.2. Pathogénie des troubles biochimiques	30
I.2.1.4. Etude clinique	31
I.2.1.4.1. Phase aigüe	33
I.2.1.4.2. Phase subclinique	37
I.2.1.4.3. Phase chronique	38

I.2.2. L'ehrlichiose à <i>Anaplasma platys</i> ou thrombopénie cyclique infectieuse.....	40
I.2.2.1. Etiologie.....	40
I.2.2.2. Pouvoir antigénique	41
I.2.2.3. Etude clinique	41
I.2.3. Les autres ehrlichioses du Chien.....	43
I.2.3.1. Les ehrlichioses granulocytaires	43
I.2.3.1.1. L'ehrlichiose à <i>Ehrlichia ewingii</i>	43
I.2.3.1.2. L'ehrlichiose à <i>Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum</i>	44
I.2.3.2. Les ehrlichioses non granulocytaires	45
I.2.3.2.1. L'ehrlichiose à <i>Ehrlichia chaffeensis</i>	45
I.2.3.2.2. L'ehrlichiose Sud-Africaine.....	46
I.2.3.2.3. L'ehrlichiose à <i>N. risticii</i> var <i>atypicalis</i>	47
I.2.3.2.4. L'empoisonnement au saumon	47
I.2.4. Les infections multiples	48
I.3. Le diagnostic des ehrlichioses canines	51
I.3.1. Les facteurs de risque.....	51
I.3.1.1. La répartition géographique	51
I.3.1.2. L'incidence saisonnière	51
I.3.1.3. Les facteurs de prédisposition.....	52
I.3.2. Diagnostic différentiel	52
I.3.3. Les examens complémentaires	57
I.3.3.1. Examens réalisables chez le vétérinaire.....	57
I.3.3.1.1. Frottis sanguins	57
I.3.3.1.2. Tests sérologiques rapides	61
I.3.3.2. Examens réalisés au laboratoire.....	61
I.3.3.2.1. Immunofluorescence indirecte (IFI)	61
I.3.3.2.2. Western Blot	63
I.3.3.2.3. Réactions sérologiques croisées et interprétations des tests	64
I.3.3.2.3. Isolement des souches et mise en culture	66
I.3.3.2.4. Diagnostic moléculaire : PCR et séquençage	68
I.4. Le traitement des ehrlichioses canines.....	73
I.4.1. Pronostic	73
I.4.2. Traitement.....	73
I.4.2.1. Antibiothérapie	73

I.4.2.2. Traitements complémentaires	74
I.4.2.3. Suivi du traitement.....	74
I.4.2.3.1. Suivi clinique et hématologique.....	74
I.4.2.3.2. L'électrophorèse des protéines sériques	75
I.4.2.3.3. IFI et PCR	75
I.4.3. Prophylaxie	76
<u>Deuxième Partie: Caractérisation des ehrlichioses canines en Guadeloupe</u>	
II.1. Matériel et méthode	81
II.1.1. Collecte des prélèvements sanguins	81
II.1.2. Analyse moléculaire des échantillons.....	82
II.1.2.1. Extraction de l'ADN des échantillons sanguins	82
II.1.2.1.1. Protocole	82
II.1.2.1.2. Quantification de l'ADN par électrophorèse.....	82
II.1.2.2. Les méthodes de PCR.....	83
II.1.2.2.1. Principe général	83
II.1.2.2.2. Détection d' <i>Ehrlichia spp.</i> par PCR simple	83
II.1.2.2.3. Détection d' <i>E. canis</i> par PCR nichée	85
II.1.2.2.4. Détection d' <i>A.platys</i> par PCR nichée	85
II.1.2.3. Eléctrophorèse des échantillons.....	86
II.1.2.4. Analyse statistique des résultats	86
II.2. Résultats.....	87
II.2.1. Détection d' <i>Ehrlichia spp.</i> par PCR ECC/ECB	87
II.2.2. Mise au point de la PCR EHR16SR/EHR16SD	88
II.2.2.1. Comparaison de la PCR EHR16SR/EHR16SD et de la PCR ECC/ECB.....	88
II.2.2.2. Amélioration de la PCR simple EHR16SR/EHR16SD	88
II.2.3. Détection d' <i>Ehrlichia spp.</i> par PCR EHR16SR/EHR16SD	89
II.2.4. Détection d' <i>Ehrlichia canis</i>	91
II.2.5. Détection d' <i>Anaplasma platys</i>	93
II.2.6. Synthèse des résultats	95
II.2.7. Caractéristiques de la PCR EHR16SR/EHR16SD	98
II.2.8. Répartition des cas positifs en Guadeloupe.....	99
II.2.9. Caractéristiques épidémiologiques des chiens inclus dans l'étude	101
II.2.10. Données cliniques et examens complémentaires.....	102
II.3. Discussion.....	115

II.3.1. Sensibilité et spécificité des méthodes de PCR.....	115
II.3.2. Perspectives de diagnostic.....	116
II.3.3. Répartition des cas positifs en Guadeloupe.....	116
II.3.4. Analyse des commémoratifs.....	117
II.3.4.1. Données épidémiologiques.....	117
II.3.4.2. Données cliniques.....	118
II.3.4.3. Examens complémentaires.....	119
II.3.4.3.1. Hématologie.....	119
II.3.4.3.2. Biochimie.....	120
II.3.4.3.3. Tests sérologiques rapides.....	120
Conclusion.....	123
Bibliographie.....	125
Annexes.....	129

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Classification phénotypique des <i>Ehrlichieae</i> dans l'Ordre des <i>Rickettsiales</i> [27].....	17
<u>Figure 2</u> : Classification phylogénétique des <i>Ehrlichieae</i> sur la base de l'analyse de l'ARNr16S [27].....	21
<u>Figure 3</u> : Evolution clinique de l'ehrlichiose monocyttaire canine [25].....	32
<u>Figure 4</u> : Les principales causes d'épistaxis chez le Chien [14].....	54
<u>Figure 5</u> : Diagnostic différentiel de la pancytopenie chez le Chien [14].....	54
<u>Figure 6</u> : Représentation schématique de deux techniques de leucoconcentration [3].....	60
<u>Figure 7</u> : Principe de l'Immunofluorescence indirecte [23].....	62
<u>Figure 8</u> : Principe du Western Blot [14].....	64
<u>Figure 9</u> : Principe d'une PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Réaction de Polymérisation en chaîne) [23].....	69
<u>Figure 10</u> : Principe de la PCR nichée.....	70
<u>Figure 11</u> : Tacés des électrophorèses des protéines sériques d'un chien atteint d'ehrlichiose réalisées avant et 30 mois après traitement [3].....	75
<u>Figure 12</u> : Photo d'un gel d'agarose ayant permis la vérification de la qualité de l'extraction de l'ADN des échantillons sanguins 1,5,30,31 et 67 à 77.....	83
<u>Figure 13</u> : Photo du gel d'agarose montrant les résultats de la PCR EHR16SR/EHR16SD réalisée sur les échantillons positifs en PCR ECC/ECB 1,3,12,14,16,17,30 et 31.....	88
<u>Figures 14 et 15</u> : Photos des gels d'agarose montrant les résultats de la PCR EHR16SR/EHR16SD réalisée avec de l'ADN pur et de l'ADN dilué au 1/10 ^{ème} (échantillons positifs 3 et 12). Les différentes températures testées ont été 55°C, 57°C et 60°C.....	89
<u>Figure 16</u> : Photo de gel d'agarose montrant les résultats de la PCR nichée permettant la détection d' <i>E.canis</i> sur 13 prélèvements.....	91
<u>Figure 17</u> : Photo de gel d'agarose montrant les résultats de la PCR nichée spécifique d' <i>A.platys</i> pour les prélèvements 67 à 79.....	93
<u>Figure 18</u> : Répartition géographique des prélèvements sanguins et de leurs résultats par clinique d'origine.....	99
<u>Figure 19</u> : Répartition des cas suspects d'ehrlichiose canine par commune.....	100

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Principales ehrlichioses et leur nouvelle nomenclature [27, 40].....	16
<u>Tableau 2</u> : Vecteurs et répartition géographique des ehrlichioses du Chien [1, 19, 20, 27, 30,31, 34, 36, 40].....	25
<u>Tableau 3</u> : Principaux signes cliniques observés lors d’ehrlichiose monocyttaire canine d’après [16, 24, 27, 39, 41].....	34
<u>Tableau 4</u> : Principaux signes hématologiques observés lors d’ehrlichiose monocyttaire canine d’après [16, 24, 27, 39, 41].....	36
<u>Tableau 5</u> : Principaux signes biochimiques observés lors d’ehrlichiose monocyttaire canine d’après [16, 24, 27, 39, 41].....	37
<u>Tableau 6</u> : Diagnostic différentiel de la thrombopénie chez les carnivores domestiques [27].....	53
<u>Tableau 7</u> : Principales affections entrant dans le diagnostic différentiel de l’ehrlichiose monocyttaire canine [27].....	55
<u>Tableau 8</u> : Cellules cibles et morphologie des différentes espèces d’ <i>Ehrlichieae</i> atteignant le Chien [27].....	58
<u>Tableau 9</u> : Principales réactions sérologiques croisées observées entre les <i>Ehrlichieae</i> du Chien [3, 14, 27, 43].....	65
<u>Tableau 10</u> : Culture de quelques <i>Ehrlichieae</i> sur lignées cellulaires [27].....	67
<u>Tableau 11</u> : Détection d’ <i>Ehrlichia spp.</i> par PCR ECC/ECB.....	87
<u>Tableau 12</u> : Résultats de la PCR EHR16SR/EHR16SD (détection d’ <i>Ehrlichia spp.</i>).....	90
<u>Tableau 13</u> : Résultats de la PCR permettant la détection d’ <i>Ehrlichia canis</i>	92
<u>Tableau 14</u> : Résultats de la PCR permettant la détection d’ <i>A. platys</i>	94
<u>Tableau 15</u> : Résultats en PCR des 79 prélèvements.....	95
<u>Tableau 16</u> : Répartition des 79 résultats en PCR simple et en PCR nichées.....	98
<u>Tableau 17</u> : Caractéristiques de la PCR simple EHR16SR/EHR16SD	99
<u>Tableau 18</u> : Présence ou absence de tiques sur les chiens dont le sang a été analysé par PCR.....	101
<u>Tableau 19</u> : Signes cliniques observés chez 69 chiens de l’étude.....	103
<u>Tableau 20</u> : Valeurs de p obtenues pour les différents critères cliniques.....	104
<u>Tableau 21</u> : Résultats en PCR des chiens ayant présenté une épistaxis.....	105
<u>Tableau 22</u> : Données hématologiques recueillies pour 11 chiens positifs en PCR.....	106

<u>Tableau 23</u> : Données hématologiques recueillies pour 13 chiens négatifs en PCR.....	107
<u>Tableau 24</u> : Résultats en PCR des animaux ayant présenté des modifications hématologiques....	108
<u>Tableau 25</u> : Résultat en PCR des chiens ayant présenté une thrombopénie.....	109
<u>Tableau 26</u> : Résultats au test sérologique et en PCR de 47 chiens.....	111
<u>Tableau 27</u> : Résultats en PCR des 51 chiens testés avec un test sérologique rapide.....	112
<u>Tableau 28</u> : Valeurs intrinsèques et extrinsèques des 3 tests sérologiques rapides utilisés en Guadeloupe (référence : résultat positif en PCR à la détection d' <i>Ehrlichia canis</i> ou d' <i>Anaplasma platys</i>).....	113
<u>Tableau 29</u> : Résultats à la détection d' <i>E. canis</i> par PCR nichée des 51 chiens testés avec un test sérologique rapide.....	113
<u>Tableau 30</u> : Valeurs intrinsèques et extrinsèques des 3 tests sérologiques rapides utilisés en Guadeloupe (référence : résultat positif en PCR spécifique d' <i>E.canis</i>).....	114
<u>Tableau 31</u> : Principales caractéristiques des tests sérologiques rapides utilisés par les vétérinaires praticiens en Guadeloupe.....	121

Liste des abréviations

AcAN : Anticorps Anti-Nucléaire
AAP : Anticorps Anti-Plaquette
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ALAT : Alanine Amino-Transférase
ARNr 16S : Acide Ribonucléique ribosomal 16S
Cell: cellules
CGE : Ehrlichiose Monocytaire Canine
d : dilué au 1/10^{ème}
DMSO : Diméthylsulfoxyde
dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate
ELISA : Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMC : Ehrlichiose Monocytaire Canine
FN : faux négatif
FP : faux positif
GB : Globules Blancs
HGE : Ehrlichiose Granulocytaire Humaine
Hb : Hémoglobine
Ht : Hématocrite
IFI : Immunofluorescence Indirecte
IgA : Immunoglobuline A
IgG : Immunoglobuline G
IgM : Immunoglobuline M
IM : Intra-Musculaire
kDa : kiloDaltons
LDH : Lactate Déshydrogénase
L/M : rapport Lympho-Monocytaire
LMIF : Lymphocyte Migration Inhibiting Factor
NC : Non Calculable
PAL : Phosphatates Alcalines

Pb : Paires de bases

PDF : Produits de Dégradation de la Fibrine et du Fibrinogène

PCR : Polymerase Chain Reaction

PM : Poids Moléculaire

PMIF : Platelet Migration Inhibiting Factor

RLB : Reverse Line Blot

S : Speed®Ehrli

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

T+ : Témoin positif

T- : Témoin négatif

Th : Température d'hybridation

UV : Ultra-Violet

VHE : Venezuelan Human Ehrlichia

VN : vrai négatif

VP : vrai positif

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

W : Witness®Ehrlichia

3D: Snap3Dx

Introduction

Les ehrlichioses sont d'importantes maladies émergentes humaines et animales transmises par les tiques. Le premier cas d'ehrlichiose humaine fut diagnostiqué en 1986 aux Etats-Unis et leur nombre va croissant depuis lors.

L'émergence de nouvelles ehrlichioses chez l'Homme et chez l'animal et la reconnaissance d'une interspécificité de ces bactéries sont certainement liées à des conditions épidémiologiques favorables mais aussi à l'amélioration des méthodes et outils de diagnostic.

Le vétérinaire joue un rôle important dans la détection précoce de cette maladie au potentiel zoonotique redoutable chez le Chien.

La Guadeloupe est une île située en zone tropicale, au cœur de l'arc Antillais et aux frontières du continent Américain. Si l'épidémiologie de la maladie a été étudiée dans de nombreuses régions dans le monde, ce n'est pas le cas en Guadeloupe. Or de fortes suspicions cliniques d'ehrlichiose existent chez les chiens de l'île, originaires le plus souvent de France Métropolitaine, des Etats-Unis ou des Antilles même.

L'objectif de cette étude, réalisée en collaboration avec le CIRAD-EMVT est d'objectiver la présence d'ehrlichiose canine en Guadeloupe, d'identifier les espèces d'*Ehrlichia* circulantes et de caractériser les signes cliniques de l'ehrlichiose canine sur l'île. Nous rappellerons dans un premier temps les connaissances actuelles sur cette maladie.

Première partie :

Etude bibliographique des ehrlichioses canines

I.1. Généralités sur les ehrlichioses

I.1.1. Les principales ehrlichioses

Les principales ehrlichioses rencontrées dans le monde sont regroupées dans le tableau 1. Nous les étudierons plus en détails dans le paragraphe I.2.

I.1.2. Classification phénotypique des *Ehrlichieae*

Les *Ehrlichieae* sont de petites bactéries intracellulaires strictes qui parasitent les cellules sanguines et épithéliales de nombreux mammifères et de l'Homme. Elles prennent une coloration de Gram négative mais, tout comme les *Rickettsieae*, elles diffèrent de la majorité de ces bactéries à Gram négatif par l'absence de production d'endotoxine et par leur transmission essentiellement vectorielle [27].

L'Ordre des *Rickettsiales* comprenait à l'origine toutes les bactéries intracellulaires strictes, mais les actuelles Chlamydies ont été secondairement séparées de cet ordre. Parmi ces *Rickettsiales*, on distingue donc à l'origine trois Familles : les *Rickettsiaceae*, les *Bartonellaceae* et les *Anaplasmataceae*, qui parasitent respectivement les phagocytes spécialisés, les phagocytes non spécialisés et les érythrocytes [27, 44].

Dans la grande famille des *Rickettsiaceae*, les différents genres et espèces ont d'abord été établis sur des critères phénotypiques : écologie, épidémiologie, sérotypage, pouvoir pathogène chez l'Homme et chez l'animal, et la réaction de Weil-Félix (réaction sérologique croisée avec différents sérotypes de bactéries du genre *Proteus sp.*).

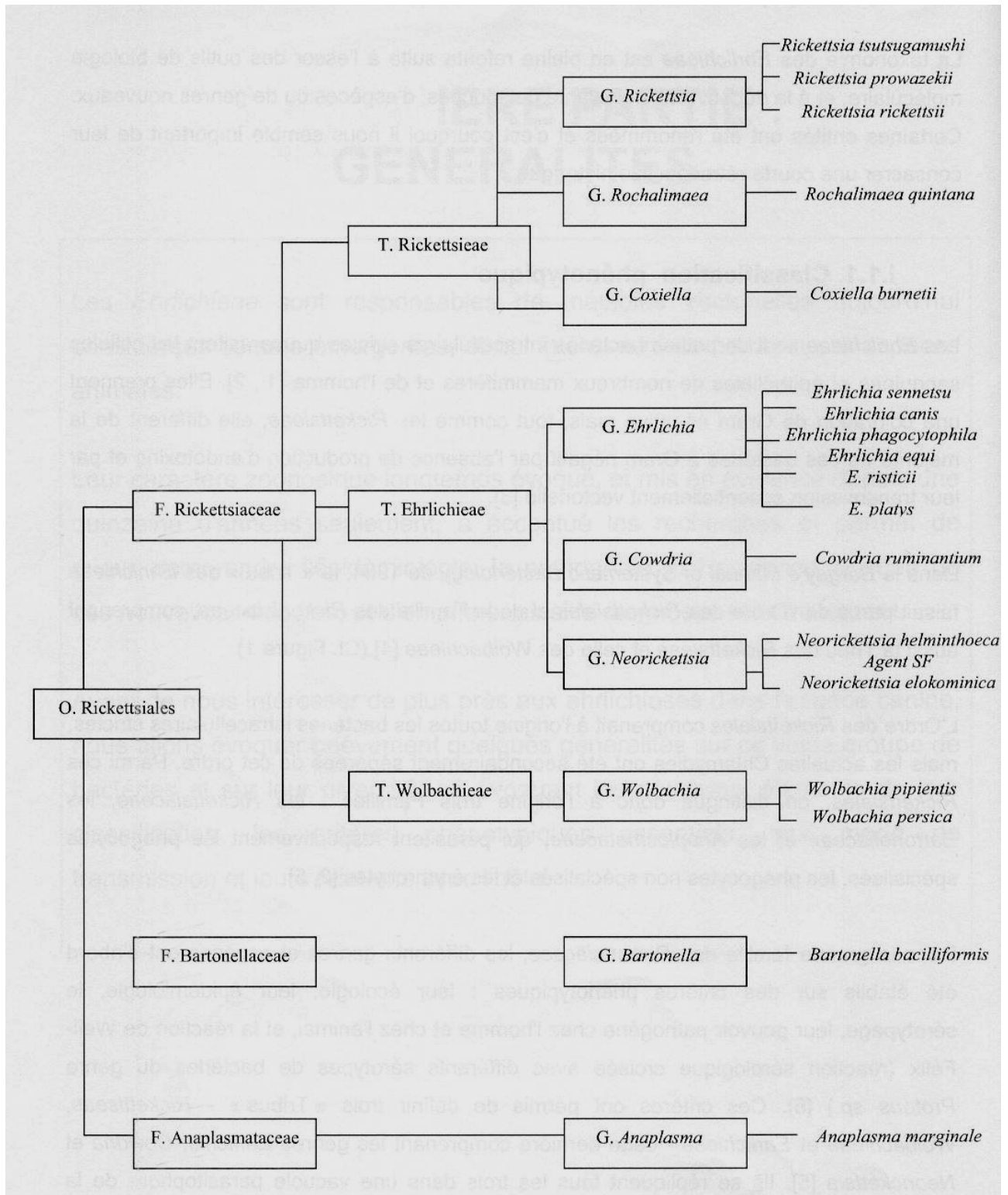
Ces critères ont permis de définir trois « Tribus » - *Rickettsieae*, *Wolbachieae* et *Ehrlichieae* - cette dernière comprenant les genres *Ehrlichia*, *Cowdria* et *Neorickettsia*. Les bactéries de ces trois groupes se répliquent dans une vacuole parasitophore de la cellule hôte, alors que les éléments de la « Tribu » des *Rickettsieae* (sauf *Coxiella burnetii*) se répliquent librement dans le cytoplasme [27]. La figure 1 illustre la classification phénotypique des *Ehrlichieae* dans l'Ordre des *Rickettsiales*.

Tableau 1 : Principales ehrlichioses et leur nouvelle nomenclature

Espèce initialement décrite	Nouvelle nomenclature	Espèces atteintes	Maladies
<i>Rickettsia canis</i> puis <i>Ehrlichia canis</i>	-	Chien Canidés sauvages	Ehrlichiose monocyttaire canine Pancytopenie tropicale canine
<i>Ehrlichia ewingii</i>	-	Chien	Ehrlichiose granulocytaire canine
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	-	Homme Chien	Ehrlichiose monocyttaire humaine
<i>Cowdria ruminantium</i>	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Bovins Chien ?	Cowdriose ou „Heartwater“
<i>Ehrlichia equi</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Cheval	Ehrlichiose granulocytaire equine Ehrlichiose granulocytaire humaine/canine Fièvre à tiques
Agent de l'Ehrlichiose Granulocytaire Humaine		Homme Chien	
<i>Ehrlichia phagocytophila</i>		Ruminants	
<i>Ehrlichia platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>	Chien	Thrombopénie cyclique infectieuse
<i>Anaplasma marginale</i>	-	Ruminants	Anaplasmose (des ruminants)
<i>Ehrlichia risticii</i>	<i>Neorickettsia risticii</i>	Cheval Chien	Fièvre du Potomac
<i>Ehrlichia sennetsu</i>	<i>Neorickettsia sennetsu</i>	Homme	Fièvre de Sennetsu
<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	-	Chien Canidés sauvages	Maladie du saumon empoisonné

D'après Martin et Unver [27, 40]

Figure 1 : Classification phénotypique des *Ehrlichieae* dans l'Ordre des *Rickettsiales*,



D'après Martin [27]

I.1.3. Classification phylogénétique des *Ehrlichieae*

La taxonomie des *Ehrlichieae* est en pleine refonte suite à l'essor des outils de biologie moléculaire et à la découverte incessante de souches, d'espèces ou de genres nouveaux. Certaines entités ont été renommées. Les outils de phylogénie moléculaire largement utilisés depuis la seconde moitié des années 1990 ont complètement bouleversé la classification phénotypique [44].

Parmi les *Rickettsiales*, c'est principalement les gènes de l'ARN 16S ribosomal et le gène de la protéine de choc thermique GroESL qui ont été étudiés. D'après ces études moléculaires, les anciens genres rickettsiens sont maintenant répartis dans trois sous-groupes différents des Protéobactéries (alpha 1, alpha 2 et gamma), qui révèle leurs fortes disparités phylogénétiques [11, 27, 44].

Les études moléculaires ont permis d'établir récemment une nouvelle classification et une nouvelle nomenclature [11].

Les *Ehrlichieae* font ainsi partie du sous-groupe alpha 1 des Protéobactéries, de l'Ordre des *Rickettsiales* et de la famille des *Anaplasmataceae*. Elles partagent entre elles 84 à 96 % d'homologie pour l'ADNr 16S. Parmi ces *Ehrlichieae*, on a pu définir des génogroupes [27], dont les membres ont été rebaptisés par la suite.

On distingue pour les quatre génogroupes respectivement les genres *Ehrlichia*, *Anaplasma* et *Neorickettsia*, ainsi que *Wolbachia pipientis* [11].

I.1.3.1. Groupe 1 ou Groupe Ehrlichia

Il existe un minimum de similitude de 97,7 % entre les séquences du gène codant pour l'ADNr 16S des membres de ce groupe [11]. Il comprend notamment :

- *Ehrlichia canis*, agent de l'ehrlichiose monocyttaire canine ou pancytopenie tropicale canine,
- *Ehrlichia chaffeensis*, agent de l'ehrlichiose monocyttaire humaine,
- *Ehrlichia ewingii*, agent de l'ehrlichiose granulocytaire canine (CGE),
- *Cowdria ruminantium*, récemment rebaptisée *Ehrlichia ruminantium*, responsable de la Cowdriose ou « Heartwater » des bovins en Afrique et dans les Caraïbes,
- *Ehrlichia muris*, espèce isolée au Japon sur des souris sauvages, ainsi que dans des isolats obtenus à partir d'*Ixodes ovatus* au Japon [19, 36],

- **Venezuelan Human Ehrlichia (VHE)**, isolée sur un patient asymptomatique au Vénézuëla et qui présente 99.9% d'homologie avec la séquence du gène codant pour l'ARNr16S d'*Ehrlichia canis* Oklahoma [40].

I.1.3.2. Groupe 2 ou Groupe Anaplasma

Ce groupe est très proche du Groupe 1, avec jusqu'à 94,9 % d'homologie pour les séquences du gène ARNr 16S [11 ,27].

Les membres de ce second groupe partagent entre eux au minimum 96,1 % de similitudes [11] ; on trouve :

- ***Ehrlichia phagocytophila***, l'agent de la fièvre à tique des ruminants,
- ***Ehrlichia equi***, responsable de l'ehrlichiose granulocytaire équine,
- **L'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine (HGE)**,

Il n'existe toutefois pas de différence suffisante entre les séquences de l'ARN 16S et du gène groESL de ces trois entités pour en faire des espèces différentes. On pourra donc trouver ces différents noms pour faire référence à une seule et même espèce : ***Anaplasma phagocytophilum*** [11].

Cette nouvelle entité partage au minimum 98,2% d'homologie pour la séquence du gène codant pour l'ARNr16S avec les autres *Anaplasma* :

- ***Ehrlichia platys***, renommée ***Anaplasma platys***, responsable d'une thrombopénie cyclique chez le Chien,

- ***Ehrlichia bovis***, renommée ***Anaplasma bovis***, responsable d'une Anaplasmosse systémique chez les bovins d'Afrique, mais aussi dans d'autres régions telles que l'Amérique du Sud, l'Iran ou l'Inde.

- ***Anaplasma marginale***, parasite des érythrocytes des bovins, serait également apparentée à ce deuxième groupe.

I.1.3.3. Groupe 3 ou Groupe Neorickettsia

Il est plus éloigné des deux précédents (88,3 % d'homologie seulement pour la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S) et c'est le groupe le plus divergent, avec au minimum 94,9 % de similitudes entre ses membres [11,27]. On reconnaît en particulier :

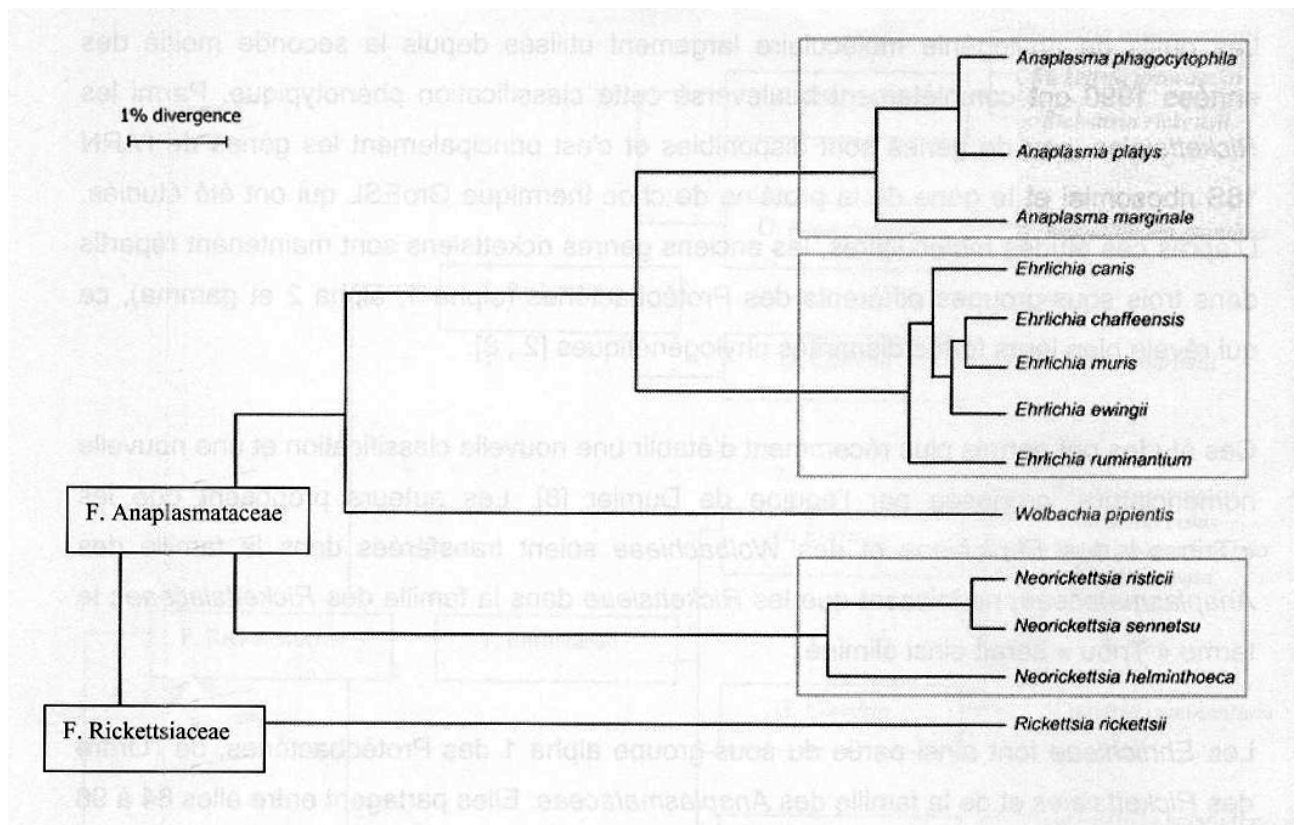
- ***Ehrlichia sennetsu***, renommée ***Neorickettsia sennetsu***, espèce parasite de l'Homme isolée sur un patient au Japon,
- ***Ehrlichia risticii***, qui a pris le nom de ***Neorickettsia risticii***, responsable de la « fièvre du Potomac » des équidés,
- ***Neorickettsia helminthoeca***, responsable du "salmon poisoning disease" ou « empoisonnement au saumon », chez les Canidés aux Etats-Unis.
- ***Neorickettsia elokominica*** responsable de la "Elokomin fluke fever" ou « fièvre d'Elokomin » chez les Canidés et autres carnivores sauvages,
- **L'agent de *Stellantchasmus falcatus* (agent SF)**, isolé sur des métacercaires de ce trématode enkystées sur des poissons mulets gris au Japon, dans les mêmes régions que *N. sennetsu*.

I.1.3.4. Groupe Wolbachia

Le groupe *Wolbachia* ne comprend plus que la seule entité ***Wolbachia pipientis***, qui est un symbionte de nombreux insectes, helminthes et crustacés. La transmission trans-ovarienne largement documentée en fait un organisme tout à fait singulier dans cette famille. Elle est donc considérée comme une entité à part, qui occupe une position intermédiaire, assez proche des groupes 1 et 2 (88 % d'homologie pour la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S) et plus éloignée du groupe 3 (84 % d'homologie pour la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S) [11,27].

La figure 2 montre la classification phylogénétique des *Ehrlichieae* sur la base de l'analyse de l'ARNr 16S.

Figure 2 : Classification phylogénétique des *Ehrlichieae* sur la base de l'analyse de l'ARNr16S,



D'après Martin [27]

I.1.4. Caractéristiques phénotypiques des *Ehrlichieae*

I.1.4.1. Morphologie, cycle de développement

Microscopiquement, les *Ehrlichieae* se présentent sous la forme de petits cocci - d'environ 0,5 µm - à Gram négatif, appelés corps élémentaires, et présents dans le cytoplasme à l'intérieur d'une membrane parasitophore issue de la cellule-hôte.

Ces cocci prennent une coloration basophile bleu foncée à mauve lorsque l'on effectue une coloration de type Romanowsky et rouge pâle avec une coloration de Macchiavello. Ces bactéries, généralement rondes à ellipsoïdes, sont souvent pléiomorphes en culture [27].

Il existe plusieurs stades de développement [14, 25, 27]:

- Les corps élémentaires pénétreraient dans la cellule par phagocytose et se diviseraient dans une membrane parasitophore provenant de la membrane plasmique de la cellule hôte.

- Après 3 à 5 jours, on observe des amas d'éléments pléiomorphes comparables aux corps réticulés des Chlamydies, appelés corps initiaux.
- Enfin, ces corps initiaux se multiplieraient encore pour former en une semaine environ le stade **morula** - de 4µm de diamètre environ - spécifique de ce groupe, qui correspond à des micro-colonies pouvant contenir jusqu'à 100 corps élémentaires (20 à 40 en moyenne). La sortie de la cellule se ferait le plus fréquemment sans doute par exocytose, libérant ainsi les corps élémentaires.

E. canis, *E. (Cowdria) ruminantium* et *E. chaffeensis* ont tendance à donner des morulas très denses, dans lesquelles on distingue à peine les corps élémentaires, alors que les *Neorickettsia spp.* du groupe 3 sont généralement visibles sous forme individuelle ou seulement de quelques corps élémentaires dans la vacuole.

I.1.4.2. Principaux antigènes, réactions croisées

Il est intéressant de constater qu'il existe une communauté antigénique entre les membres d'un même génogroupe, essentiellement pour des antigènes de surface [27] :

- *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ruminantium* et *VHE* possèdent un complexe antigénique majeur de surface commun de 28-32 kDa ;
- *A. phagocytophilum* possède un complexe antigénique majeur de surface de 42-49 kDa et
- *N. sennetsu*, *N. risticii* et l'agent SF ont en commun un complexe de surface majeur de 51-55 kDa.
- Par contre, *N. helminthoeca* et *N. elokominica*, qui appartiennent au même génogroupe, semblent distincts du point de vue antigénique.

Les protéines de surface des *Ehrlichieae* du groupe 1 et 2, ainsi que de *Wolbachia pipientis*, sont codées par une famille de multigènes polymorphes, homologues mais non identiques [11, 27, 43].

Cette famille de multigènes polymorphes code pour des antigènes d'*E.canis* d'environ 30 kDa, pour P30 et pour les antigènes de 28 kDa - OMP-1S ou P28 - d'*E. chaffeensis* [43]. Ces deux espèces présentent une **forte réactivité croisée** [43].

Cette famille de multigènes polymorphes code également pour les protéines de surface dominantes P44 d'*A. phagocytophilum*, qui sont très proches des protéines de surface d'*E. canis*,

d'*E. chaffeensis*, ainsi que de l'antigène majeur de surface MAP-1 d'*E. (Cowdria) ruminantium*. Ceci explique la **réactivité sérologique croisée entre les membres du groupe 1 et 2**, qui ne semble se produire que rarement, et uniquement dans le cas de sérums hyperimmuns [11, 43].

Les réactions croisées entre les *Ehrlichieae* peuvent poser des problèmes d'interprétation, notamment pour l'Immunofluorescence indirecte (IFI), les tests de type ELISA ou les tests immuno-chromatographiques.

La littérature ne décrit pas de réactions sérologiques croisées entre *A.platys* et *E.canis* [13, 27, 43].

Enfin, une diversité antigénique semble exister au sein même de l'espèce *E.canis* [43].

I.1.5. Vecteurs et répartition géographique des ehrlichioses canines

Les ehrlichioses sont des arbo-bactérioses : la transmission des *Ehrlichia spp.* est vectorielle.

Chaque membre d'un même génogroupe semble associé à des vecteurs identiques. Ainsi, les membres des génogroupes 1 et 2 sont transmis par des arthropodes. Les membres du groupe 2 seraient principalement transmis par des tiques du genre *Ixodes*, alors que les *Ehrlichieae* du premier groupe seraient essentiellement transmis par des tiques dures autres qu'*Ixodes* (*Dermacentor sp.*, *Amblyoma sp.*, *Rhipicephalus sanguineus*...). Le tableau 2 regroupe les données concernant les vecteurs et la répartition géographiques des ehrlichioses du Chien.

Les Etats-Unis abritent l'ensemble des principales espèces atteignant le Chien, avec toutefois des répartitions géographiques différentes. L'ehrlichiose granulocytaire due à *Ehrlichia ewingii* a été décrite aux Etats-Unis et sa présence sur le continent Africain a récemment été mise en évidence [27, 30]. Son ADN a été identifié sur des rongeurs en Corée [27].

En Europe, les infections les plus rapportées chez le chien sont l'ehrlichiose monocyttaire (EMC), l'infection par *A. platys* et les ehrlichioses granulocytaires, due à *A. phagocytophilum*. L'EMC est principalement décrite dans le Sud de la France, la Grèce, l'Espagne, le Portugal, l'Italie et l'Allemagne [1]. Les ehrlichioses granulocytaires canines, ou "fièvres à tiques" du chien, ont été rapportées dans plusieurs pays d'Europe comme l'Ecosse, la Suisse, la Suède ou la France. Mais d'autres pays européens, comme le Pays de Galles, l'Angleterre, la Grèce, la Norvège, l'Espagne ou l'Italie, ont rapporté l'existence de cet agent pathogène, soit par l'intermédiaire de cas humains, soit détecté dans des tiques du genre *Ixodes* par PCR. Dans les pays scandinaves, où elle sévit depuis 1988, la maladie est devenue courante chez les chiens et les chats. [27, 6].

Toutefois, les vecteurs sont relativement différents d'un pays à l'autre, ce qui semble montrer une certaine adaptabilité des *Ehrlichiae*, et permettrait, en partie, d'expliquer l'émergence des ehrlichioses dans de nombreux pays [27]. Le vecteur arthropode se contamine après un repas de sang sur un animal atteint. Pour *E. canis*, ce repas infectant a lieu dans les 2 à 3 premières semaines de l'infection, lorsque les monocytes parasités sont les plus nombreux dans le torrent circulatoire. Les *Ehrlichiae* se répliquent dans les tiques et sont ensuite transmises horizontalement par morsure via les sécrétions salivaires du vecteur jusqu'aux cellules sanguines de l'animal ou de l'Homme [11,27].

Tableau 2 : Vecteurs et répartition géographique des ehrlichioses du Chien

Espèce	Répartition géographique	Vecteurs naturels	Remarques
<i>E.canis</i>	ubiquitaire, principalement régions tropicales et subtropicales	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Possibilité de cas importés ou de foyers endémiques isolés hors de ces zones.
<i>A.platys</i>	ubiquitaire: Etats-Unis (Sud-Est), Europe (Sud), Amérique du Sud, Asie, Australie	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Dermacentor auratus</i>	
<i>E.chaffeensis</i>	Etats-Unis (Etats du Sud), Japon, Chine, Afrique du Sud ?	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Ixodes scapularis</i> , <i>Ixodes ovatus</i> , <i>Amblyomma testudinarium</i> , <i>Haemaphysalis yeni</i> , <i>Haemaphysalis hystricis</i>	Description d'une souche génétiquement proche au Vietnam en 2003. Détectée sur des tiques en Chine en 2000 et au Japon en 2005. Existence possible en Afrique du Sud (1998).
<i>E.ewingii</i>	Etats-Unis (Etats du Sud et partie sud du Mideast dont le Missouri), Cameroun	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Amblyomma americanum</i> , <i>Otobius megnini</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Ixodes sp.?</i>	Décrite au Nord dans l'Etat de New-York (2003). Isolée dans un camp militaire américain en Corée (2003). Détectée chez des chiens au Cameroun (2005).
<i>A.phagocytophilum</i>	Etats-Unis (Nord-Est, partie nord du Midwest, Californie), Europe, Afrique, Asie.	<i>Ixodes spp.</i>	Répartition probablement mondiale avec des variations génétiques; répartition liée à celle de <i>Borrelia burgdorferi</i> .
<i>N.risticii</i> et <i>N.risticii</i> var <i>atypicalis</i>	Etats-Unis, Canada, Europe	Trématodes	Description du variant <i>atypicalis</i> infectant le chien uniquement aux Etats-Unis
<i>N.helminthoeca</i>	Etats-Unis (Côte Ouest)	Trématode: <i>Nanophyetus salmonicola</i>	

D'après Aguirre, Inokuma, Martin, Parola, Sarih, Shibata et Unver [1, 19, 20, 27, 30, 31, 34, 36, 40]

I.2. Les ehrlichioses canines

I.2.1. L'ehrlichiose monocytaire canine à *Ehrlichia canis*

I.2.1.1. Etiologie

L'ehrlichiose monocytaire canine (EMC) est due à l'infection par *Ehrlichia canis*, qui a un tropisme pour les cellules mononucléées. Elle a été découverte en 1935 en Algérie par Donatien et Lestoquard, qui la nommèrent *Rickettsia canis*. Le nom de genre *Ehrlichia* lui fut donné 10 ans plus tard en l'honneur de Paul Ehrlich. [14, 27]

E. canis fut ensuite décrite dans d'autres pays à travers le monde, en Asie ou aux Etats-Unis, jusqu'au milieu des années 60. C'est plus particulièrement lors des guerres de Corée et du Viêtnam que l'EMC prit toute son importance, décimant de nombreux chiens de l'armée Américaine. On décrivait alors une forme aiguë caractérisée par des signes modérés, avec fièvre, perte de poids modéré, anorexie, accompagnés d'une polyadénomégalie, et une forme chronique, avec un tableau hémorragique, des oedèmes et un état de choc conduisant à la mort. Les signes biologiques étaient principalement une thrombopénie, une leucopénie et une hypergammaglobulinémie ; cette forme sévère fut nommée « Pancytopenie tropicale canine ». Les animaux les plus sensibles à cette maladie étaient les chiens de race Berger allemand, et notamment les animaux n'ayant jamais séjourné en Asie. L'existence d'infections par d'autres agents pathogènes (*Hemobartonella*, *Babesia*) pouvait accentuer les signes cliniques [3, 14, 27].

L'EMC a également reçu d'autres noms au cours du temps tels que « typhus canin », « fièvre hémorragique canine », « syndrome hémorragique idiopathique »... [27]. Actuellement, on a isolé et caractérisé génétiquement, chez le Chien, de nombreuses souches d'*Ehrlichia canis* distinctes [1].

Récemment, une souche d'*Ehrlichia* présentant 99.9% d'homologie pour la séquence du gène codant pour l'ARNr16S avec *E. canis* Oklahoma a été découverte au Venezuela sur un patient humain atteint d'une ehrlichiose. C'est la première étude qui rapporte l'existence et la mise en culture d'une *Ehrlichia* canine en Amérique du Sud. Le Chien pourrait alors servir de réservoir ou de sentinelle pour cette ehrlichiose, et les humains la contracter par les piqûres occasionnelles de tiques brunes.[40]

I.2.1.2. Pouvoir immunogène

L'infection naturelle ou expérimentale du Chien par *E. canis* entraîne la production d'anticorps spécifiques.

Suite à l'infection de chiens sains par transfusion de sang de chiens en phase aiguë de la maladie, on peut noter l'apparition d'IgM et d'IgA 4 à 7 jours post-transfusion, alors que les IgG n'apparaissent qu'à partir du 15ème jour post-transfusion. Toutefois, l'apparition des IgG semble pouvoir être plus précoce, et notamment dépendante de la «dose infectante» : on a pu déclencher des infections expérimentales à partir d'isolats de culture cellulaire avec apparition d'IgG à partir du troisième jour. La séroconversion peut aussi être beaucoup plus lente, notamment lors d'infections naturelles ; les chiens peuvent présenter des délais de séroconversion allant jusqu'à 4 semaines [27, 43]. La «dose infectante», la réponse immunitaire de l'hôte ou encore la pathogénicité de la souche sont autant de facteurs pouvant influencer la mise en place de cette réponse immunitaire humorale.

Un certain degré d'immunosuppression a pu être noté chez les chiens de race Berger Allemand, mis en évidence par des tests de migration leucocytaire et par des modifications de la réponse au test d'hypersensibilité de type IV, expliquant certainement leur plus grande sensibilité à la maladie, et notamment le développement de formes chroniques sévères [27, 43].

I.2.1.3. Pathogénie

Les mécanismes immunologiques apparaissent comme base essentielle de la pathogénie de l'EMC, à tous les stades de la maladie : l'infiltration plasmocytaire diffuse, l'hypergammaglobulinémie, le test de Coombs parfois positif, la présence d'anticorps anti-plaquettes et de complexes immuns le montrent.[27, 33]

La réponse immunitaire humorale se traduit par la production d'anticorps ne présentant aucun pouvoir protecteur ; cette production d'anticorps inadéquate pourrait intervenir dans la pathogénie de la forme chronique.[25, 27, 43]

I.2.1.3.1. Pathogénie des troubles hématologiques

□ Troubles de l'hémostase primaire

- Vascularite : [25, 27]

Suite à sa pénétration dans l'organisme, *E. canis* se loge dans les ganglions et est prise en charge par les cellules du système des phagocytes mononucléés de la rate et du foie principalement. Puis

ces cellules mononucléées infectées se disséminent dans l'organisme et entraînent des lésions de vascularite en interagissant avec les cellules endothéliales. Ces lésions sont responsables des principales observations cliniques, variables selon les organes atteints.

- Thrombopénie : [3, 14, 25, 27, 43]

Lors de la phase aiguë, la thrombopénie semble être pluri-factorielle. Les principales hypothèses sont une consommation accrue de plaquettes due à une vascularite, une séquestration splénique, une destruction à médiation immune entraînant une moindre durée de vie des plaquettes, de l'ordre de 4 jours au lieu de 9.

De plus, un facteur soluble produit par les plasmocytes a été mis en évidence par Kakoma et coll. en 1980 [27], et appelé PMIF (Platelet Migration Inhibiting Factor). Ce facteur est identique à celui observé dans les maladies auto-immunes humaines et agit en inhibant la formation de pseudopodes et peut-être en favorisant la séquestration des plaquettes dans divers organes dont la rate.

L'infection par *E.canis* entraînerait une surproduction d'anticorps anti-plaquettes naturels (AAP), avec une affinité supérieure. On peut penser que cette augmentation est due à la destruction massive par des lymphocytes de plaquettes dans les premiers temps de l'infection, et à une production accrue d'AAP face à la libération massive de constituants plaquettaires dans le torrent circulatoire. L'équilibre pré-établi entre auto-anticorps naturels et plaquettes serait ainsi perturbé, ce qui favoriserait l'entretien de la thrombopénie.

Lors de la phase chronique de la maladie, c'est une hypoplasie médullaire qui est responsable de la thrombopénie. Compte tenu du renouvellement quotidien important du pool plaquettaire (15 %) et la faible durée de vie des plaquettes, la thrombopénie survient rapidement et s'installe durablement. Des mécanismes à médiation immune sont évoqués pour expliquer cette hypoplasie médullaire.

- Thrombopathie : [18, 25, 27]

Lovering et coll. ont montré, dès 1980, qu'il existait une diminution de l'adhésion plaquettaire lors d'ehrlichiose aiguë.

Des observations en microscopie électronique ont révélé que le PMIF empêchait la formation de pseudopodes. Les plaquettes ainsi affectées s'arrondissent et ne peuvent alors plus s'agglutiner. Des études en agrégométrie ont mis en évidence une thrombopathie chez les chiens atteints d'ehrlichiose

expérimentale. Dans cette étude, l'agrégation la plus lente est observée 20 jours après l'infection, date à laquelle ces mêmes chiens présentaient le plus fort taux d'AAP. Ces derniers seraient donc en partie responsables de cette thrombopathie.

□ Anémie : [3, 14, 25, 27]

Lors de la **phase aiguë** de l'ehrlichiose, **l'anémie est inconstante**. Elle est due à une hémolyse intravasculaire. On suppose que le mécanisme responsable de cette destruction est encore une fois à médiation immune ; les anticorps dirigés contre *E. canis* se fixeraient à la membrane des globules rouges, entraînant leur lyse par les cellules effectrices du système immunitaire.

Lors de la **phase chronique**, l'**anémie** rencontrée est **arégénérative, d'origine centrale**, liée à l'hypoplasie médullaire apparaissant six à huit semaines après inoculation [14]. On a également évoqué dès les années 70 la possibilité de mécanismes à médiation immune comme cause de cette anémie : il y aurait une atteinte des structures sinusoïdales des structures de la moelle osseuse, empêchant la prolifération et la fixation des cellules souches.

□ Modification de la formule leucocytaire : [25, 27]

On observe dans la **phase aiguë une leucopénie suivie d'une leucocytose**. L'origine supposée de cette leucopénie est une réaction à médiation immune puisqu'elle est concomitante de la thrombopénie. Une autre origine serait une margination des leucocytes dans le système vasculaire. On a pu mettre en évidence un facteur d'inhibition de la migration lymphocytaire (LMIF). La leucocytose lui succédant est un signe de l'inflammation, mise en évidence également par une plasmocytose périvasculaire qui se développe dans différents organes, comme le foie, la rate, les reins et les poumons. On peut noter la présence de grands lymphocytes granuleux sur les frottis sanguins.

Lors de la **phase chronique**, une atteinte médullaire de toutes les lignées entraîne une **leucopénie modérée à sévère**.

I.2.1.3.2. Pathogénie des troubles biochimiques

□ Protéines sériques : [3, 14, 25, 27]

L'**hypoalbuminémie** constatée peut être due à une fuite rénale d'albumine (albuminurie sans lésions rénales notables associées) observée au début de cette phase aiguë. Mais l'atteinte hépatique (infiltration plasmocytaire péri-vasculaire) ainsi que les saignements, l'exsudation et l'anorexie

transitoire constituent également des causes possibles. De plus, une augmentation de la pression oncotique, suite à la synthèse massive de globulines (alpha-2, bêta et gammaglobulines) observée durant le début de la maladie entraînerait, par compensation, une diminution de la synthèse hépatique d'albumine. Cela permettrait d'éviter l'apparition d'une hyperviscosité sanguine.

L'**augmentation des alpha2-globulines** est la conséquence de la synthèse hépatique de protéines de l'inflammation.

La production précoce d'IgM et d'IgA explique la **montée rapide du bloc des bêta-2globulines**. Cette importance du **bloc bêta-2 s'atténue lors de la phase chronique**, et en particulier chez les animaux pancytopéniques.

L'**augmentation des gammaglobulines** correspond notamment à la production d'immunoglobulines G. Ces dernières ne présentent toutefois aucun pouvoir protecteur. On peut penser qu'une stimulation antigénique prolongée entraîne une plasmocytose. On ne note d'ailleurs aucune corrélation entre le titre en anticorps anti-*E.canis* et l'hypergammaglobulinémie. Durant la phase aiguë, l'hypergammaglobulinémie est également liée à la production de facteurs humoraux comme le PMIF.

Les anticorps anti-nucléaires (AcAN) ne sont généralement pas détectés, mais on a pu mettre en évidence, sur des chiens infectés naturellement et expérimentalement, des complexes immuns circulants, aussi bien durant la phase aiguë que lors de la phase subclinique, et qui pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de la maladie en phase chronique (glomérulonéphrite).

Une baisse des protéines totales, des globulines, et notamment des gammaglobulines, est observée en phase finale de la phase chronique grave, suggérant une baisse de l'état d'immunité de l'animal.

□ Atteinte hépato-rénale

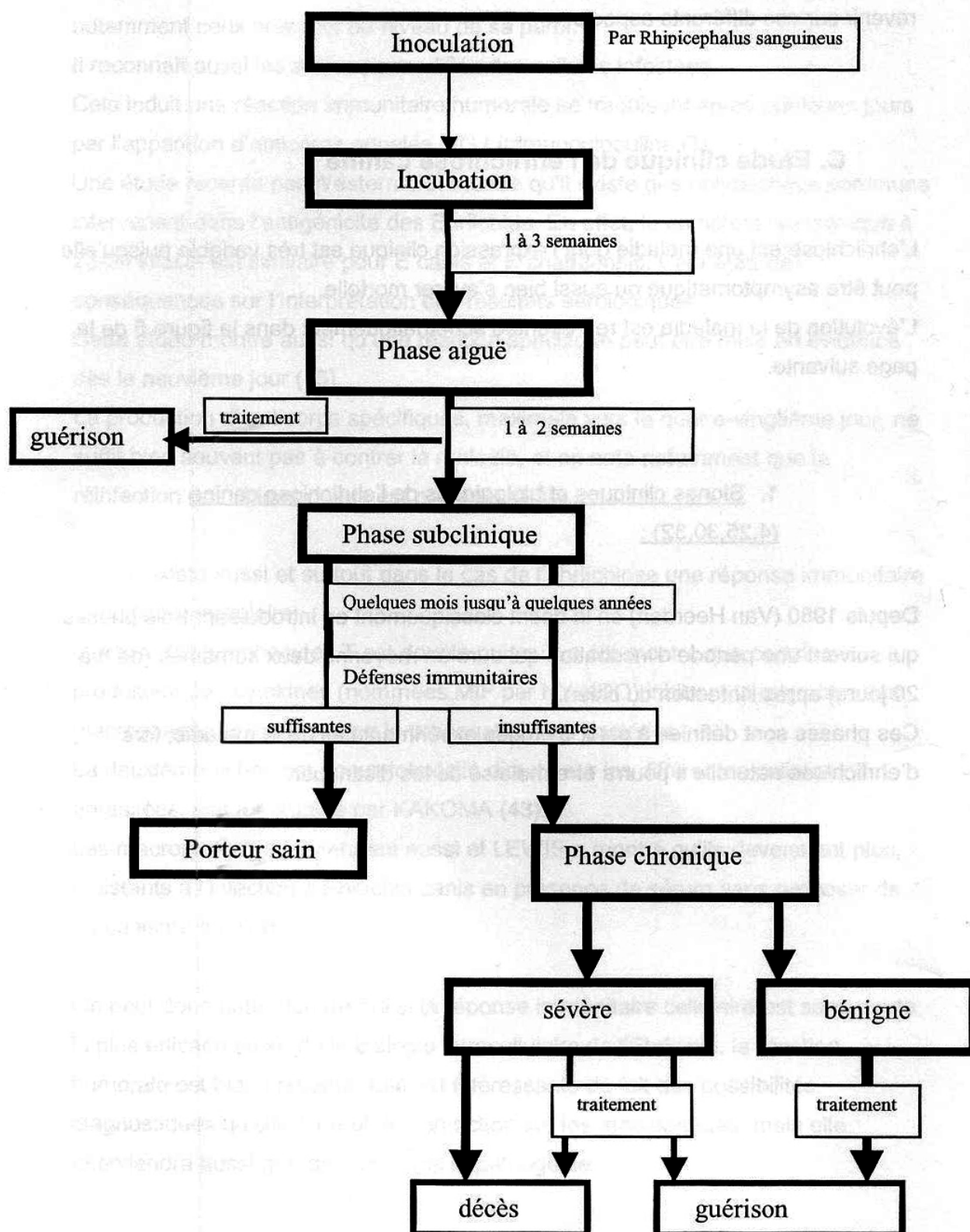
L'atteinte hépatique comme l'atteinte rénale sont liées à une infiltration lymphoplasmocytaire interstitielle que l'on retrouve dans le tableau lésionnel.

Lors de la phase chronique, il est possible également d'observer une glomérulonéphrite, vraisemblablement liée au dépôt de complexes immuns circulant.

I.2.1.4. Etude clinique

Trois formes successives de la maladie ont été observées lors d'études menées sur des chiens infectés expérimentalement [14, 25, 27]. La figure 3 illustre l'évolution clinique de l'EMC.

Figure 3 : Evolution clinique de l'ehrlichiose monocyttaire canine



D'après Landru [25]

I.2.1.4.1. Phase aiguë

□ Symptômes : [3, 27, 33]

Après une **période d'incubation de 8 à 20 jours**, l'infection par *E. canis* se manifeste par un **syndrome fébrile** durant 1 à 4 semaines.

Les principaux symptômes rencontrés sont : **hyperthermie** (45-80% des cas), **abattement** (70-75% des cas), **anorexie** (56-62% des cas), **jetage oculo-nasal - épistaxis ou jetage séro-purulent** - (47% des cas), **amaigrissement** (31-59% des cas). Des **troubles hémorragiques** (épistaxis, pétéchies, ecchymoses, hématurie, méléna, hyphéma...) surviennent dans 29 à 45% des cas. Une **polyadénomégalie** est notée dans 13 à 44% des cas [3, 27]. D'autres symptômes ont été décrits, comme une **dyspnée**, des **vomissements**, de la **diarrhée**, des **signes nerveux** (ataxie, paraparésie, convulsions, déficits des nerfs crâniens...). La **présence de tiques** est possible durant cette phase.

La symptomatologie durant cette phase peut être frustre et passer inaperçue, se manifestant par de la fièvre, une légère hypertrophie ganglionnaire, une perte de poids modérée et un jetage oculo-nasal passager.

La phase aiguë peut être sévère chez certains chiens, notamment les animaux âgés. Cette forme aiguë sévère se manifeste par une atteinte hépato-splénique grave (hémosidérose hépato-splénique, nécrose splénique, infiltrats inflammatoires hépatiques diffus).

Le tableau 3 regroupe les principaux signes cliniques observés lors d'EMC.

Tableau 3 : Principaux signes cliniques observés lors d'ehrlichiose monocyttaire canine d'après Harrus, Kuehn, Martin, Troy, Waddle [16, 24, 27, 39, 41].

Légende : N : nombre total de chiens inclus dans les 5 études. NR = non rapporté. Les 5 colonnes répertorient respectivement les données obtenues d'après [39], [24], [27], [41] et [16]

Signes cliniques	POURCENTAGE D'ANIMAUX					TOTAL	N
Abattement	53 %	59 %	70 %	85 %	78 %	70 %	348
Perte de poids	60 %	39 %	70 %	44 %	NR	59 %	248
Halètement	NR	NR	NR	NR	58 %	58 %	100
Anorexie	60 %	27 %	64 %	67 %	57 %	56 %	348
Muqueuses pâles	NR	NR	NR	NR	45 %	45 %	100
Tendances hémorragiques*	50 %	34 %	53 %	37 %	42 %	45 %	348
Fièvre	50 %	20 %	48 %	37 %	57 %	45 %	348
Polyadénomégalie	13 %	27 %	36 %	NR	75 %	44 %	321
Infestation par les tiques	40 %	NR	39 %	11 %	NR	35 %	192
Splénomégalie	7 %	14 %	20 %	37 %	20 %	19 %	348
Déshydratation	NR	NR	NR	NR	16 %	16 %	100
Souffle cardiaque	NR	NR	10 %	44 %	NR	16 %	162
Vomissements	NR	9 %	17 %	11 %	13 %	14 %	318
Décharge oculaire	NR	NR	NR	NR	11 %	11 %	100
Ataxie	7 %	NR	14 %	7 %	5 %	10 %	292
Diarrhée	NR	NR	NR	NR	9 %	9 %	100
Boiterie	NR	NR	NR	NR	7 %	7 %	100
Ictère	NR	NR	NR	NR	6 %	6 %	100
Décharge nasale	NR	NR	NR	NR	3 %	3 %	100
Troubles nerveux	NR	NR	NR	NR	1 %	1 %	100

□ Signes biologiques :

o Signes hématologiques : [3, 14, 27]

La **leucopénie**, les **anémies régénératives**, mais surtout la **thrombopénie** sont actuellement les critères de choix dans le dépistage des ehrlichioses. Mais ces signes ne sont pas systématiques.

On rencontre une **thrombopénie** (numération plaquettaire inférieure à 200000/mm³) dans 70 à 80 % des cas. Certains chiens atteints d'EMC peuvent présenter une **numération plaquettaire normale**, avec toutefois des signes cliniques d'hémorragies liées à un défaut d'hémostase primaire, notamment en phase aiguë de la maladie. La réalisation d'un **temps de saignement à la muqueuse buccale ou gingivale** permet dans ce cas de détecter d'éventuelles thrombopathies ou anomalies vasculaires. Par contre, les temps de coagulation (temps de prothrombine, taux de thrombine, temps de céphaline activée) et les produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène (PDF) sont habituellement normaux.

On rencontre également une **anémie périphérique modérée (29,4 %)**, une numération érythrocytaire basse (52,6 %) et un hémocrite bas (11,7 %). Les indices érythrocytaires sont légèrement modifiés, avec une tendance à l'hypochromie.

Quant à la numération blanche, on observe **soit une leucocytose (10,5 %), soit une leucopénie (42,1 %)**. On note la présence de nombreux polynucléaires granulocytes neutrophiles (PNN) peu segmentés.

Le tableau 4 regroupe les principaux signes hématologiques observés lors d'EMC.

Tableau 4 : Principaux signes hématologiques observés lors d'ehrlichiose monocyttaire canine d'après Harrus, Kuehn, Martin, Troy, Waddle [16, 24, 27, 39, 41].

Légende : N : nombre total de chiens inclus dans les 5 études. NR = non rapporté. Les 5 colonnes répertorient respectivement les données obtenues d'après [39], [24], [27], [41] et [16].

Signes hématologiques	POURCENTAGE D'ANIMAUX					TOTAL	N
Thrombopénie	100 %	64 %	92 %	84 %	73 %	83 %	348
Anémie centrale	NR	85 %	80 %	60 %	NR	79 %	248
Anémies	90 %	72 %	68 %	81 %	73 %	73 %	100
Lymphopénie	NR	41 %	44 %	48 %	52 %	46 %	348
Eosinopénie	NR	27 %	51 %	63 %	8 %	34 %	100
Leucopénie	53 %	25 %	30 %	22 %	35 %	32 %	348
Neutropénie	47 %	18 %	24 %	19 %	24 %	25 %	348
Pancytopénie	NR	13 %	19 %	NR	30 %	22 %	321
Anémie régénérative	NR	15 %	20 %	40 %	NR	21 %	192
Leucocytose	17 %	14 %	21 %	30 %	13 %	18 %	348
Neutrophilie	NR	14 %	20 %	37 %	13 %	18 %	100
Monocytose	23 %	9 %	20 %	0 %	14 %	15 %	162
Lymphocytose	NR	7 %	11 %	11 %	2 %	7 %	318
Basophilie	NR	5 %	10 %	0 %	NR	7 %	100
Eosinophilie	NR	9 %	2 %	4 %	NR	4 %	292
Détection de morulae sur frottis sanguin	17 %	0 %	2 %	NR	NR	4 %	100

o Signes biochimiques :

On note des modifications des protéines sériques et du profil électrophorétique. Dans les premiers temps de l'infection, on peut voir une **diminution des protéines totales**, due à une **hypoalbuminémie** et une **hyperglobulinémie relative**. Lors d'infection expérimentale, un **pic en bêta-gamma** est visible dès 19 jours après inoculation et la gammaglobulinémie augmente très rapidement.

Les **phosphatases alcalines** (PAL) et les **transaminases** (ALAT) plasmatiques augmentent, ce qui est la conséquence de lésions infiltratives du foie.

Cette phase aiguë se résout habituellement spontanément, même sans traitement, et commence alors une phase subclinique.

Le tableau 5 regroupe les principaux signes biochimiques observés lors d'EMC.

Tableau 5 : Principaux signes biochimiques observés lors d'ehrlichiose monocyttaire canine d'après Harrus, Kuehn, Martin, Troy, Waddle [16, 24, 27, 39, 41].

Légende : N : nombre total de chiens inclus dans les 5 études. NR = non rapporté. Les 5 colonnes répertorient respectivement les données obtenues d'après [39], [24], [27], [41] et [16].

Signes biochimiques	POURCENTAGE D'ANIMAUX					TOTAL	N
Hyperglobulinémie	NR	46 %	39 %	23 %	57 %	45 %	309
Élévation AIAT	31 %	36 %	48 %	44 %	36 %	42 %	334
Hypoalbuminémie	NR	36 %	46 %	42 %	29 %	39 %	309
Élévation PAI	0 %	39 %	28 %	58 %	56 %	38 %	335
Élévation LDH	NR	NR	NR	NR	38 %	38 %	100
Hyperprotéinémie	37 %	38 %	30 %	NR	18 %	28 %	313
Élévation urémie	NR	20 %	20 %	19 %	35 %	25 %	309
Élévation créatininémie	NR	30 %	5 %	19 %	29 %	17 %	308
Élévation bilirubinémie	19 %	NR	10 %	15 %	NR	13 %	179
Hypoglycémie	NR	10 %	NR	NR	NR	10 %	49
Hypoprotéinémie	NR	5 %	4 %	NR	NR	4 %	183
Hypoglobulinémie	NR	7 %	1 %	4 %	NR	3 %	209
Hyperalbuminémie	NR	2 %	NR	NR	NR	2 %	50

I.2.1.4.2. Phase subclinique

Durant cette phase, le chien reste porteur de la bactérie, mais ne présente que des anomalies hématologiques et biochimiques, sans aucune conséquence clinique.

On note généralement une **thrombopénie et une hyperprotéinémie** chez le chien séropositif. Cette dernière est la conséquence d'une **hyperglobulinémie, notamment en bêta et en gamma**, et l'albuminémie est généralement élevée également. Les alpha2globulines restent stables ou diminuent légèrement durant cette phase de silence clinique. L'augmentation des

gammaglobulines suit de façon linéaire celle du titre en anticorps, ce qui correspond à la production d'IgA, d'IgM et surtout d'IgG.

Le titre ne cesse généralement d'augmenter à partir du septième jour de l'infection, ce qui suggère une stimulation antigénique permanente. Il diminue lentement après traitement pour s'annuler après 6 à 16 mois.

Les chiens peuvent rester en phase subclinique durant plusieurs mois à plusieurs années. Les chiens immunocompétents seraient à même d'éliminer le parasite, alors que certains animaux développeront une phase chronique plus ou moins grave.

La race, le statut immunitaire de l'hôte, le stress, des infections par d'autres parasites, la souche en cause ou encore la localisation géographique sont autant d'hypothèses avancées pour expliquer le développement de la phase chronique de la maladie. [3, 14, 25, 27]

I.2.1.4.3. Phase chronique

□ Symptômes :

On distingue une phase chronique modérée, avec des symptômes non spécifiques tels que perte d'appétit, périodes d'abattement... La forme chronique sévère peut faire suite à une phase chronique modérée plus ou moins longue ou apparaître d'emblée.

Les symptômes de la phase chronique sévère sont peu spécifiques et extrêmement variés : **perte de poids, cachexie, anorexie, apathie, hyperthermie, déshydratation, pâleur des muqueuses....**

La **tendance aux saignements** est un signe clinique fréquemment retrouvé sous différentes formes : épistaxis dans de nombreux cas, méléna, hématomèse, hémoptysie, hématurie, hyphéma, hémorragies rétinienne, hémarthrose, hémorragies cérébrales, ecchymoses, pétéchies... De ces saignements peuvent découler les présentations cliniques les plus variées.

Une **pâleur des muqueuses** est le signe plus ou moins marqué d'une anémie très souvent présente ; des pétéchies sont également parfois observées, ou encore un ictère révélateur la plupart du temps d'une atteinte hépatique, avec hépatomégalie. Une splénomégalie et une polyadénomégalie périphérique sont parfois constatées.

Les signes digestifs observés sont variés et inconstants : vomissements, méléna, anorexie, hématomèse...

Sur le plan locomoteur, des **boiteries** dues à des hémarthroses sont un signe possible et des oedèmes des membres sont souvent observés dans les formes chroniques aux stades terminaux.

Les **signes neurologiques** rencontrés peuvent être attribués à une infiltration plasmocytaire, ou à des saignements au niveau des méninges, de la moelle épinière ou encore du cerveau. Ils sont donc également très variés : ataxie, convulsions, stupeur, motoneurone central ou périphérique, déficits des nerfs crâniens, douleur cervicale...

Des **signes dermatologiques** ont également été observés, des macules érythémateuses, un purpura et des lésions en cibles de type impétigo avec halo hémorragique.

Des **troubles oculaires** peuvent survenir : des signes de chorioretinite sont fréquemment observés dans le fond d'oeil. Un hyphéma, une uvéite antérieure ou une opacité cornéenne sont également fréquents. Les signes oculaires ne peuvent se manifester parfois que par un simple écoulement purulent ou par des suffusions conjonctivales.

Au niveau cardio-vasculaire et respiratoire, on peut observer une tachycardie et une tachypnée directement liées à l'intensité de l'anémie. L'auscultation d'un souffle cardiaque est par là même une observation inconstante. L'apparition de troubles du rythme et d'un déficit pulsatil peut être liée à des hémorragies myocardiques ou péricardiques. Des signes tels qu'une modification de la courbe respiratoire ou des bruits pulmonaires augmentés sont parfois observés, avec des opacités de type interstitielle et péri-bronchique sur les radiographies.

L'appareil uro-génital peut être le siège de différentes anomalies : hématurie, protéinurie, signes d'insuffisance rénale chronique (polyuro-polydipsie, anorexie, vomissements, ulcérations buccales...), oedème scrotal, saignements importants et prolongés durant le pro-oestrus, infertilité, avortements, saignements vaginaux après la mise-bas ou encore mortinatalité.

Enfin, le tableau clinique est très souvent enrichi et aggravé par des infections opportunistes, particulièrement chez les individus pancytopéniques. [3, 14, 25, 27]

□ Signes biologiques : [3, 14, 25, 27]

o Signes hématologiques :

Ils sont principalement dus à une hypoplasie voire une aplasie médullaire. On observe donc une **pancytopénie**, à savoir :

- Une **thrombopénie** d'origine centrale, due à une atteinte des mégacaryocytes.
- Une **anémie arégénérative**.
- Une **leucopénie**.

o Signes biochimiques :

On constate fréquemment une **augmentation des enzymes hépatiques** PAL, LDH (Lactate Déshydrogénase) et ALAT, parfois accompagnée d'une **hyperbilirubinémie modérée**.

Une **protéinurie** est parfois constatée, avec ou sans élévation de l'urémie et de la créatininémie.

L'électrophorèse des protéines sériques permet de mettre en évidence une **hyperprotéinémie** ($> 80 \text{ g/L}$), marquée par une **augmentation des fractions alpha-2, bêta et gamma**. L'albumine est généralement basse durant cette phase chronique, et l'hypergammaglobulinémie s'accroît, avec dans de rares cas une gammapathie monoclonale et une hyperviscosité sanguine. Enfin, une baisse de la protéinémie, de la gammaglobulinémie et de la globulinémie globale est souvent présente en phase terminale.

I.2.2. L'ehrlichiose à *Anaplasma platys* ou thrombopénie cyclique infectieuse

I.2.2.1. Etiologie

L'infection du Chien par *Ehrlichia platys*, récemment renommée *Anaplasma platys* [11], a été décrite pour la première fois aux Etats-Unis en 1978 [7, 27]. French et Harvey semblaient déjà penser à l'époque que sa répartition était probablement plus étendue et comparable à celle d'*E. canis*.

A. platys a en effet été décrite ultérieurement dans de nombreux autres pays d'Europe et d'Asie : Allemagne, Italie, Grèce, France, Israël, Thaïlande, Venezuela, Chine, Corée, Taïwan ou encore au Japon [7, 27]. Elle est également régulièrement observée en Espagne sous forme d'inclusion plaquettaires, sans toutefois de corrélation claire avec l'apparition de signes cliniques, ni de diagnostic étiologique précis. En 2001, *A. platys* ou un agent très proche (99,7 à 100 % d'homologie sur 345 pb de l'ARNr 16S) a été décrit chez des chiens errants du centre de l'Australie [7]. Il ne s'agit pour l'instant que d'une observation moléculaire, par PCR et séquençage, chez 10 chiens et 2 tiques du genre *Rhipicephalus sanguineus*. C'est toutefois la première description d'une ehrlichiose dans ce pays, malgré des mesures drastiques aux frontières [7, 28]. Les conditions épidémiologiques favorables - présence de très nombreux Canidés et de la tique *R. sanguineus* dans l'ensemble du pays - font redouter une possible installation de la maladie dans ce pays. Au Venezuela, une jeune fille a été présentée avec un tableau clinique d'ehrlichiose. Testée positive pour *E. chaffeensis*, mais pour aucune autre *Ehrlichia spp.*, elle présentait toutefois des inclusions

plaquettaires semblables à celles observées lors d'infections par *A. platys* chez le Chien. Les circonstances de l'infection ne sont également pas connues, mais laissent redouter un potentiel zoonotique pour cette bactérie, d'autant qu'*A. platys* est connue dans ce pays depuis 1982 [2, 27]. Comme *E. canis*, *A. platys* est principalement transmise par la tique brune du chien *Rhipicephalus sanguineus* ; les infections par *A. platys* sont d'ailleurs bien souvent accompagnées d'*E. canis*. [2, 19, 20, 26, 27, 40]. *A. platys* a également été découverte récemment dans des tiques du genre *Dermacentor auratus* prélevées sur des chiens au Vietnam [31]. Les petits rongeurs pourraient servir de réservoir pour la maladie, comme cela a été évoqué sur un camp militaire en Corée, alors que l'ADN d'*A. platys* avait été isolé dans 62 campagnols du genre *Apodemus agrarius* [27]. Des inclusions plaquettaires ont été observées également en Afrique du Sud sur des impalas (*Aepyceros melampus*). L'isolat n'a pas été génétiquement identifié, mais les auteurs supposent qu'il s'agirait d'*A. platys*, qui pourrait avoir un réservoir sauvage dans ce pays [27]. *A. platys* semble donc avoir une répartition mondiale.

I.2.2.2. Pouvoir antigénique

On connaît relativement peu cette bactérie sur le plan antigénique, du fait de l'absence de système de culture [11, 27]. Un antigène majeur d'environ 36 kDa peut être détecté par Western Blot sur la souche Louisiane d'*A. platys* [27], et des réactions croisées ont été décrites avec *A. phagocytophilum*. Par contre, il ne semble pas exister de réaction croisées avec *E. canis* [27, 42]. Comme pour les autres espèces, il semble exister une diversité à travers le monde, du point de vue génétique ; toutefois, la diversité antigénique reste à démontrer.

I.2.2.3. Etude clinique

A. platys infecte uniquement les plaquettes ; la présence d'inclusions n'a jamais été démontrée dans aucun autre tissu même après immunomarquage. Expérimentalement, l'incubation de la maladie est de 8 à 15 jours en moyenne, bien que des inclusions puissent être observées dès 6 à 8 jours après l'inoculation [27].

La forme aiguë est caractérisée par une **bactériémie cyclique** accompagnée d'une **thrombopénie**, avec une hyperactivation plaquettaire et **polyadénomégalie**. Les chiens atteints présentent rarement des signes importants, ni même des signes hémorragiques sévères, même lors de thrombopénie importante. Ce phénomène, également observé lors de purpura thrombopénique

chez l'Homme, peut être expliqué par la courte durée de la thrombopénie et par le renouvellement constant du pool plaquettaire. La thrombopénie survient dès l'apparition de plaquettes infectées dans le sang ; elle peut atteindre des valeurs très basses de l'ordre de 10 000 plaquettes/mm³. En 3 à 4 jours, le nombre de plaquettes remonte jusqu'à atteindre des valeurs subnormales et on constate simultanément la disparition des plaquettes infectées dans le sang. Puis la bactériémie, accompagnée de thrombopénies sévères, s'installe de façon cyclique, avec des intervalles de l'ordre de une à deux semaines. On note une différence notable entre la première bactériémie (31-63 % de plaquettes infectées) et les suivantes (de 1 à 13 % de plaquettes infectées seulement). Toutefois, les thrombopénies observées sont toujours aussi importantes dans les deux cas.[27]

Lors d'atteintes chroniques, cette tendance à la cyclicité s'atténue, avec des thrombopénies plus persistantes et une parasitémie plus sporadique. Les chiens atteints peuvent donc présenter une thrombopénie plus ou moins sévère ou un hémogramme normal. Dans certains cas, on a pu constater des anomalies modérées de l'hémogramme, avec une **anémie modérée, normochrome et normocytaire**, ainsi qu'une **légère leucopénie**. D'autres signes biologiques incluent une légère **hypoalbuminémie** accompagnée d'une **hyperglobulinémie, alpha-1 et gamma** essentiellement, ainsi qu'une **hypocalcémie** [27].

Il existe très peu de données récentes sur l'incidence et la répartition de cette maladie en France. Un syndrome s'accompagnant d'inclusions plaquettaires chez le Chien avait été décrit en 1985 par Beaufils [4, 5, 27]. La morphologie des inclusions ainsi que les données épidémiologiques ont permis de penser qu'il pouvait s'agir d'*A. platys* ou d'un agent très proche. Toutefois, les signes cliniques étaient bien plus importants que ceux décrits dans la littérature, avec un syndrome fébrile et des signes hématologiques importants. Tout ceci permettait de penser que la souche française était plus virulente ou que les animaux étaient plus sensibles à une maladie peut-être nouvelle. Cette dernière hypothèse peut être corroborée par le fait que, durant les quatre années de l'étude, les cas cliniques se sont faits de plus en plus rares.

Une étude prospective menée en Grèce en 1991 semble montrer également une plus grande virulence de la souche autochtone [22, 27]. Des signes tels qu'une fièvre élevée, une anorexie, une apathie et des hémorragies ont été rapportées lors d'infections expérimentales avec cette souche ; la participation d'une thrombopathie ou d'une atteinte vasculaire expliquant cette plus grande tendance aux saignements n'a toutefois pas été explorée.

Les 5 premiers cas décrits en Israël en 1997 font également mention d'une plus grande pathogénicité, avec un tableau clinique comparable au précédent. L'auteur suggère toutefois que la

participation d'*E. canis* ait favorisé l'infection à *A. platys*, ou alors qu'il s'agisse d'une souche plus virulente, compte tenu des légères variations génétiques observées [15, 27].

I.2.3. Les autres ehrlichioses du Chien

I.2.3.1. Les ehrlichioses granulocytaires

I.2.3.1.1. L'ehrlichiose à *Ehrlichia ewingii*

La tique nord-Américaine *Amblyomma americanum* est le principal vecteur d'*Ehrlichia ewingii* [27, 30]. La bactérie a également été détectée par PCR dans des tiques du genre *Dermacentor variabilis* et *Rhipicephalus sanguineus* [27]. L'aspect zoonotique de cette ehrlichiose a été mis en évidence dans le Missouri et en Oklahoma en 1999 [27]. Les infections à *E. ewingii* n'ont d'abord été rapportées qu'aux Etats-Unis, mais la bactérie a récemment été mise en évidence par PCR chez le Chien au Cameroun [30]. On a également retrouvé, dans un camp militaire Américain de Corée, des fragments d'ADN de la bactérie par PCR sur 10 % des rongeurs collectés, essentiellement des petits campagnols du genre *Apodemus agrarius* [27]. Il est probable que la maladie ait été importée dans ce pays et que les rongeurs y constituent un réservoir.

E. ewingii n'étant pas disponible en culture à ce jour, on manque d'informations quant à ses caractéristiques antigéniques notamment [27].

Trois grandes présentations cliniques ont été décrites en association avec *Ehrlichia ewingii* : une **anémie chronique modérée à sévère**, un **syndrome fébrile aigu avec thrombopénie**, et un **syndrome ambulatoire polyalgique dû à une polyarthrite neutrophilique**.

Les signes cliniques observés sont le plus souvent fièvre, léthargie, anorexie, pica, boiteries, vomissements ou encore diarrhée. A l'examen, on note différents symptômes tels qu'un souffle cardiaque (souffle d'anémie), des douleurs articulaires, une hépatosplénomégalie ou des bruits pulmonaires surajoutés. Quelques signes d'une tendance hémorragique peuvent parfois être notés : hémorragies aux sites de ponctions veineuses, vomissements ou diarrhée hémorragiques, pétéchies suite à la tonte.

Les signes hématologiques et biologiques associés peuvent être une anémie centrale normochrome et normocytaire, une thrombopénie fugace, sévère à modérée, avec une mégathrombocytose, une hyperglobulinémie, une hypoalbuminémie, une élévation des enzymes

hépatiques plasmatiques (PAL et ALAT), un test de Coombs parfois positif et des réserves en fer diminuées. Un myélogramme peut mettre en évidence une hyperplasie myéloïde. Des inclusions dans environ 1 à 7 % des granulocytes sanguins et dans environ 1 % des précurseurs myéloïdes peuvent être observées. Lors de tableaux cliniques dominés par une polyarthrite, il est par contre rare d'observer des *Ehrlichia* sur les frottis sanguins, mais on peut en observer dans quelques neutrophiles présents dans les liquides de ponctions articulaires. [27]

I.2.3.1.2. L'ehrlichiose à *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum est une nouvelle espèce qui regroupe trois entités: *Ehrlichia phagocytophila*, l'agent de la fièvre à tique des petits ruminants, *Ehrlichia equi*, responsable de l'ehrlichiose granulocytaire du cheval, et l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine (HGE) [11, 27, 34, 35].

- Épidémiologie:

L'épidémiologie de cette affection semble très intimement liée à celle de la maladie de Lyme, mondialement répandue. Le vecteur de cette *Anaplasma* est en effet, comme pour *Borrelia burgdorferi*, la tique dure *Ixodes ricinus* en Europe et en Afrique du Nord [21, 34, 35]. D'autres *Ixodes spp.* comme *I. trianguliceps*, *I. scapularis* et *I. pacificus* aux Etats-Unis, ou *I. persulcatus* en Chine peuvent apparemment l'héberger. *Ixodes dentatus* semble également être un vecteur compétent expérimentalement, ce qui évoque la possibilité d'un cycle épidémiologique faisant intervenir les oiseaux. [27]

Les pays concernés par cette maladie sont très nombreux en Europe. L'ehrlichiose granulocytaire, humaine et animale, concerne de nombreux pays comme la France, l'Allemagne, la Hollande, l'Italie, le Royaume-Uni, la Suisse, le Danemark, la Suède, la Norvège, la Slovénie [27, 35]. Elle semble atteindre le Nord du continent Africain par la Tunisie et le Maroc [27, 34]. En France, son incidence chez le Chien reste encore inconnue, et elle est également probablement sous-diagnostiquée chez l'Homme. La maladie sévit de façon anadémique et biphasique, au printemps et à l'automne.

Aux Etats-Unis, des cas ont été décrits au Minnesota, au Wisconsin, en Virginie, en Caroline du Nord, au Connecticut (Rhode Island), dans l'Etat de New-York, dans l'Oklahoma, en Arkansas ou encore en Californie. La maladie concerne donc essentiellement le Nord-Est, le Nord du Midwest des Etats-Unis et la Californie. [27, 32]

Cette maladie sévit également en Asie. Une étude sérologique a été menée sur 49 chiens malades en Thaïlande ; 58 % des chiens étaient séropositifs, et 2 d'entre eux n'étaient positifs en IFI et en Western Blot que pour ce germe. Il semble donc qu'*A. phagocytophilum* puisse exister dans ce pays et entraîner des symptômes chez le Chien, bien qu'aucun agent n'ait été isolé par PCR sur les deux individus. Notons qu'il existe de possibles réactions croisées lors d'infections chroniques par *E. canis* sur les antigènes d'*A. phagocytophilum*, au moins pour la souche Israéli d'*E. canis*. [27]

- Signes cliniques:

L'éhrlichiose granulocytaire décrite en Europe survient de façon aiguë, entraînant des signes cliniques sévères tels qu'une **hyperthermie importante** (40,5°C), de l'**apathie** ou de l'**anorexie**, pouvant persister plusieurs jours. D'autres signes peuvent être retrouvés (diarrhées, signes neurologiques...). Le signe hématologique le plus constant semble être la **thrombopénie** ; **l'anémie ou la leucopénie sont plus rarement décrites**. Le pourcentage de neutrophiles infectés peut être élevé, allant de 7 à 21 %. La description de 6 cas détectés au Royaume-Uni et diagnostiqués par PCR (gène *epark1*) fait mention pour 5 d'entre eux de **signes neurologiques de type méningite et/ou de polyarthrite**, alors qu'une thrombopénie n'est présente que sur 3 de ces chiens. La présentation clinique incluait abattement, fièvre et **douleurs articulaires et/ou cervicales**. Aucune inclusion n'a pu être mise en évidence, mais la PCR positive et l'amélioration rapide des signes cliniques sous doxycycline semblent confirmer que, tout comme *E. ewingii*, les souches d'*A. phagocytophilum* rencontrées en Europe peuvent entraîner des signes nerveux et articulaires.[27]

On retrouve les mêmes signes cliniques et biologiques dans la plupart des cas décrits aux Etats-Unis, qui sont assez diversifiés et pour lesquels la polyarthrite semble moins constante que lors d'éhrlichiose à *E. ewingii* [27]. Une étude récente réalisée dans l'Etat de Washington décrit 8 cas de chiens présentant une hyperthermie, un abattement et une anorexie associés à une lymphopénie, une thrombopénie et des PAL augmentées [32].

I.2.3.2. Les ehrlichioses non granulocytaires

I.2.3.2.1. L'éhrlichiose à *Ehrlichia chaffeensis*

Une « rickettsie » génétiquement très proche d'*E. canis* a été isolée chez un patient humain en 1986. Puis aux Etats-Unis, de nombreux cas diagnostiqués chez l'Homme comme des « fièvres

pourprée des montagnes rocheuses» (infection à *Rickettsia rickettsii*) furent reconsidérés, et les sérums ont été testés rétrospectivement pour *E. canis*. Les nombreux cas positifs trouvés ont soulevé à nouveau le problème de l'aspect zoonotique de la maladie. L'agent étiologique fut isolé du sérum d'un patient en 1990. Elle fut baptisée *Ehrlichia chaffeensis* et montre une similitude de 92.8% au niveau du gène de l'ARNr 16S avec *Ehrlichia canis*. [27]

Chez l'Homme, la maladie se caractérise par des signes cliniques fébriles (hyperthermie, maux de tête, myalgies...) et peut être fatale en l'absence de traitement. On a pu montrer expérimentalement la sensibilité du Chien à *Ehrlichia chaffeensis* par inoculation de parasites en culture. *Dermacentor variabilis*, la tique américaine du Chien, ou encore *Amblyomma americanum*, peuvent en être les vecteurs. [12, 27]

E. chaffeensis a également été isolée en Chine dans des tiques du genre *Amblyomma testudinarium* et *Haemaphysalis yeni* [27]. Au Vietnam, une souche proche d'*E. chaffeensis* a été isolée dans des tiques du genre *Hemaphysalis hystricis* [31], de même au Japon dans des tiques du genre *Ixodes ovatus* [36] En Afrique du Sud, une enquête sérologique a permis de détecter des chiens positifs en IFI pour *E. chaffeensis* avec des titres supérieurs à ceux observés pour *E. canis*, ce qui peut supposer la présence de cet agent pathogène chez le Chien dans ce pays [27]. Dans une étude plus récente, un rôle pathogène important d'*E. chaffeensis* a pu être mis en évidence chez des chiens atteints naturellement. Ces chiens seraient d'ailleurs plus réfractaires au traitement à base de doxycycline. Toutefois, il est difficile de savoir aujourd'hui si cette persistance de l'agent pathogène est due à une moindre efficacité de l'antibiotique, ou simplement à une réinfestation liée au contact permanent avec le vecteur. Le dipropionate d'imidocarb serait une alternative thérapeutique efficace.[12, 27, 36]

I.2.3.2.2. L'ehrlichiose Sud-Africaine

En Afrique du Sud, les chiens présentant des symptômes caractéristiques d'ehrlichiose sont souvent négatifs aux PCR utilisant des amorces spécifiques du gène de l'ARNr 16S des souches d'*Ehrlichia canis* Nord-Américaines.

Une équipe d'Onderstepoort a donc testé par PCR des échantillons de chiens malades et de chiens asymptomatiques provenant d'un chenil, avec des amorces d'*E. (Cowdria) ruminantium*, *Ehrlichia spp.* et *Anaplasma spp.* ; 72 % des échantillons ont donné un résultat positif pour *E. ruminantium*, et aucun pour les deux autres couples d'amorces testées [27]. Il semble donc que ce nouveau germe sud-africain soit très proche d'*E. ruminantium*. L'étude du séquençage des gènes de

la fraction légère 16S de l'ARN a montré une forte homologie avec la souche Mara87/7 d'*E. ruminantium*. Parmi les chiens testés dans cette étude, certains étaient en quarantaine, en provenance d'autres pays d'Afrique ; 8 chiens sur 17 étaient positifs pour la PCR sur le gène pCS20, spécifique d'*E. ruminantium*. Ceci tend à montrer que le chien peut être porteur de ce germe dans divers pays. Cet agent n'a pas pu être mis en culture et son pouvoir pathogène chez le Chien n'a pas été testé. On n'a donc pas pu mettre en évidence de corrélation entre la clinique et l'isolement et l'amplification de ces gènes par PCR, d'autant plus qu'aucune inclusion n'a été observée chez ces animaux [27].

I.2.3.2.3. L'ehrlichiose à *N. risticii* var atypicalis

N. (Ehrlichia) risticii est l'agent de l'ehrlichiose monocyttaire des équidés ou fièvre de Potomac, causant une maladie souvent grave chez le Cheval. Elle a été décrite chez cet animal essentiellement aux Etats-Unis, mais aussi en Europe et en France. Le vecteur de cette maladie est un trématode parasite de poisson, d'escargots ou d'insectes aquatiques.

Des infections expérimentales passant inaperçues cliniquement ou entraînant des symptômes modérés ont été décrites chez le Chien: il aurait donc un rôle épidémiologique de réservoir pour cette maladie. La description aux Etats-Unis de cas d'ehrlichioses canines atypiques naturelles a permis de renforcer cette suspicion : les chiens présentaient des signes hémorragiques souvent sévères, des oedèmes, de la fièvre, une polyarthrite, une anémie et une thrombopénie. La sérologie en IFI était négative pour *E. canis* mais positive pour *N. risticii*.

L'isolement de cette *Ehrlichia* sur des monocytes canins a pu être effectuée, ainsi que des analyses d'hybridation et de PCR, qui ont permis de montrer que cet agent était fortement similaire, morphologiquement et génétiquement, à *N. risticii*.

En Europe, des cas canins séronégatifs pour *E. canis* mais positifs pour *N. risticii* ont été décrits, mais l'agent pathogène n'a pas été isolé et n'est donc pas clairement identifié [27].

I.2.3.2.4. L'empoisonnement au saumon

Cette ehrlichiose, due à *Neorickettsia helminthoeca*, n'existe qu'aux Etats-Unis. Elle a été décrite pour la première fois chez le Chien en 1950. Elle est surtout décrite sur la côte Ouest des Etats-Unis ; cette localisation est liée à celle de l'hôte intermédiaire, *Oxytrema silicula*, un escargot que l'on ne retrouve que dans ces régions. La transmission se fait par l'ingestion de saumon ou de salamandres parasités par un trématode (*Nanophyetus salmonicola*) dont les métacercaires peuvent

héberger la bactérie. Les animaux atteints naturellement sont les chiens, renards (*Vulpes vulpes*, *Vulpes fulva*...) et coyotes (*Canis latrans*).

N. helminthoeca parasite essentiellement les cellules mononucléées et principalement les lymphocytes et les macrophages des villosités intestinales et des ganglions mésentériques, mais rarement ceux du sang. Les signes cliniques sont assez caractéristiques et évoquent une parvovirose: fièvre, abattement, anorexie, amaigrissement, déshydratation, diarrhée aqueuse parfois hémorragique, et vomissements. La mortalité est très importante en l'absence de traitement, mais les chiens atteints acquièrent une immunité solide pendant au moins 56 jours. [27]

I.2.4. Les infections multiples

De très nombreuses études rapportent aujourd'hui des cas d'infections multiples par plusieurs agents pathogènes transmis par les tiques, ou tout au moins une exposition à plusieurs espèces d'*Ehrlichiae* et d'autres « arbo-bactérioses » ou protozooses [3, 14, 25, 27, 38]. Dans une même zone, plusieurs espèces de tiques sont susceptibles de transmettre différents agents pathogènes, et il semble également que certains de ces agents puissent s'adapter à de nouveaux vecteurs:

- *Rhipicephalus sanguineus* transmet *Ehrlichia canis*, mais également *Babesia canis* ou *B. gibsoni*, *Hepatozoon canis*, certaines *Rickettsia spp.* et probablement *Bartonella vinsonii*, *E. ewingii* ou encore *A. platys*.

- Les tiques du genre *Ixodes spp.* transmettent *A. phagocytophilum*, mais aussi *B. gibsoni* et *B. canis*, certaines *Rickettsia spp.* ou *Borrelia burgdorferi*.

- *Amblyomma americanum* transmet *E. chaffeensis*, *E. ewingii* ou encore certaines *Rickettsia spp.*

L'infection par plusieurs espèces bactériennes ou parasites peut provenir de la transmission de plusieurs agents pathogènes par la même tique, mais aussi par la morsure simultanée de plusieurs espèces différentes de tiques, ou par la persistance d'infections chroniques transmises par différentes tiques à des moments différents. Les chiens sont susceptibles, bien plus que l'Homme, à des morsures multiples de tiques de même espèce, voire d'espèces différentes ; ils sont probablement victimes d'espèces et de stades plus variés que l'Homme et pourraient ainsi servir de sentinelles pour prévoir certaines infections humaines.

En 1965, Ewing décrivait déjà les manifestations combinées d'infections par *Babesia canis* et *Ehrlichia canis* chez le Chien [27]. En France, *Babesia canis* semble avoir une distribution comparable à celle d'*E. canis*. Notons que les babésioses ne sont pas décrites en Guadeloupe.

Pour certains auteurs, la présence d'*E. canis* permettrait de révéler des infections à *A. platys* [2, 27]. La présence d'*E. canis* lors d'infection multiple semble être d'ailleurs non seulement un facteur associé à la présence de signes cliniques mais aussi à un pronostic plus sombre [27].

L'infection par plusieurs agents pathogènes est donc certainement responsable de modifications cliniques, biologiques, thérapeutiques et pronostiques par rapport à toutes ces maladies isolées. Il est d'ailleurs probable que les infections multiples représentent un biais important dans les études rétrospectives cliniques, et qu'elles expliquent au moins pour partie la diversité de présentations cliniques des ehrlichioses [27]. C'est également une explication retenue par Suksawat et coll. pour expliquer la plus grande pathogénicité apparente d'*E. canis* en Thaïlande [38].

Enfin, la recherche d'infections multiples devrait permettre de détecter et de mieux définir certaines maladies mal connues comme la bartonellose canine à *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii*, récemment décrite chez le Chien et associée à des signes graves de lymphadénites, d'endocardites ou de rhinites granulomateuses. Les infections par cette *Bartonella sp.* et *E. canis* semblent fréquentes aux Etats-Unis [27].

Ainsi, le Chien peut être naturellement infecté par plusieurs espèces d'*Ehrlichieae* issues de tous les groupes -*E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *N. helminthoeca*... -et développer des signes cliniques qui ne permettent souvent pas de faire la différence entre ces différentes infections. De plus, dans les régions concernées par plusieurs types d'ehrlichioses, de rickettsioses, de babésioses, de bartonelloses, par l'hépatozoonose, la borréliose de Lyme ou encore par d'autres agents d'infections opportunistes, des infections multiples sont possibles, et sont à même de modifier le tableau clinique et le pronostic. Même si les connaissances sur certaines entités sont encore récentes et mal définies, le clinicien vétérinaire doit donc être à même d'intégrer ces nouvelles données afin d'établir une stratégie diagnostique cohérente de ces différentes maladies, de connaître les facteurs pronostiques, et de proposer le meilleur traitement ainsi qu'un suivi adapté à chaque animal.

I.3. Le diagnostic des ehrlichioses canines

I.3.1. Les facteurs de risque

I.3.1.1. La répartition géographique

Le Tableau 2 fait le point sur la répartition des ehrlichioses à travers le Monde et sur leurs différents vecteurs. Seules *E. canis* et *A. platys* sont considérées aujourd'hui comme ubiquitaires, les autres semblant avoir des localisations géographiques plus limitées ; toutefois, les ehrlichioses granulocytaires dues à *A. phagocytophilum* sont de plus en plus rapportées dans de nombreux pays à travers le Monde, principalement chez l'Homme [9, 27, 29, 32].

Les ehrlichioses sévissent généralement de façon endémique et la répartition est liée au vecteur ; mais il semble également, au moins expérimentalement, que les *Ehrlichieae* puissent s'adapter à d'autres vecteurs. Les réservoirs potentiels sont variables et beaucoup sont encore hypothétiques ; l'adaptation à de nouvelles espèces permettrait aussi l'expansion géographique de ces maladies. Pour *E. canis*, on pense toujours que les chiens infectés de façon chronique, les formes imaginaires de *R. sanguineus*, et les Canidés sauvages sont les seuls réservoirs de la maladie. Toutefois, l'ADN d'*E. canis* a pu être détecté par PCR sur des petits rongeurs [27]. Ceci expliquerait en partie l'expansion de certaines formes d'ehrlichioses, aux Etats-Unis mais aussi en Europe. Une meilleure connaissance des différents vecteurs et de leur répartition géographique permettra une meilleure approche diagnostique des ehrlichioses.

I.3.1.2. L'incidence saisonnière

Les ehrlichioses du Chien sont des maladies mondialement connues, sévissant de façon endémique et potentiellement anadémique, durant toute l'année avec un pic durant les mois d'été et d'automne [14, 27, 33].

I.3.1.3. Les facteurs de prédisposition

La race peut être un facteur de prédisposition : il semble que le Berger allemand soit particulièrement sensible à l'ehrlichiose monocyttaire, expérimentalement comme naturellement [43].

La présence d'une maladie intercurrente ou d'un traitement immunosuppresseur pourrait également favoriser l'apparition d'une maladie parfois latente, ou simplement favoriser une infection par une souche peu virulente [14, 27, 33].

I.3.2. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel s'avère très complexe compte tenu des multiples présentations cliniques des ehrlichioses. Nous présenterons les principaux éléments de celui-ci.

Cliniquement, les ehrlichioses pourront principalement s'inscrire, comme nous l'avons vu, dans le diagnostic différentiel des maladies cachectisantes chroniques, des fièvres inexpliquées, des polyarthrites ou encore des syndromes hémorragiques, avec principalement épistaxis et pétéchies. Mais l'existence de présentations cliniques variées (uvéites, troubles neuro-musculaires, oedèmes...) doit laisser un champ plus large dans un contexte épidémiologique et biologique favorable.

Du point de vue biologique, on notera surtout l'importance du diagnostic différentiel des thrombopénies (principalement les thrombopénies à médiation immune), des anémies ou encore des affections avec une hyperglobulinémie persistante (maladies infectieuses ou parasitaires chroniques, certaines néoplasies...). Il est particulièrement important de considérer les affections ou syndromes suivants [3, 14, 25, 27]:

- Les autres maladies à tiques, notamment si l'animal est porteur de tiques au moment du diagnostic ou provient d'un milieu très exposé : **babésioses** (piroplasmose), **hépatozoonose**, **bartonelloses**, autres **rickettsioses**, **maladie de Lyme**... Comme nous avons pu le voir, des infections dues à plusieurs agents sont possibles.

- La **leishmaniose** dans les zones endémiques (Bassin méditerranéen),
- Les **thrombopénies** cliniques ou non
- Les **arthrites et polyarthrites**, particulièrement les formes non érosives, dont le **lupus érythémateux systémique**,
- Les autres **maladies cachectisantes d'évolution chronique** : néoplasies, maladies auto-immunes, infections chroniques...

Les Tableaux 6 et 7 et les figures 4 et 5 montrent les différentes maladies à considérer lors du diagnostic différentiel d'ehrlichioses, avec leurs principales données cliniques et biologiques, et les éléments du diagnostic.

Tableau 6 : Diagnostic différentiel de la thrombopénie chez les carnivores domestiques

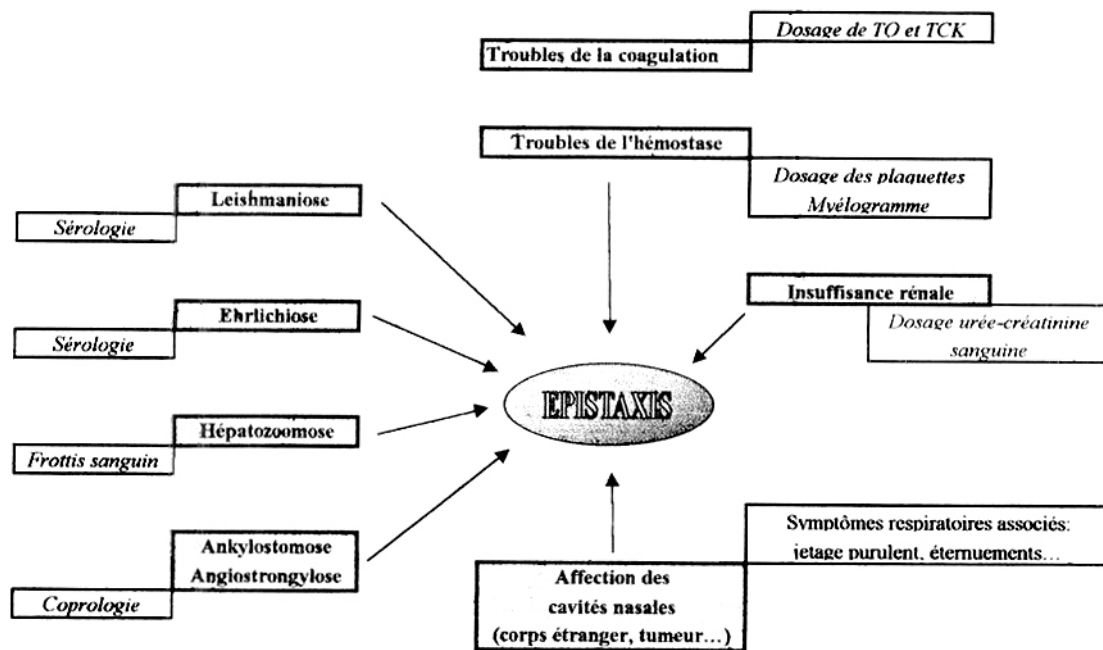
Maladies	Etiologie	Diagnostic
Thrombopénies à médiation immune		
Primaires	<i>Idiopathiques</i> Lupus érythémateux systémique Syndrome d'Evans	Mégacaryocytose médullaire Anémie hémolytique, AcAN Diagnostic thérapeutique
Secondaires	Infectieuses (dont Ehrlichioses) Médicamenteuses* Vaccinales** Néoplasiques Allo-immunisation	Mégacaryocytose médullaire Diagnostic étiologique <i>Diagnostic d'exclusion</i> Diagnostic thérapeutique
Thrombopénies de consommation	<i>CIVD : infectieuse, mécanique, toxique, néoplasique, inflammatoire, etc...</i> Affections thrombogènes Microangiopathies, vascularites (Ehrlichiose) (Hémorragies)	Troubles de la coagulation Diagnostic étiologique
Thrombopénies centrales	Infectieuses (dont Ehrlichioses) Toxiques / Médicamenteuses Néoplasiques Idiopathiques	Hypoplasie ou Aplasie médullaire
Thrombopénie liée à une séquestration plaquettaire	Splénique : inflammatoire (dont Ehrlichiose), congestive, infiltrative (néoplasique) Hépatique ou vasculaire : Néoplasique Mixte (hépatique et pulmonaire) : Endotoxémie	Splénomégalie Hépatomégalie Imagerie médicale

* dont céphalosporines, sels d'or, oestrogènes et sulfamides chez le chien. Potentiellement : autres anti-infectieux, anti-inflammatoires, anti-convulsivants, médicaments à visée cardiovasculaire...

** vaccin contre la maladie de Carré

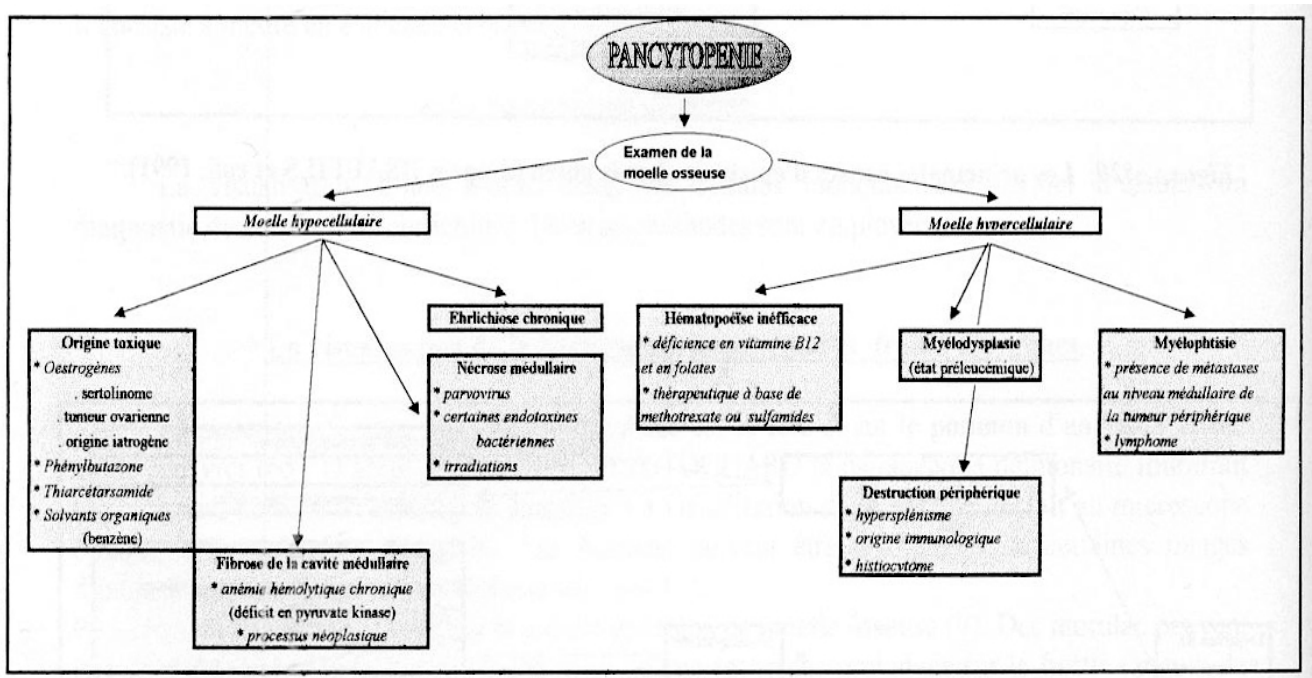
D'après Martin [27]

Figure 4 : Les principales causes d'épistaxis chez le Chien



D'après Gouvernayre [14]

Figure 5 : Diagnostic différentiel de la pancytopenie chez le Chien



D'après Gouvernayre [14]

Tableau 7 : Principales affections entrant dans le diagnostic différentiel de l'éhrlichiose monocyttaire canine

Maladie	Etiologie / Epidémiologie	Dominantes Cliniques et Biologiques	Diagnostic Différentiel
Thrombopénies à médiation immune	Auto-immun primaires ou secondaires : médicamenteuse, vaccinale, infectieuse, néoplasique, etc... Cf. Encadré 2 Cockers, caniches... Femelles d'âge moyen	Inconstants : Anorexie, abattement, épistaxis , hémochésie, hémorragies muqueuses ; parfois troubles neurologiques ou oculaires secondaires aux saignements. Thrombopénie !	Sérologies ehrlichioses Hyperthermie et adénomégalie rares NB : Parfois liée à une ehrlichiose => Traitement des deux affections possible en attendant le diagnostic.
Lupus érythémateux systémique	Auto-immuns (Auto-Ac) Familial (Bergers Allemands ...) lié au CMH de classe DLA-A7 Chiens adultes (6 ans)	Signes généraux (baisse de forme, hyperthermie, anorexie, amaigrissement, fonte musculaire) et multi-organiques (neuro-musculaires, locomoteurs, cutanés, rénaux, hématologiques, cardio-vasculaires...) Apparition intermittente, variable en intensité.	Epidémiologie Evolution clinique Dosage des AcAN Sérologies ehrlichioses
Myélome multiple	Néoplasie : Rare Chiens de races pures (Bergers allemands) Age moyen à âgé.	Symptômes liés à une lyse osseuse ou à une HSV : Abattement, anorexie , douleurs osseuses, boîtiers, saignements, pâleur des muqueuses , amaurose, PUPD (protéinurie de Bence-Jones)...	EPS : gammopathie monoclonale (rare lors d'ehrlichiose) Radiologie (lésions focales) Cytologie (myélogramme) Sérologies ehrlichioses
Leucémie lymphoïde chronique (LLC) et Lymphomes	Néoplasies Lymphomes : diverses formes, fréquentes LLC : rares	Signes généraux +/- (apathie, anorexie, perte de poids, hyperthermie) Selon les formes : Polyadénomégalie, troubles digestifs, locomoteurs, neurologiques, ophtalmologiques ou respiratoires.	Histologie/Cytologie (MOH, NL, sang) Imagerie médicale Sérologies ehrlichiose
Brucellose	Due à <i>Brucella canis</i> (également : <i>B. melitensis</i> , <i>abortus</i> ou <i>suis</i>) Rares	Chiens mâles : œdème scrotal, adénopathies, uvéites , discospondylites	Sérologies Cause de l'œdème scrotal (culture) Histologie/Cytologie (NL)

Maladie	Etiologie / Epidémiologie	Dominantes Cliniques et Biologiques	Diagnostic Différentiel
Babésioses (Piroplasmose)	Dues à <i>Babesia canis</i> et <i>B. gibsoni</i> Vecteurs : Ixodidés (<i>R. sanguineus</i> , <i>Ixodes spp...</i>)	Principales : Abattement, hyperthermie, anorexie, muqueuses pâles , ictères, hémoglobinurie (anémie hémolytique) Autres : Thrombopénie, polyadénomégalie, splénomégalie	Cytologie (frottis sanguin) Sérologies NB : Co-infections possibles
Hépatozoonose	Due à <i>Hepatozoon canis</i> Vecteur : R.sanguineus Sud des USA / Bassin méditerranéen	Fièvre, anorexie, perte de poids , diarrhées sanglantes, atrophie musculaire, hépatosplénomégalie , troubles neuromusculaires.	Sérologies - Cytologie Biopsies musculaires Radiologie (réactions périostées) Absence de thrombopénie Co-infections possibles [177]
Maladie de Lyme	Due à <i>Borrelia burgdorferi</i> Vecteurs : Ixodes spp. Répartition Mondiale Animaux jeunes surtout	Polyarthrites récurrentes Inconstants : Anorexie, abattement, adénomégalie (poplitées, cervicaux) Parfois : troubles cardiaques, neurologiques et rénaux	Sérologies Arthrocentèse
Fièvre pourprée des Montagnes rocheuses	Due à <i>Rickettsia rickettsii</i> Vecteurs : Dermacentor sp. - Amblyomma sp. Répartition : USA (Mississippi, Kansas, Texas, Oklahoma, Caroline Nord et Sud) Sévit de mars à octobre Jeunes chiens de race pure (Bergers Allemands)	Principales : Hyperthermie, abattement, anorexie, oedèmes cutanés, polyalgies. Thrombopénie, anémie centrale, hypoalbuminémie. Autres : polyadénomégalie, troubles hémorragiques (épistaxis, ecchymoses, pétéchies), détresse respiratoire, troubles neurologiques et ophtalmologiques.	Epidémiologie Sérologies IFD (théorique) NB : Diagnostic sérologique tardif Co-infections possibles Traitement identique
Leishmaniose viscérale	Due à <i>Leishmania infantum</i> Liée au vecteur : le phlébotome (<i>sandfly</i>)	Anorexie, perte de poids, épistaxis, hyperthermie, splénomégalie , lésions cutanées (ulcérations...), polyadénomégalie. Thrombopénie, hyperglobulinémie, hypoalbuminémie, protéinurie. Autres : polyalgies, vomissements, méléna, signes d'IRC	Epidémiologie Sérologies Histologie/Cytologie

D'après Martin [27]

Hormis le cas particulier de l'infection par *N. helminthoeca*, il n'existe pas de standard pour le diagnostic des ehrlichioses, mais plutôt des degrés de certitude évalués sur des critères épidémiologiques, cliniques, hématologiques, sérologiques, et confirmés par des outils de biologie moléculaire. Les principaux signes cliniques sont non spécifiques, avec une signification particulière des tendances hémorragiques ou des polyarthralgies, qui sont toutefois inconstantes. Les signes hématologiques (thrombopénie, anémie) et biochimiques (hyperglobulinémie) sont également précieux.

I.3.3. Les examens complémentaires

I.3.3.1. Examens réalisables chez le vétérinaire

I.3.3.1.1. Frottis sanguins

Un examen attentif des frottis sanguins colorés au May-Grünwald et Giemsa (MGG) permet de rechercher des inclusions cytoplasmiques.

- Morphologie et cellules infectées :

Les inclusions d'*Ehrlichiae* se présentent sous plusieurs formes. La forme classique de morula est la plus caractéristique. Elle se présente sous la forme d'une inclusion de 2,5 à 4 µm de diamètre, de couleur mauve et en forme de mûre, qui lui a valu son nom.

Toutefois, la morphologie des inclusions peut varier, notamment entre les cas d'infections naturelles et expérimentales, ou après la mise en culture. Ainsi, il est possible d'observer des morulas très condensées ou encore des formes plus lâches. Elias avait également décrit plusieurs formes d'inclusions associées à l'ehrlichiose monocyttaire, dont une forme d'inclusions lymphocytaires violacées, de 0,2 à 0,4 µm de diamètre, qu'il ne faut pas confondre avec des inclusions de lymphocytes T CD8⁺ ou de cellules NK [5, 14, 27].

La deuxième forme décrite consistait en des inclusions plus larges (1,2 à 1,5 µm de diamètre) rondes à ovales en grappes irrégulières, qui pourraient correspondre à des morulas en cours de formation. Les espèces autres qu'*E. canis* peuvent également donner des inclusions différentes. Rappelons que chaque espèce d'*Ehrlichia* parasite des cellules sanguines qui lui sont propres. Le Tableau 8 regroupe les données concernant les cellules cibles et la morphologie des différentes espèces d'*Ehrlichiae* atteignant le Chien.

Tableau 8 : Cellules cibles et morphologie des différentes espèces d'*Ehrlichiae* atteignant le Chien

Espèces	Cellule(s) cible(s)	Types d'inclusions
<i>E. canis</i>	Lymphocytes Monocytes - Macrophages	Morulas Inclusions lilas (corps élémentaires)
<i>A. platys</i>	Plaquettes	Morulas
<i>A. phagocytophilum</i>	Granulocytes (neutrophiles)	Morulas de 1,5 à 6 µm
<i>E. ewingii</i>	Granulocytes neutrophiles	Morulas
<i>E. chaffeensis</i>	Lymphocytes Monocytes - Macrophages	Morulas
<i>N. helminthoeca</i>	Macrophages (noeuds lymphatiques uniquement)	Nombreuses petites inclusions granuleuses fortement basophiles
<i>N. risticii</i> var. <i>atypicalis</i>	Monocytes	-

D'après Martin [27]

La recherche de morulas d'*Ehrlichiae* monocytaires (*E. canis*, *N. risticii*) et d'*A. platys* s'avère difficile et parfois infructueuse, du fait du nombre limité de cellules parasitées, de la faible représentation de ces lignées cellulaires (monocytes, lymphocytes), et de la présentation fréquente des chiens en phase chronique de la maladie au moment du diagnostic, avec une bactériémie limitée. Il faudra rechercher *E. canis* aussi bien dans les lymphocytes que dans les monocytes, contrairement aux descriptions initiales ; cette observation est probablement liée à la plus grande quantité de lymphocytes présents sur les frottis. Ainsi, certains auteurs ont relevé plus de 90 % des inclusions dans les lymphocytes [27].

L'infection expérimentale du Chien par *A. phagocytophilum* se résume à des taux limités de granulocytes neutrophiles et éosinophiles infectés, de l'ordre de 0,5 à 3%, contrairement aux taux élevés de neutrophiles infectés (> 90 %) observés chez le Mouton en phase fébrile d'ehrlichiose granulocytaire. Des valeurs sensiblement identiques (4%) dans deux observations d'ehrlichiose granulocytaire naturelle ont été rapportées. Des valeurs similaires sont rapportées pour les infections à *E.ewingii* [27].

Dans une étude de Mylonakis portant sur 50 chiens en phase aiguë d'ehrlichiose monocyttaire, les frottis réalisés sur le sang périphérique n'ont permis d'apercevoir que 1 à 3

morulas par lame (médiane à 2) après examen de 1000 champs en immersion, ce qui représente tout de même une heure de travail pour un oeil averti. [cité dans 27]

- Sensibilité :

Outre le faible nombre de cellules parasitées sur les frottis, la fugacité des bactériémies ou leur cyclicité, souvent rapportés lors d'infections par *A. platys* notamment, laissent à cet examen direct une faible sensibilité. La probabilité d'observer des inclusions en phase fébrile de la maladie est toutefois plus importante. La sensibilité a surtout été rapportée pour *E. canis*. [3, 14, 25, 27]

Une seule étude rétrospective menée sur 15 chiens rapporte une sensibilité proche de 50 % pour la détection d'*E. ewingii* sur frottis sanguin [cité dans 27].

Une étude récente sur 50 chiens avec un diagnostic avéré d'ehrlichiose monocyttaire aiguë (PCR positive, IFI positive, réponse au traitement et absence d'autres inclusions sanguines) a permis de mettre en évidence une sensibilité de 8 % seulement sur des frottis de sang périphérique, ce qui confirme encore l'intérêt limité de cette méthode, même lors d'ehrlichioses aiguës. Dans cette même étude l'incubation d'un prélèvement sanguin (10 mL) à 37°C durant 48 à 96 heures n'a pas permis d'augmenter nettement la sensibilité de l'examen (14,6 %) mais permet d'observer beaucoup plus de morulas sur les frottis (de 1 à 52, médiane à 10) [cité dans 27].

Seule la technique de leucoconcentration permet d'augmenter nettement la sensibilité de l'examen. Une double centrifugation permet de récupérer la couche leucoplaquettaire ("buffy-coat") qui sera étalée sur lame avec précaution. La figure 6 illustre deux méthodes de leucoconcentration.

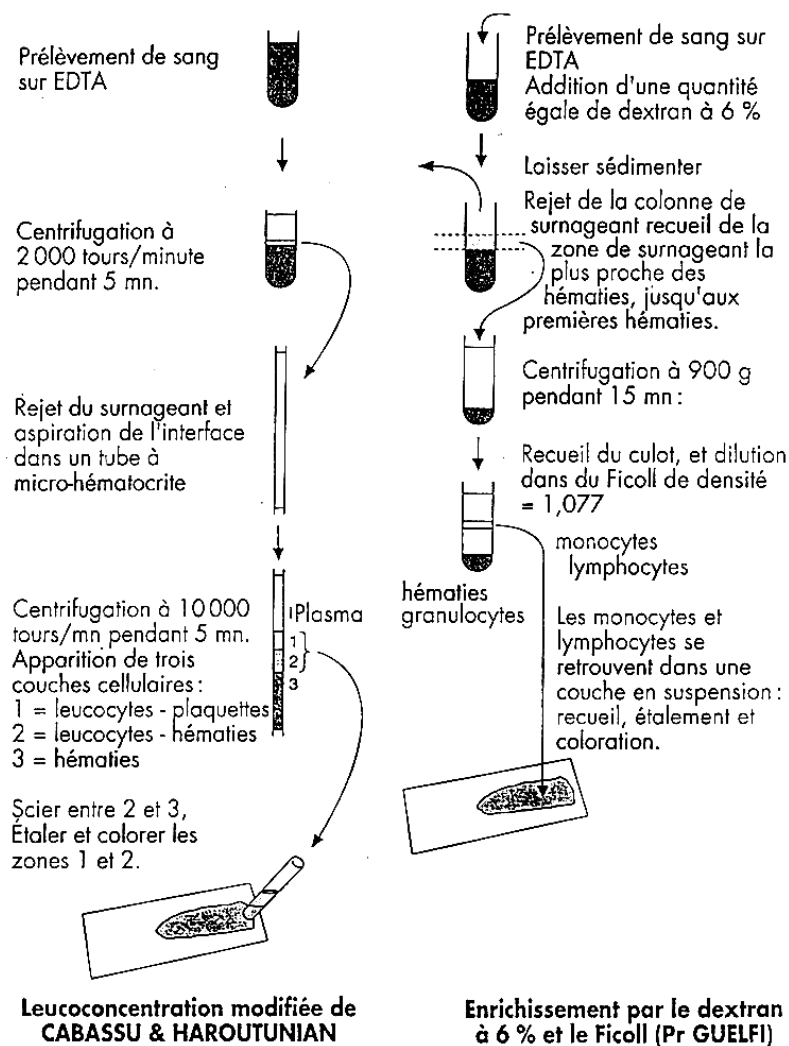
- Spécificité :

Cette étape diagnostique est simple et peu coûteuse, mais il est important de bien connaître la morphologie des différentes inclusions, ainsi que les cellules parasitées, afin de ne pas poser de diagnostic par excès. Les morulas d'*Ehrlichiae* peuvent en effet être facilement confondues avec d'autres images en microscopie optique :

- Les images d'**érythrophagocytose**, notamment observées lors de babésiose canine.
- Des **plaquettes phagocytées**, ou simplement **en superposition avec un leucocyte**.
- Des **granules lymphocytaires**, qui prennent eux une coloration plutôt azurophile. Il s'agit de petites inclusions observées dans les grands lymphocytes (lymphocytes T cytotoxiques ou cellules NK). Ces cellules peuvent toutefois être présentes en grande quantité lors d'affections chroniques comme l'ehrlichiose ou la brucellose, et peuvent alors constituer un signe d'appel. Mais elles existent également lors de certaines leucémies [5, 27].

- Des **corps lymphoglandulaires**, qui sont des fragments de cytoplasme provenant de cellules fragiles (lymphocytes surtout) écrasées lors de l'étalement. Ces inclusions libres présentent une forme ronde, discrète et fortement basophile, à ne pas confondre avec une morula libre. C'est pourquoi les étalements doivent être réalisés avec douceur, en particulier avec le « buffy coat ».
- Des **corps de Lentz-Sinigaglia**, inclusions cytoplasmiques azurophiles liées à l'infection par le virus de la maladie de Carré.
- Du **matériel nucléaire phagocyté**.

Figure 6 : Représentation schématique de deux techniques de leucoconcentration



D'après Baroche [3]

Bien qu'il s'agisse d'une méthode séduisante, car facile et peu onéreuse, l'observation des frottis sanguins présente des pièges diagnostiques par défaut ou par excès, et demande un temps

d'examen important. Une bonne connaissance de ses limites ainsi qu'un oeil aguerri sont nécessaires pour éviter ces erreurs. L'examen du « buffy coat » semble la méthode de choix, même si elle ne permet pas de détecter toutes les ehrlichioses, comme par exemple *N. helminthoeca* ou *E. ruminantium*. D'autre part, le frottis sanguin conserve tout son intérêt pour mettre en évidence d'autres agents infectieux responsables de tableaux cliniques superposables et transmis également par les tiques (*Babesia*, *Hepatozoon*...). [5, 14, 27]

I.3.3.1.2. Tests sérologiques rapides

Ces outils, aussi qualifiés de « Dot-ELISA », ont été développés par des laboratoires pour la mise à disposition directe des praticiens vétérinaires.

Ils sont fondés sur le principe de l'immunomigration sur membrane : après ajout d'une goutte de sang total, de sérum ou de plasma et d'un réactif, les complexes conjugués-anticorps formés migrent par capillarité sur une bande de papier et, en présence d'anticorps spécifiques, forment des complexes colorés au niveau de l'antigène d'*Ehrlichia canis*. Le mélange continue ensuite de migrer jusqu'à une zone de contrôle à l'extrémité de la fenêtre, où les particules colorées forment une bande de contrôle (rose ou bleue), témoin positif confirmant la validité du test. [14, 27, annexes 1, 2 et 3]

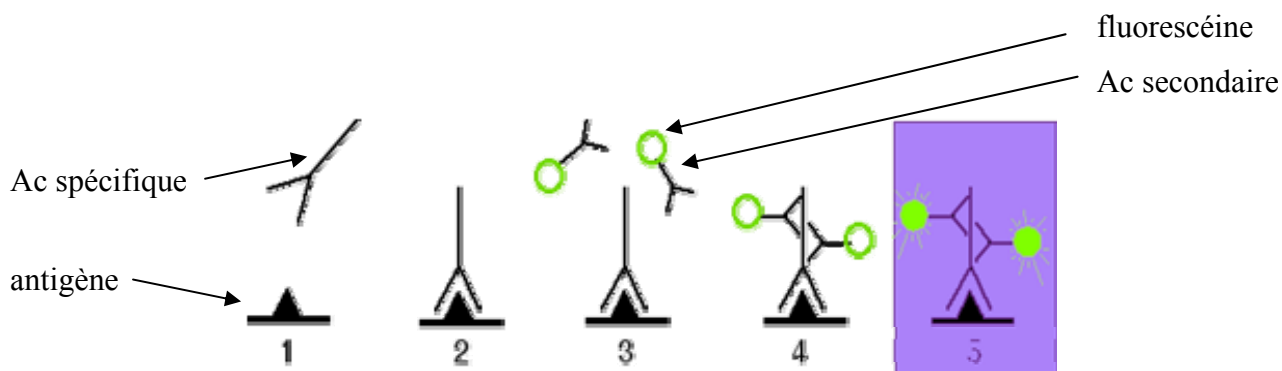
Par exemple, le SNAP 3DX® du laboratoire Idexx détecte de façon simultanée l'antigène de *Dirofilaria immitis* (responsable de la dirofilariose), l'anticorps de *Borrelia burgdorferi* (responsable de la Maladie de Lyme) et l'anticorps d'*Ehrlichia canis* souche Jake. Le Speed®Ehrli du laboratoire BVT et le Witness®Ehrlichia du laboratoire Synbiotics détectent uniquement les anticorps d'*Ehrlichia canis*.

I.3.3.2. Examens réalisés au laboratoire

I.3.3.2.1. Immunofluorescence indirecte (IFI)

L'IFI consiste à faire réagir le sérum du patient après différentes dilutions sur une préparation de cellules infectées ; la fixation est révélée par un conjugué marqué par un fluorochrome qui émet une fluorescence sous un microscope adapté. La figure 7 illustre le principe de l'IFI.

Figure 7 : Principe de l'Immunofluorescence indirecte



Légende : 1 et 2, l'anticorps spécifique produit dans le sérum se fixe sur l'antigène ; 3 et 4, l'anticorps antiglobuline (secondaire) marqué avec un composé fluorescent (fluorescéine) se fixe sur l'anticorps spécifique ; 5, révélation à l'UV, détection de l'antigène recherché.

D'après Krieger [23]

Cette technique a longtemps été utilisée pour le diagnostic des ehrlichioses et fait toujours référence, compte tenu de sa grande sensibilité et de sa bonne spécificité. Elle est disponible pour *A. platys*, *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *E. ruminantium*, *E. chaffeensis*, *N. helminthoeca* et *N. risticii*. *E. ewingii* n'étant pas disponible en culture cellulaire, on ne dispose pas de technique IFI pour cette espèce à ce jour ; mais étant donné la réactivité croisée avec *E. canis*, il est possible d'utiliser ce test diagnostique sur cet antigène.[14, 23, 27]

L'IFI est donc un examen très sensible, dont la précision dépend du lecteur. Cette technique demande une certaine expérience et un équipement de laboratoire important. Elle permet de réaliser assez rapidement un examen sur plusieurs échantillons à la fois. [23, 25, 27]

L'IFI reste encore la méthode la plus utilisée pour le diagnostic des ehrlichioses sur le plan international ; il existe toutefois des variations concernant les méthodes et souches utilisées notamment, mais aussi sur les « seuils de positivité ». Il est donc important de faire appel à des laboratoires spécialisés et de faire préciser le titre au laboratoire, qui ne répond parfois qu'avec un résultat qualitatif. Des faux-positifs en IFI sur *E. canis* ont été rapportés pour des titres faibles (< 1/80ème) lors de certaines infections bactériennes. Ainsi, Waner et coll. proposent un « seuil de positivité » au delà de 1/64ème [43]. Un titre supérieur ou égal au 1/80ème est maintenant largement admis comme « seuil de positivité » ; les titres inférieurs, ou les résultats négatifs, devraient faire l'objet d'un suivi sérologique après 2 ou 3 semaines, ou être confirmés directement par d'autres

méthodes diagnostiques. Il faut également garder en mémoire que le titre sérologique n'est pas en rapport avec la sévérité ou l'avancement de la maladie.

Pour *A. platys*, l'IFI semble spécifique et détecte la maladie de façon précoce, 7 à 17 jours après l'infection, au moment des premiers signes cliniques. Une IFI positive détectera des chiens exposés à *A. platys*, qui présenteront des titres généralement élevés de l'ordre du 1/5120ème. Il est probable que ce titre persiste dans la chronicité, mais l'absence de séroconversion indiquerait une maladie non-active. Un titre inférieur au 1/200ème est à remettre en doute selon certains auteurs [27].

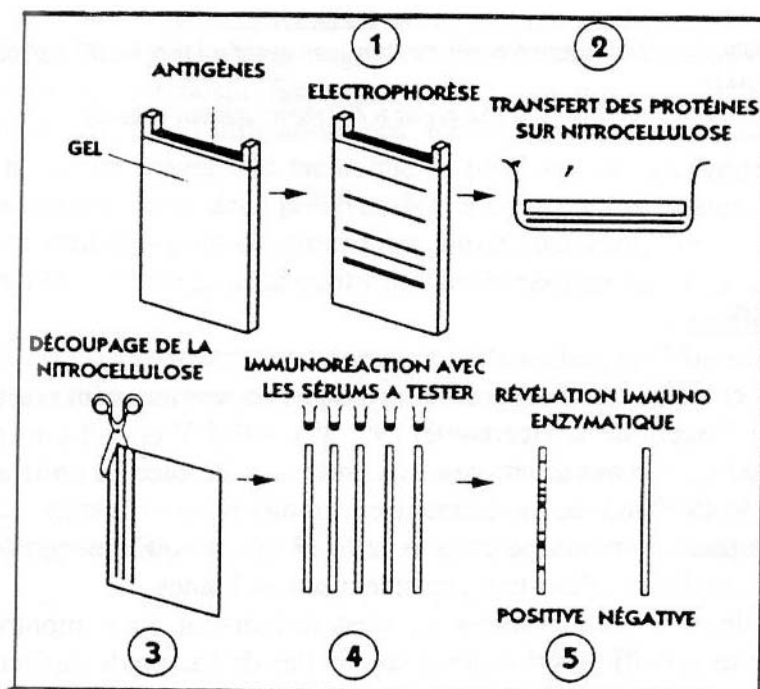
Dans de nombreux cas d'ehrlichiose, l'existence d'IgG permet d'établir un contact passé avec la bactérie, mais ne permet pas d'établir une infection en cours ou la relation avec les signes cliniques observés. En effet, un chien en phase subclinique d'ehrlichiose monocyttaire pourra présenter les signes d'une maladie intercurrente, sans rapport avec une ehrlichiose, et avoir un titre élevé en anticorps anti-*E. canis* [43]. C'est également le cas pour des chiens préalablement traités pour une ehrlichiose monocyttaire, et dont le titre en anticorps peut rester élevé pendant plusieurs mois [3,27]. Là encore, dans tous ces cas, répéter la sérologie après une à deux semaines devrait permettre de trancher. D'après la cinétique des Ac lors d'EMC aiguë expérimentale, la confirmation sérologique du diagnostic devrait faire apparaître soit la présence d'IgM spécifiques de façon très précoce, soit une séroconversion avec une hausse du titre de 4 dilutions [27].

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, toutes les autres infections du chien par les *Ehrlichieae*, sauf par *A. platys*, peuvent potentiellement donner des résultats positifs en IFI pour *E. canis*.

I.3.3.2.2. Western Blot

Cette méthode d'immuno-empreinte est au moins aussi sensible que l'IFI ; elle a l'avantage également d'être indépendante de l'expérience du lecteur, mais demande un équipement de laboratoire important [14, 27]. Le principe consiste à dénaturer l'antigène et à faire migrer les peptides obtenus dans un gel ; après l'électrophorèse, les peptides sont transférés sur une membrane de nitrocellulose, qui est mise à incuber avec le sérum dilué du patient. L'association antigène-anticorps est ensuite révélée par une réaction immunopéroxydasique. Il se forme une tâche colorée au niveau de chacun des complexes reconnus par le conjugué, ce qui permet d'observer les antigènes reconnus et de déterminer leur poids moléculaire [14, 27]. La figure 8 illustre le principe du Western Blot.

Figure 8 : Principe du Western Blot



D'après Gouvernayre [14]

Cette méthode permet une analyse plus fine de la réponse immunitaire de l'hôte. Son interprétation devra tenir compte de la possibilité de variations mineures entre les différentes souches au sein d'une même espèce.

L'utilisation de protéines recombinantes devrait permettre de rendre cette technique plus abordable et plus précise [14, 33].

I.3.3.2.3. Réactions sérologiques croisées et interprétations des tests

Les réactions croisées entre les *Ehrlichiae* peuvent poser des problèmes d'interprétation, notamment pour l'IFI, les tests de type ELISA ou les tests immuno-chromatographiques. Ces tests isolés ne permettent pas forcément de faire la différence entre des infections par des espèces différentes et pour des infections dues à plusieurs *Ehrlichiae*. [14, 33]. Le Tableau 9 résume les principales réactions sérologiques croisées observées entre les *Ehrlichiae* du Chien.

Tableau 9 : Principales réactions sérologiques croisées observées entre les *Ehrlichieae* du Chien

Agent	Réaction sérologique croisée avec <i>E.canis</i>
<i>E.chaffeensis</i>	++/+++
<i>E.ewingii</i>	-/+++
<i>génogroupe d'E.phagocytophila</i>	-/++
<i>E.platys</i>	-
<i>N.helminthoeca</i>	+ /+++

- : pas de réaction croisée,

+ : réaction croisée légère

++ : réaction croisée
intermédiaire

+++ : forte réaction croisée

D'après Baroche, Gouvernayre, Martin et Waner [3, 14, 27, 43]

L'agent de la thrombopénie cyclique infectieuse ne réagit apparemment pas en IFI avec *E. canis*. [3, 14, 27, 43]

La possibilité de réactions croisées doit donc évidemment être prise en compte dans l'interprétation des résultats sérologiques. L'utilisation d'un panel de sérologies en IFI, voire du Western Blot, pourrait permettre de proposer un diagnostic étiologique, avec toutefois les limites décrites. Il n'existe pas à priori aujourd'hui de standards mondialement admis pour interpréter ces sérologies combinées. Ces méthodes sérologiques combinées sont par ailleurs souvent incapables de différencier des infections concomitantes dues à plusieurs agents pathogènes, ou de donner un diagnostic étiologique précis en zone d'endémie chez des chiens séropositifs pour plusieurs ehrlichioses. Les infections par les différentes *Ehrlichieae* peuvent en effet, comme nous l'avons illustré, être très difficiles à distinguer aussi bien du point de vue clinique et biologique que sérologique, et la participation de divers autres agents pathogènes rend d'autant plus difficile l'interprétation de ces données sérologiques. Un chien qui ne répond pas au traitement après un tel diagnostic d'ehrlichiose devra aussi être testé pour d'autres agents pathogènes, tels que *Babesia canis*, *Bartonella vinsonii* ou encore *Rickettsia rickettsii*.

La sérologie peut également s'avérer être une méthode tardive, compte tenu de la lenteur de la séroconversion chez certains chiens, notamment dans le cas de l'ehrlichiose monocyttaire aiguë ou d'ehrlichiose granulocytaire à *E. ewingii*.

Une forte suspicion clinique d'infection aiguë ne doit donc pas être écartée sur la base d'une sérologie négative.

La sérologie est par ailleurs utilisée pour le suivi du traitement des ehrlichioses [3, 27, 43]. Toutefois, il est difficile d'évaluer précisément le statut de l'animal, puisque le titre en anticorps peut mettre des années à devenir négatif, notamment pour *E. canis*, et l'on ne sait pas, à ce jour, si cette observation est liée à une persistance de l'infection ou à une production d'anticorps par des mécanismes indépendants de la bactérie, mais durables [3]. De plus, un chien continuellement exposé en zone endémique ne saurait être suivi aisément par des sérologies.

Parmi les différentes méthodes sérologiques évoquées, l'IFI reste la méthode de référence. Elle requiert toutefois un équipement important et coûteux, des manipulations nombreuses, ainsi qu'un opérateur compétent [14, 23, 27, 43]. Les techniques plus accessibles aux cliniciens de type Dot-ELISA ou immunomigration ont été évaluées et donnent généralement des résultats très satisfaisants par rapport à l'IFI ou au Western Blot [14, 23, 27]. L'utilisation de protéines recombinantes pourrait également permettre d'augmenter la spécificité de ces tests. Ces tests ne permettent toutefois pas d'éviter les réactions croisées liées à des épitopes communs ou des protéines proches comme nous l'avons vu, notamment au sein d'un même génogroupe. De plus, ils ne donnent que des résultats semi-quantitatifs qui ne permettent pas un suivi aisé des titres en Ac ou de l'activité de l'infection [43]. Avec l'utilisation de protéines recombinantes, qui devraient permettre d'améliorer encore la spécificité des tests sérologiques, les différentes situations que nous avons évoquées indiquent que la sérologie devrait être utilisée pour la confirmation du diagnostic, avec la prudence qui s'impose, mais qu'elle ne pourra pas conduire à un diagnostic étiologique. Elle devrait donc idéalement être complétée par l'utilisation des nouveaux outils de biologie moléculaire, notamment pour le suivi du traitement.

I.3.3.2.3. Isolement des souches et mise en culture

Il est possible de mettre l'agent infectieux en culture à partir du « buffy coat » d'un patient en ensemencant un milieu cellulaire spécifique.

Pour *E. canis*, la mise en culture prend 14 à 34 jours. L'avantage de la méthode est sa grande sensibilité : elle peut détecter *E. canis* dans le sang de l'animal infecté expérimentalement dès le

deuxième jour de l'infection et même en début de traitement. Cette méthode est aujourd'hui considérée uniquement comme un outil de recherche, du fait de son coût et du délai de réponse variant de 3 jours à plus de deux mois.

La mise en culture des *Ehrlichiae* est faite sur des cellules de première explantation (monocytes canins et humains) ou sur des lignées cellulaires (cellules hybrides MDH-SP, cellules DH-82...). Pour *E.canis*, l'utilisation de lignées cellulaires hybrides a permis de faciliter et d'améliorer le rendement des cultures. A ce jour toutefois, différentes *Ehrlichiae* n'ont pas encore pu être mises en culture, et notamment *E. ewingii*, *A. platys* ou encore *A. bovis* [11, 27]. Le Tableau 10 montre les cultures réalisées de quelques *Ehrlichiae*.

Tableau 10 : Culture de quelques *Ehrlichiae* sur lignées cellulaires

Espèce	Lignées cellulaires
<i>Ehrlichia canis</i>	Hybride chien-humain, DH82, hybride souris-chien, MDH-SP, J774.A1, O30, EU.HMEC-1
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	DH82, diverses lignées de macrophages
<i>Ehrlichia muris</i>	Diverses lignées de macrophages
<i>Ehrlichia ewingii</i>	-
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Diverses lignées de macrophages et de cellules endothéliales
<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	DH82, diverses lignées de macrophages
<i>Neorickettsia (Ehrlichia) risticii</i>	P388D1, T-84, U-937, diverses lignées de macrophages
<i>Neorickettsia (Ehrlichia) sennetsu</i>	P388D1, L929, FL, HeLa, diverses lignées de macrophages
Agent SF	RK-13, diverses lignées de macrophages
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	HL60, cellules embryonnaires d' <i>I. scapularis</i>
<i>Anaplasma platys</i>	-
<i>Anaplasma bovis</i>	-

D'après Martin [27]

I.3.3.2.4. Diagnostic moléculaire : PCR et séquençage

- La PCR : *Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérisation en chaîne:

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une méthode de synthèse in vitro d'acide nucléique qui permet d'amplifier de façon spécifique et exponentielle un fragment d'ADN particulier [23]. Elle nécessite la présence :

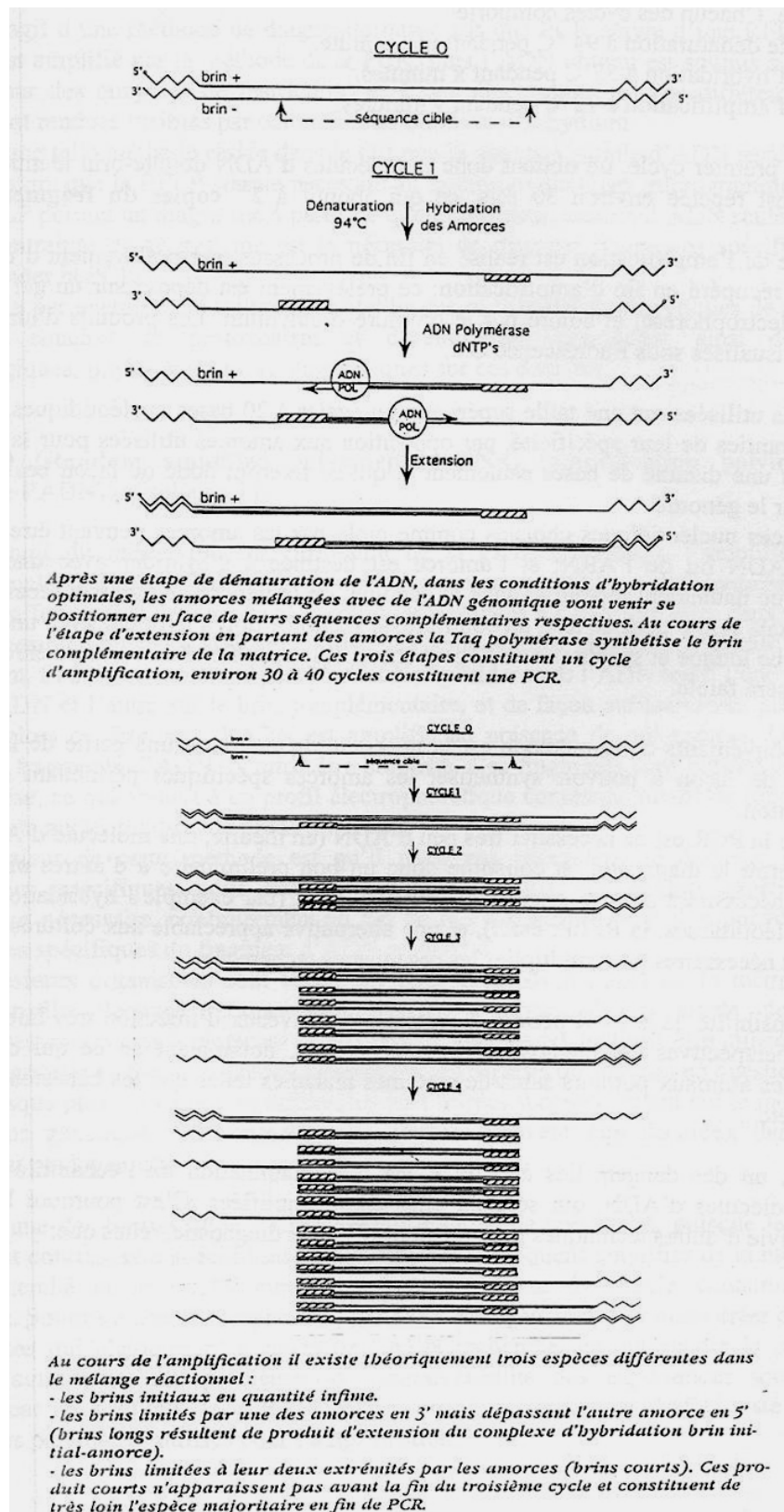
- D'ADN double brin
- D'amorces qui sont des oligonucléotides synthétiques complémentaires de chaque extrémité du fragment d'ADN à amplifier
- De dNTP (désoxyribo-nucléotides tri-phosphates), pour la polymérisation du brin néoformé
- D'un tampon permettant de rester à pH constant optimal pour l'ADN polymérase.
- De magnésium, sous forme de $MgCl_2$, ion divalent catalyseur de la réaction enzymatique
- D'ADN polymérase permettant la synthèse d'ADN dans le sens 5'-3' du gène ciblé par les amorces.

L'amplification de l'ADN se fait ensuite en 3 étapes :

- La dénaturation de l'ADN : en portant le mélange à une température de 94°C, les liaisons hydrogène qui lient les deux brins d'ADN entre eux sont rompues. L'ADN se retrouve donc sous la forme de deux monobrans.
- L'hybridation des amorces (ou *primers*) : elle se réalise sur la séquence complémentaire du brin d'ADN et a lieu à une température optimum spécifique à chaque amorce, la température d'hybridation. Les températures de fusion et d'hybridation sont fonction de la composition en guanine et en cytosine de l'amorce et de la longueur de celle-ci. Ces amorces indiquent le début et la fin de la séquence d'ADN à amplifier.
- La polymérisation : l'ADN polymérase ou Taq polymérase assemble les différentes bases azotées en se servant de l'ADN simple brin comme matrice. Cette enzyme a une activité maximale pour une température de 72°C. La polymérisation se fait alors à une vitesse approximative de 1000 bases par minute.

La figure 9 illustre le principe d'une PCR.

Figure 9 : Principe d'une PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en chaîne)



D'après Krieger [23]

En répétant ces trois phases, se réalisant donc à trois températures spécifiques, n fois, on obtient à partir d'une séquence d'ADN double brin, 2ⁿ copie de cette séquence.

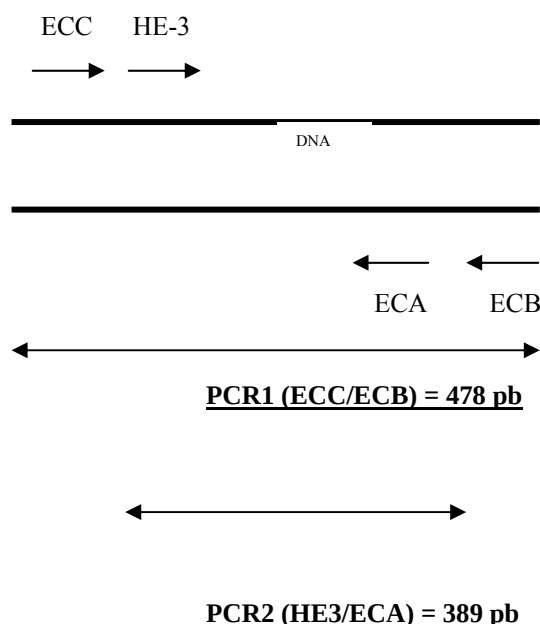
L'appareil permettant d'effectuer ces cycles est un thermocycleur : il se programme en température, en temps et en nombre de cycles.

De plus, il existe une étape préliminaire de dénaturation à 94°C et une étape finale d'élongation de 72°C.

- La PCR nichée :

La PCR nichée est un type de PCR permettant d'augmenter la sensibilité d'une PCR simple. Le principe est d'amplifier dans un premier temps un fragment d'ADN contenant la séquence recherchée. Ce premier produit d'amplification subit ensuite une deuxième PCR destiné à amplifier le fragment voulu. Le nombre de cycles réalisés au total est donc plus élevé, d'où une sensibilité plus importante. Ce type de PCR permet également d'augmenter la spécificité de l'analyse. Au total, 4 amorces sont utilisées [23]. La figure 10 illustre le principe de la PCR nichée.

Figure 10 : Principe de la PCR nichée, basé sur l'exemple de la PCR nichée détectant spécifiquement *E.canis*.



D'après annexe 7

- Le séquençage :

Cette technique permet de connaître la séquence nucléotidique précise d'un fragment de gène. Ce fragment est d'abord produit en grande quantité par PCR. Il peut être cloné avant d'être séquencé ou séquencé directement.

Le grand intérêt du séquençage est de permettre de réaliser des études phylogéniques, par comparaison avec les séquences nucléotidiques d'autres espèces animales, des études diagnostiques (différenciation d'espèces et de souches), et permet de créer des amorces et des sondes spécifiques de l'ADN séquencé, ainsi que des vaccins.

L'inconvénient de cette méthode est sa lourdeur de réalisation, qui limite son application à de courts fragments nucléotidiques. [23]

Ainsi, la confirmation du diagnostic se fera par l'observation d'une séroconversion, de préférence combinée au diagnostic direct, et notamment par une PCR de qualité, à partir de sang prélevé sur EDTA avant le début du traitement. On pourra pratiquer une recherche multi-espèces suivie d'une recherche spécifique orientée selon les circonstances épidémiologiques et cliniques. L'amélioration clinique doit se faire en quelques jours après la mise en place d'un traitement à base de tétracyclines aux doses recommandées, et jusqu'à deux semaines pour les cas chroniques sévères. Passé ce délai, un échec thérapeutique doit évoquer une possible infection par d'autres agents pathogènes (*Babesia sp.*, *Bartonella sp.*...), la persistance de mécanismes à médiation immune, une résistance à la molécule ou une infection chronique sévère. Le diagnostic précis des ehrlichioses devrait permettre de mieux connaître chaque entité et d'affiner ainsi les critères thérapeutiques et pronostiques. Il permettra également de mieux connaître l'impact de ces maladies, notamment sur la santé humaine, et le rôle du Chien dans leur épidémiologie.

I.4. Le traitement des ehrlichioses canines

I.4.1. Pronostic

Le pronostic est variable selon le stade de la maladie. La forme aiguë est généralement bénigne et de bon pronostic si elle est correctement traitée et à temps. La mortalité est essentiellement rencontrée lors de la phase chronique grave, pour laquelle le pronostic devra toujours être très réservé. Les chiens en phase subclinique devraient impérativement recevoir un traitement, car ils risquent de déclarer une forme chronique. [10, 27, 43]

Une étude rétrospective de la maladie, en Israël, sur 100 cas d'infection naturelle, a permis d'établir les facteurs de risque en terme de mortalité ; cette dernière est plus élevée lors d'anémie sévère, de leucopénie sévère, de pancytopenie, de tendances aux saignements et chez les chiens de race berger allemand [43].

I.4.2. Traitement

I.4.2.1. Antibiothérapie

Le traitement de l'ehrlichiose canine repose sur l'administration de tétracyclines, qui exercent une activité bactériostatique en inhibant la synthèse protéique au niveau ribosomal. Ceci permettrait de favoriser la fusion lysosomiale avec la vacuole parasitophore, en supprimant l'activité métabolique des bactéries.

La **doxycycline** et la **minocycline** sont aujourd'hui les anti-infectieux de choix, administrés à la posologie de **10 mg/kg/j en une seule prise pendant au moins 3 semaines** voire **un mois**, et même **jusqu'à deux mois en phase chronique**. [3, 10, 14, 17, 25, 27, 43].

En phase aiguë, lors d'infection expérimentale, il semble qu'une dose de 5 mg/kg matin et soir pendant 10 jours soit suffisante. L'ADN d'*E. canis* a toutefois été détecté par PCR après 6 semaines de traitement chez des chiens en phase subclinique, ce qui impose un traitement plus long durant cette phase [27]. Il semble que les chiens traités puissent guérir du point de vue clinique et hématologique, mais puissent tout de même rester porteurs de la bactérie, notamment lors d'un traitement de trop courte durée ou trop tardif. C'est le cas lors d'infection par *E.canis* ou

E.chaffeensis, alors que les infections par *E.ewingii* ou *E.equi* sont le plus souvent soignées à la suite du premier traitement antibiotique.[43]

L'utilisation, en parallèle, de **dipropionate d'imidocarb** (CARBESIA®) est recommandée par certains auteurs, si son utilisation ne présente pas de contre-indication. On l'utilise à la posologie de **5 mg/kg**, à raison de deux **injections à 2 semaines d'intervalle**. Ce traitement semble efficace même si la numération plaquettaire semble s'améliorer moins rapidement que lors de l'utilisation de tétracyclines seules [14, 25, 27].

L'utilisation d'autres antibiotiques comme l'enrofloxacin s'est révélée inefficace dans le traitement d'ehrlichioses aiguës expérimentales [6, 10, 27].

I.4.2.2. Traitements complémentaires

Des traitements symptomatiques des différentes complications sont proposés. Une **transfusion sanguine** peut être indiquée dans les cas graves, à l'aide de sang total frais ou de plasma riche en plaquettes.

La mise en place d'un **second traitement antibiotique** pourra être proposé afin de lutter contre les surinfections, dans la mesure des indications et interactions médicamenteuses possibles.

La présence de mécanismes immunologiques intervenant dans la pathogénie de la maladie suggère la possibilité de l'utilisation d'un **traitement immunosuppresseur**, à base de prednisolone notamment, lors d'ehrlichiose aiguë. Toutefois, en l'absence de mécanisme auto-immun avéré, Woody et coll. déconseillent l'utilisation de glucocorticoïdes à dose immunosuppressive ou d'agent immunosuppresseurs sur des longues périodes, compte-tenu du ralentissement probable de l'élimination de la bactérie.

Des **anabolisants** sont parfois utilisés pour la stimulation des cellules souches de la moelle osseuse, comme la nandrolone (1 à 1,5 mg/kg IM, une fois par semaine) [14, 25, 27].

I.4.2.3. Suivi du traitement

I.4.2.3.1. Suivi clinique et hématologique

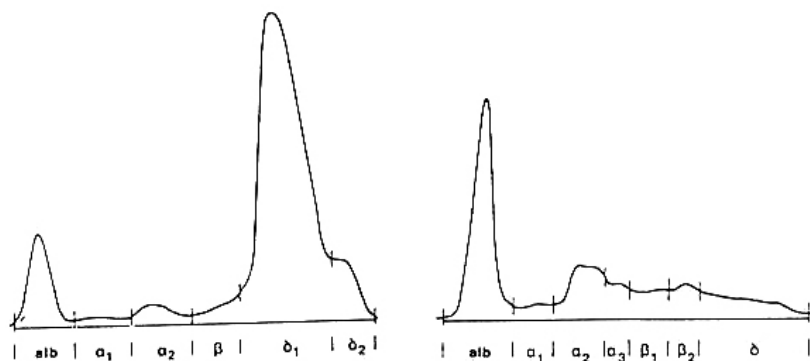
L'amélioration clinique et biologique est rapide, dès 24 à 48 heures après la mise en place du traitement en phase aiguë. La température rectale redevient normale et la thrombopénie disparaît progressivement en quelques jours ; toutefois, la numération plaquettaire revient à son niveau de

base en 14 jours en moyenne. La disparition de la thrombopénie semble être un marqueur intéressant de l'efficacité du traitement. Une absence d'amélioration de la numération plaquettaire après 7 jours de traitement peut évoquer un mécanisme de destruction à médiation immune ou une infection concomitante avec *Babesia sp.* ou *Bartonella sp.* Cela a également été rapporté avec des traitements inefficaces à l'enrofloxacin. [14, 27]

I.4.2.3.2. L'électrophorèse des protéines sériques

Cet examen simple permet le suivi du traitement : la baisse progressive de la gammaglobulinémie sur 6 à 9 mois est un marqueur d'amélioration. Après guérison, l'albuminémie est réhaussée et on assiste à une réduction de l'hyperglobulinémie des fractions β et γ et du pic α_2 . [3, 27]. La figure 11 montre les tracés des électrophorèses des protéines sériques d'un chien atteint d'ehrlichiose réalisées avant et 30 mois après traitement.

Figure 11 : Tracés des électrophorèses des protéines sériques d'un chien atteint d'ehrlichiose réalisées avant et 30 mois après traitement.



D'après Baroche [3]

On observe une disparition totale du pic oligoclonal ainsi qu'une hausse de l'albuminémie.

I.4.2.3.3. IFI et PCR

On note une baisse progressive, sur 15 à 31 mois, des taux d'anticorps, dès la fin du traitement [8, 43]. Face à une absence de diminution, on doit évoquer la possibilité d'une réponse

immunitaire aberrante ou d'un échec du traitement [43]. De plus, la cinétique de diminution dépend du titre initial : sur un titre très élevé en IFI, la baisse peut prendre plusieurs mois compte-tenu de l'imprécision liée aux fortes dilutions et il est difficile de savoir si cela est lié à une maladie en cours d'évolution, une persistance de l'agent infectieux ou à la pression d'infection [27].

La PCR réalisée sur un prélèvement de sang périphérique permet de détecter l'ADN de bactéries en circulation. Chez un animal entré en phase subclinique de la maladie, les bactéries séquestrées dans la rate ne sont pas détectables par ce type de PCR. Une PCR réalisée sur un prélèvement de sang splénique est décrite [17] et permettrait de dépister les animaux porteurs sains.

La réalisation, en parallèle, d'une IFI et d'une PCR est décrite [45] :

- Des résultats positifs en IFI et en PCR indique que l'animal est infecté, alors que des résultats négatifs aux deux tests indique que l'animal est sain.
- Lorsqu'un résultat positif en IFI et négatif en PCR est obtenu alors que l'animal ne présente pas de signes cliniques, la mise sous traitement antibiotique ainsi que le renouvellement des deux tests deux mois plus tard sont recommandés. Alors, si l'animal ne présente toujours pas de signes cliniques, que le résultat en PCR reste négatif et que le titrage en anticorps est divisé par 16, le chien peut être considéré comme guéri.
- Lorsqu'un résultat négatif en IFI et positif en PCR est obtenu, la mise en place d'un traitement antibiotique est recommandée, même en l'absence de signes cliniques, jusqu'à ce que la PCR devienne négative.

I.4.3. Prophylaxie

Aucun vaccin n'est disponible à ce jour, mais c'est une voie d'avenir et de nombreux laboratoires pharmaceutiques y travaillent [27].

En élevage ou dans les communautés canines, la prophylaxie repose essentiellement sur le contrôle des infestations par les tiques, mais aussi par la quarantaine et le dépistage sérologique des nouveaux arrivants, avec traitement des chiens testés positifs [10].

L'utilisation d'une **chimiothérapie préventive** à base de tétracyclines a également été proposée pour les déplacements en zone d'enzootie, pour les animaux sains (**doxycycline à 3mg/kg/j PO en une prise**) ; elle est utilisée également avec succès dans les camps militaires situés en zones d'enzootie [10, 14, 25, 27].

Deuxième partie :

Caractérisation des ehrlichioses canines en Guadeloupe

L'ehrlichiose canine est une maladie suspectée d'être endémique au sein de la population canine de la Guadeloupe.

Aucune étude n'a jusqu'à ce jour été réalisée sur l'île. De plus, une enquête épidémiologique réalisée auprès des vétérinaires praticiens, préalablement à notre étude, a montré que les signes cliniques d'appel d'ehrlichiose canine différaient d'un vétérinaire à l'autre. Le nombre de suspicions rencontré variait de quelques cas par an (à Basse-Terre par exemple) à 2 cas par jour (aux Abymes par exemple). Le questionnaire proposé aux vétérinaires est joint en annexe 4.

L'objectif de cette étude était donc d'objectiver la présence d'ehrlichiose canine sur l'île, d'identifier les espèces d'*Ehrlichia* circulantes et de caractériser les signes cliniques de l'ehrlichiose canine en Guadeloupe.

Les 3 espèces de tiques présentes en Guadeloupe sont [27, 33]:

- *Rhipicephalus sanguineus*, qui transmet *E.canis*, *E.ewingii* et *A.platys* aux chiens
- *Amblyomma variegatum*, qui transmet *E.ruminantium* aux ruminants
- *Boophilus microplus*, qui transmet *E. sp.* souche EBm52 aux ruminants [31]

Les espèces d'*Ehrlichia* circulant en Guadeloupe chez le Chien sont donc en théorie *E.canis*, *A.platys* et/ou *E.ewingii*. Notons cependant qu'*E. ewingii* n'est pas une espèce d'*Ehrlichia* décrite en France métropolitaine, au contraire d'*E.canis* et *A.platys*. [1, 27, 30]

La méthode choisie fut la mise en évidence de l'ADN de la bactérie dans le sang périphérique des chiens grâce à la technique de PCR. Cette technique de biologie moléculaire permet la synthèse in vitro d'acide nucléique. Trois techniques de PCR ont été utilisées : une PCR qui détecte toutes les *Ehrlichia*, une PCR spécifique d'*E. canis* et une PCR spécifique d'*A. platys*.

II.1. Matériel et méthode

II.1.1. Collecte des prélèvements sanguins

Les chiens ($n = 79$) inclus dans cette étude ont été amenés dans les différentes cliniques vétérinaires de la Guadeloupe continentale pour des raisons médicales diverses, entre février 2003 et mai 2006. Après un examen clinique et paraclinique, ils ont été classés comme suspects concernant l'ehrlichiose.

- Une première série de 43 prélèvements a été récoltée à la clinique vétérinaire de Moudong (proche de Pointe-à-Pitre), entre février 2003 et novembre 2005.
- Une deuxième série de 36 prélèvements a été récoltée dans différentes cliniques de la Guadeloupe, à la fois en Basse Terre et en Grande Terre, entre mars et mai 2006.

Chaque échantillon a été codé par les premières lettres de la clinique dont il provenait, suivies des premières lettres du vétérinaire traitant et du numéro de l'échantillon dans la clinique. Ainsi le quatrième prélèvement de la clinique vétérinaire de Convenance, dont le vétérinaire traitant est le Docteur Laforce a eu pour code : Conv.Laf4.

Une fiche de commémoratifs a été remplie pour chaque animal, avec la collaboration du vétérinaire et du propriétaire. Cette fiche incluait :

- Des données épidémiologiques : âge, âge d'adoption, race, sexe, utilité de l'animal, accès possible à la campagne environnante, présence de tiques sur l'animal dans le mois précédant la visite, utilisation régulière et fréquente d'un produit acaricide,
- Des données cliniques et paracliniques : durée d'évolution des symptômes, symptômes, résultats d'examens complémentaires (test sérologique rapide, numération et formule sanguine),
- Des données anamnétiques : antécédents médicaux, traitement antérieur.

Les prises de sang ont été réalisées sur EDTA ou héparine. Les prélèvements de sang ont été conservés à 4°C à la clinique vétérinaire puis collectés dans les 4 heures suivantes par nos soins. Le sang frais a ainsi pu être congelé dans l'azote liquide (sang + 10% de DMSO) afin de faire des isollements de souches. Un aliquot de sang a toujours été congelé simultanément à -20°C afin de faire l'extraction d'ADN et le diagnostic moléculaire.

Si le prélèvement n'a pas été collecté le jour même, il a été stocké tel quel à -20°C à la clinique vétérinaire jusqu'à la collecte.

Les échantillons destinés au diagnostic moléculaire ont été conservés à -20°C au laboratoire du CIRAD-EMVT jusqu'à l'extraction de l'ADN.

II.1.2. Analyse moléculaire des échantillons

L'analyse a consisté d'abord à extraire l'ADN des échantillons sanguins. Dans un deuxième temps, une amplification spécifique par PCR de l'ADN des bactéries recherchées a été effectuée. Enfin l'amplification de l'ADN a été visualisée en le faisant migrer dans un gel d'agarose.

II.1.2.1. Extraction de l'ADN des échantillons sanguins

II.1.2.1.1. Protocole

L'ADN a été extrait à partir de 50 μl de sang total avec l'extracteur automatique ABI Prism 6100. (Le protocole d'extraction est décrit dans l'annexe 5).

Dans un premier temps, un tampon de lyse de la protéinase K a permis de lyser les cellules. Son action s'est faite au bain-marie à 58°C pendant 10 minutes. La purification de l'ADN ainsi libéré a été effectuée sur colonne : l'ADN a d'abord été fixé sur le filtre de la colonne puis il a été purifié après plusieurs lavages, avant d'être élué.

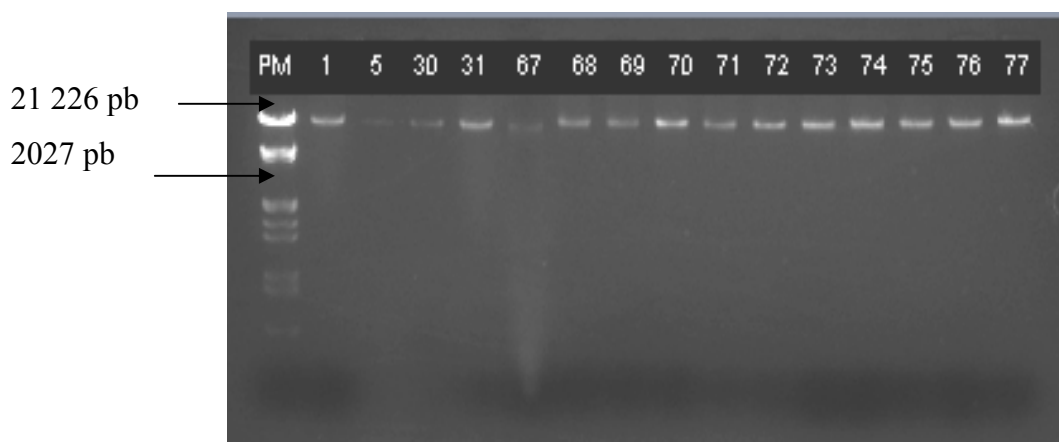
II.1.2.1.2. Quantification de l'ADN par électrophorèse

La qualité et la quantité de l'ADN a ensuite été vérifiée par électrophorèse dans un gel d'agarose standard à 1.5%. La qualité de l'extraction a été vérifiée par la présence d'une bande unique après migration.

La quantification de l'ADN a été faite dans le gel grâce à un analyseur d'image (Chemidoc, Biorad – logiciel Quantity One). L'intensité de la fluorescence mesurée sous lumière U.V. était proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans le gel. En utilisant un étalon de quantité connue (échelle de poids moléculaire Lambda EcoHinIII), une quantification des échantillons d'ADN a été effectuée.

La figure 12 illustre les résultats obtenus après l'extraction de l'ADN de 15 échantillons sanguins.

Figure 12 : Photo d'un gel d'agarose ayant permis la vérification de la qualité de l'extraction de l'ADN des échantillons sanguins 1,5,30,31 et 67 à 77. (PM : poids moléculaire, pb : paires de base)



La quantité minimale d'ADN nécessaire à la réalisation d'une PCR varie entre 10 et 30 ng. Le volume à utiliser pour la PCR a donc été réévalué après chaque extraction. Les ADNs extraits ont été conservés en solution aqueuse à -20°C jusqu'à leur analyse par PCR.

II.1.2.2. Les méthodes de PCR

II.1.2.2.1. Principe général

La figure 9 illustre le principe général d'une PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou réaction de polymérisation en chaîne.

II.1.2.2.2. Détection d'*Ehrlichia spp.* par PCR simple

o La PCR ECC/ECB

Une **PCR simple** appelée **ECC/ECB**, amplifiant un fragment de **478 pb** du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a été utilisée pour détecter la présence d'*Ehrlichia spp.* dans les 43 premiers échantillons.

Les amorces étaient les suivantes :

- ECC (5'-AGA-ACG-AAC-GCT-GGC-GGC-CAA-GCC-3')

- ECB (5'-CGT-ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GGC-3')

La PCR ECC/ECB constituait aussi la première phase de la PCR nichée détectant spécifiquement *E.canis*.

Elle a été réalisée selon le protocole décrit par Aguirre et coll., Ndip et coll. et Wen et coll. [1, 30, 45].

La préparation du mix de PCR a été réalisée de la même manière pour toutes les PCR : dans un tube Eppendorf® traité sans RNase ni Dnase (n tubes + 1 tous les 5 tubes), on ajoute : 2,5 µl de Tampon Taq 10X, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 2 µl de dNTP 2,5 mM, 1 µl de chaque amorce à la concentration de 50 ng / µl et au dernier moment, 0,1 µl de Taq polymérase à 5 UI/µl.

Suivant la mesure de la quantité d'ADN obtenue par migration sur gel, les PCR ont nécessité 5µl d'ADN lors d'une PCR simple. Le complément à 16.9 µl d'eau stérile a été ajouté dans chaque tube.

8.1µl de mix a été ajouté ensuite dans chaque tube Eppendorf® pour obtenir un volume final de réaction de 25µl.

L'ADN a été dénaturé à 94°C pendant 3 minutes. Il a ensuite subi 40 cycles constitué de trois phases successives : une première phase de 50 secondes de dénaturation à 94°C puis une deuxième phase de 50 secondes d'hybridation à 60°C et une troisième phase de 50 secondes d'élongation à 72°C. Une étape finale d'élongation de 10 minutes à 72°C a été réalisée.

o La PCR EHR16SR/EHR16SD

Une **PCR simple** appelée **EHR16SR/EHR16SD**, amplifiant un fragment de **345 pb** du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a été utilisée pour la détection d'*Ehrlichia spp.*. Cette PCR a été développée à partir de celles décrites par Inokuma et coll., et Martin et coll. [19, 20, 26].

Les amorces suivantes ont été utilisées :

- EHR16SD (5'-GGT-ACC-YAC-AGA-AGA-AGT-CC-3')
- EHR16SR (5'-TAG-CAC-TCA-TCG-TTT-ACA-GC-3')

La PCR EHR16SR/EHR16SD a permis d'évaluer la présence d'ADN d'*Ehrlichia spp.* dans chaque échantillon.

La préparation du mix et des échantillons d'ADN a été la même que celle décrite pour la PCR simple ECC/ECB en II.2.3.1..

Le contrôle positif était l'ADN extrait à partir de culture infectée d'*Ehrlichia ruminantium* souche Gardel passage 18.

Une mise au point a été nécessaire pour cette PCR (cf II.2.2.). La température d'hybridation que nous avons utilisée est de 57°C et non de 55°C comme décrite par Inokuma et coll., et Martin et coll. [19, 20, 26]. Les autres phases de la PCR EHR16SR/EHR16SD sont les mêmes que celles décrites pour la PCR ECC/ECB. Le protocole qui a été suivi est joint en annexe 6.

II.1.2.2.3. Détection d'*E. canis* par PCR nichée

Une **PCR nichée** détectant spécifiquement *Ehrlichia canis* a été utilisée.

Les amorces ECC et ECB utilisées pour la PCR externe étaient ceux détectant toutes les espèces d'*Ehrlichia* (décrites ci-avant) et amplifiant un fragment de **478 pb** du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S. Puis la PCR appelée HE3/ECA utilisée comme PCR interne a détecté spécifiquement l'ADN d'*Ehrlichia canis* en amplifiant un fragment de **389 pb** [1, 30, 45]. Les amorces utilisées ont été :

- o HE3 (5'-TAT-AGG-TAC-CGT-CAT-TAT-CTT-CCC-TAT-3')
- o ECA (5'-CAA-TTA-TTT-ATA-GCC-TCT-GGC-TAT-AGG-AA-3')

La PCR nichée a été réalisée selon le protocole décrit par Aguirre et coll., Ndip et coll. et Wen et coll. [1, 30, 45], joint en annexe 7 :

- La première phase correspond à la PCR ECC/ECB décrite au paragraphe II.2.3.1.
- La deuxième phase a été utilisée telle que décrite dans la littérature :
 - o 1 µl du produit d'amplification de la première phase a été repris comme matrice ADN
 - o La programmation de la deuxième phase de la PCR nichée spécifique d'*E.canis* fut la même que celle de la première phase : la température d'hybridation utilisée fut de 60°C et le nombre de cycles de 40.
 - o Le contrôle positif fut de l'ADN extrait à partir de sang de chien infecté par *E. canis*.

II.1.2.2.4. Détection d'*A.platys* par PCR nichée

Une PCR nichée permettant la détection spécifique d'*A.platys* a été utilisée.

Les amorces **8f** et **1448R** ont été utilisées pour la PCR externe. Ces amorces ont amplifié la majorité du gène de l'ARN ribosomal 16S d'*Ehrlichia spp.*. Puis l'amorce spécifique **PLATYS** (5'-GAT-TTT-TGT-CGT-AGC-TTG-CTA-TG-3') et l'amorce **EHR16SR** ont été utilisées pour la

PCR interne. Elles s'hybridaient spécifiquement sur l'ADN d'*Ehrlichia platys* en amplifiant un fragment de **678pb** [20, 26].

Le contrôle positif fut de l'ADN extrait de sang de chien infecté par *A. platys*.

La PCR nichée a été réalisée en suivant le protocole décrit par Inokuma et coll. et Martin et coll. [20, 26], joint en annexe 8.

- Pour la première phase, l'ADN a d'abord subi une dénaturation à 94°C pendant 3 minutes, puis 40 cycles constitué de trois phases successives : une phase de dénaturation à 94°C pendant 1 minute puis une phase d'hybridation à 45°C pendant 1 minute et une phase d'élongation à 72 °C pendant 1 minute 40 secondes. Une étape supplémentaire d'élongation à 72 °C pendant 10 minutes a été réalisée.
- Pour la deuxième phase, l'ADN a d'abord subi une dénaturation à 94°C pendant 3 minutes, puis 40 cycles constitué de trois phases successives : une phase de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes puis une phase d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes et une phase d'élongation à 72 °C pendant 30 secondes. Une étape supplémentaire d'élongation à 72 °C pendant 10 minutes a été réalisée.

II.1.2.3. Électrophorèse des échantillons

5 µl des produits d'amplification obtenus ont été mis à migrer dans un gel d'agarose standard à 1.5% contenant 2µl de bromure d'éthidium; à 80V pendant une heure. Les résultats ont été visualisés sous lumière ultra-violet grâce au Chemi-Doc XRS®.

II.1.2.4. Analyse statistique des résultats

Les taux de positivité dans les différentes population ont été comparés grâce au test de χ^2 d'indépendance (logiciel Microsoft Excel®) ou, lorsque les effectifs étaient trop faibles (au moins une valeur inférieure à 5), grâce au test exact de Fisher (logiciel Microsoft SPSS®). Un seuil de $p < 0.05$ fut considéré comme statistiquement significatif.

II.2. Résultats

II.2.1. Détection d'*Ehrlichia spp.* par PCR ECC/ECB

43 échantillons ont été testés avec la PCR ECC/ECB permettant d'évaluer la présence d'*Ehrlichia spp.*. Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11: Détection d'*Ehrlichia spp.* par PCR ECC/ECB. Un + indique un résultat positif de la PCR, un – un résultat négatif. Les résultats positifs apparaissent en gris.

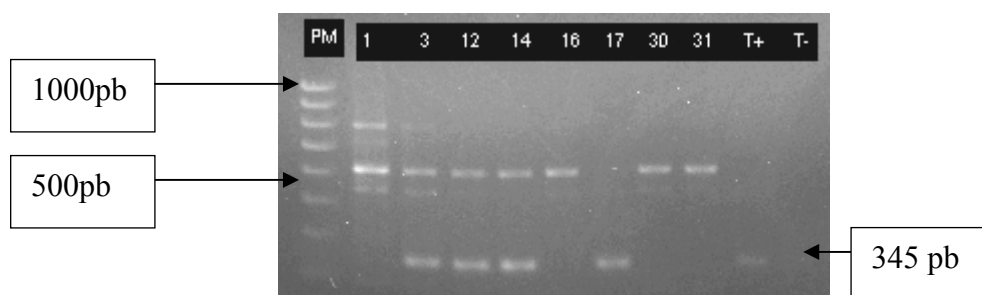
code échantillon	n°	Résultat	code échantillon	n°	Résultat	code échantillon	n°	Résultat
Moud.Roy1	01	+	Moud.Roy17	17	+	Moud.Roy33	33	+
Moud.Roy2	02	-	Moud.Roy18	18	-	Moud.Roy34	34	-
Moud.Roy3	03	+	Moud.Roy19	19	-	Moud.Roy35	35	-
Moud.Roy4	04	-	Moud.Roy20	20	-	Moud.Roy36	36	-
Moud.Roy5	05	-	Moud.Roy21	21	-	Moud.Roy37	37	-
Moud.Roy6	06	-	Moud.Roy22	22	-	Moud.Roy38	38	-
Moud.Roy7	07	-	Moud.Roy23	23	-	Moud.Roy39	39	-
Moud.Roy8	08	-	Moud.Roy24	24	-	Moud.Roy40	40	-
Moud.Roy9	09	-	Moud.Roy25	25	-	Moud.Roy41	41	-
Moud.Roy10	10	-	Moud.Roy26	26	-	Moud.Roy42	42	-
Moud.Roy11	11	-	Moud.Roy27	27	-	Moud.Roy43	43	-
Moud.Roy12	12	+	Moud.Roy28	28	-			
Moud.Roy13	13	-	Moud.Roy29	29	-			
Moud.Roy14	14	+	Moud.Roy30	30	+			
Moud.Roy15	15	-	Moud.Roy31	31	+			
Moud.Roy16	16	+	Moud.Roy32	32	+			

II.2.2. Mise au point de la PCR EHR16SR/EHR16SD

II.2.2.1. Comparaison de la PCR EHR16SR/EHR16SD et de la PCR ECC/ECB

Les échantillons trouvés positifs avec la PCR ECC/ECB ont été testés avec la PCR EHR16SR/EHR16SD. Les conditions utilisées ont été celles décrites par Inokuma et coll. et Martin et coll. [19, 20, 26]. La figure 13 montre les amplifications obtenues.

Figure 13: Photo du gel d'agarose montrant les résultats de la PCR EHR16SR/EHR16SD réalisée sur les échantillons positifs en PCR ECC/ECB soit 1,3,12,14,16,17,30 et 31. (T+ : témoin positif, T- : témoin négatif, PM : poids moléculaire)



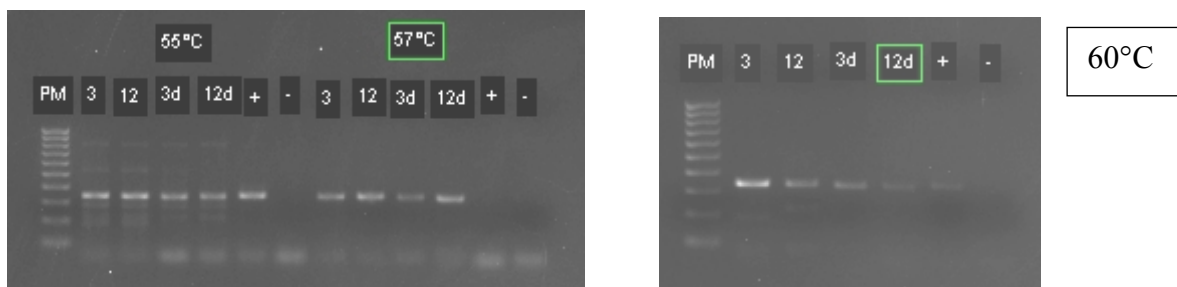
La positivité des échantillons 3, 12, 14 et 17 a été confirmée par cette PCR. Les échantillons n°1, 16, 30 et 31 sont apparus négatifs. Ainsi, la moitié des échantillons positifs avec la PCR ECC/ECB l'ont été avec la PCR EHR16SR/EHR16SD.

De plus, on a observé la présence de bandes multiples de 800, 600 et 550 pb pour la majorité des échantillons. Un essai d'amélioration de la méthode de détection a donc été réalisé en augmentant la température d'hybridation afin de diminuer la formation de produits d'amplification aspécifiques.

II.2.2.2. Amélioration de la PCR simple EHR16SR/EHR16SD

Afin d'améliorer la technique, la PCR simple EHR16SR/EHR16SD a été utilisée avec des échantillons positifs à différentes dilutions et pour différentes températures d'hybridation (Th). Les résultats sont présentés dans les figures 14 et 15.

Figures 14 et 15: Photos des gels d'agarose montrant les résultats de la PCR EHR16SR/EHR16SD réalisée avec de l'ADN pur et de l'ADN dilué au 1/10^{ème} (échantillons positifs 3 et 12). Les différentes températures testées ont été 55°C, 57°C et 60°C. (T+ : témoin positif, T- : témoin négatif, PM : poids moléculaire, d : dilué au 1/10^{ème})



Nous avons constaté la présence de bandes non spécifiques à la température la plus faible de 55°C et une perte de signal à une température de 60°C. La température optimale d'hybridation était de 57°C. Nous avons également constaté une perte de signal à 57°C avec l'ADN dilué au 1/10^{ème}.

II.2.3. Détection d'*Ehrlichia spp.* par PCR EHR16SR/EHR16SD

L'ensemble des prélèvements (79) a ensuite été passé en PCR EHR16SR/EHR16SD dans les conditions optimales de PCR établies précédemment (Th = 57°C et non dilution des échantillons). Les résultats sont résumés dans le tableau 12.

Tableau 12: Résultats de la PCR EHR16SR/EHR16SD (détection d'*Ehrlichia spp.*). Un + indique un résultat positif de la PCR, un – un résultat négatif. Les résultats positifs apparaissent en gris.

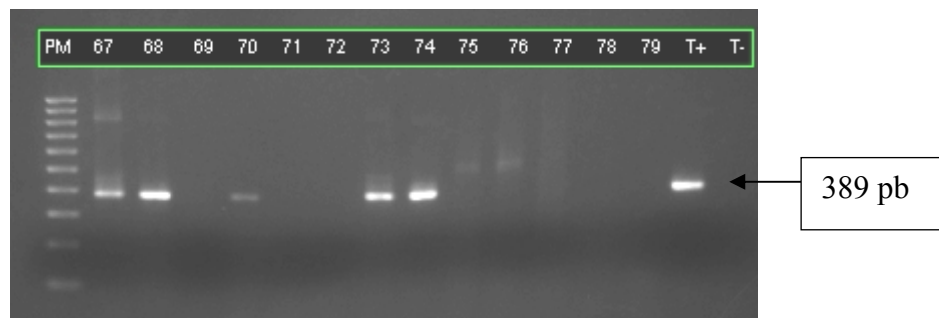
Code échantillon	n°	Résultat	Code échantillon	n°	Résultat	Code échantillon	n°	Résultat
Moud.Roy1	01	-	Moud.Roy31	31	-	Moud.Roy48	61	-
Moud.Roy2	02	+	Moud.Roy32	32	-	Moud.Roy49	62	-
Moud.Roy3	03	+	Moud.Roy33	33	-	Moud.Roy50	63	-
Moud.Roy4	04	+	Moud.Roy34	34	+	Moud.Roy51	64	-
Moud.Roy5	05	-	Moud.Roy35	35	-	StR.Jol1	65	-
Moud.Roy6	06	-	Moud.Roy36	36	-	StA.Ros2	66	-
Moud.Roy7	07	-	Moud.Roy37	37	-	Conv.Laf2	67	+
Moud.Roy8	08	-	Moud.Roy38	38	-	CBE.Arn1	68	+
Moud.Roy9	09	-	Moud.Roy39	39	-	StA.Ros3	69	-
Moud.Roy10	10	-	Moud.Roy40	40	+	Pouc.Bg1	70	-
Moud.Roy11	11	-	Moud.Roy41	41	-	Conv.Laf3	71	-
Moud.Roy12	12	+	Moud.Roy42	42	-	Pouc.Bg2	72	-
Moud.Roy13	13	-	Moud.Roy43	43	-	StF.Chauss6	73	+
Moud.Roy14	14	+	StF.Chauss1	44	+	StF.Chauss7	74	+
Moud.Roy15	15	-	StF.Chauss2	45	-	StF.Chauss8	75	+
Moud.Roy16	16	-	StF.Chauss3	46	-	Moud.Roy52	76	+
Moud.Roy17	17	+	StF.Chauss4	47	-	StR.Jol2	77	-
Moud.Roy18	18	-	GC.Ch1	48	-	Moud.Roy53	78	-
Moud.Roy19	19	-	GC.Ch2	49	-	Conv.Laf4	79	-
Moud.Roy20	20	+	St A.Ros1	50	-			
Moud.Roy21	21	+	Bouil.Da1	51	-			
Moud.Roy22	22	-	StF.Chauss5	52	+			
Moud.Roy23	23	-	Conv.Laf1	53	-			
Moud.Roy24	24	-	Ab.Hib1	54	+			
Moud.Roy25	25	-	Ab.Hib2	55	-			
Moud.Roy26	26	+	Ab.Hib3	56	+			
Moud.Roy27	27	-	Moud.Roy44	57	-			
Moud.Roy28	28	-	Moud.Roy45	58	-			
Moud.Roy29	29	+	Moud.Roy46	59	-			
Moud.Roy30	30	-	Moud.Roy47	60	-			

Sur les 79 prélèvements analysés, 22 ont présenté un résultat positif à la détection d'*Ehrlichia spp.* par PCR EHR16SR/EHR16SD. Il y a donc 28 % des échantillons qui se sont révélés positifs pour la détection d'*Ehrlichia spp.*.

II.2.4. Détection d'*Ehrlichia canis*

L'ensemble des prélèvements a ensuite été testé en PCR nichée spécifique d'*Ehrlichia canis*. La figure 16 illustre les résultats obtenus pour les prélèvements n°67 à 79.

Figure 16 : Photo de gel d'agarose montrant les résultats de la PCR nichée permettant la détection d'*E.canis* sur 13 prélèvements. (T+ : témoin positif, T- : témoin négatif, PM : poids moléculaire)



Sur la figure 16, on observe que les échantillons 67, 68, 70, 73 et 74 ont présenté un résultat positif à la détection d'*E.canis* par PCR nichée. Les résultats obtenus pour l'ensemble des prélèvements sont résumés dans le tableau 13.

Tableau 13: Résultats de la PCR permettant la détection d'*Ehrlichia canis*. Un + indique un résultat positif à la PCR de détection, un – un résultat négatif. Les résultats positifs apparaissent en gris.

Code échantillon	n°	Résultat	Code échantillon	n°	Résultat	Code échantillon	n°	Résultat
Moud.Roy1	01	-	Moud.Roy31	31	-	Moud.Roy48	61	-
Moud.Roy2	02	+	Moud.Roy32	32	-	Moud.Roy49	62	-
Moud.Roy3	03	-	Moud.Roy33	33	-	Moud.Roy50	63	-
Moud.Roy4	04	+	Moud.Roy34	34	+	Moud.Roy51	64	-
Moud.Roy5	05	-	Moud.Roy35	35	-	StR.Jol1	65	-
Moud.Roy6	06	-	Moud.Roy36	36	-	StA.Ros2	66	-
Moud.Roy7	07	-	Moud.Roy37	37	-	Conv.Laf2	67	+
Moud.Roy8	08	-	Moud.Roy38	38	-	CBE.Arn1	68	+
Moud.Roy9	09	-	Moud.Roy39	39	-	StA.Ros3	69	-
Moud.Roy10	10	-	Moud.Roy40	40	+	Pouc.Bg1	70	+
Moud.Roy11	11	-	Moud.Roy41	41	-	Conv.Laf3	71	-
Moud.Roy12	12	-	Moud.Roy42	42	-	Pouc.Bg2	72	-
Moud.Roy13	13	-	Moud.Roy43	43	-	StF.Chauss6	73	+
Moud.Roy14	14	-	StF.Chauss1	44	+	StF.Chauss7	74	+
Moud.Roy15	15	-	StF.Chauss2	45	-	StF.Chauss8	75	-
Moud.Roy16	16	-	StF.Chauss3	46	-	Moud.Roy52	76	-
Moud.Roy17	17	-	StF.Chauss4	47	-	StR.Jol2	77	-
Moud.Roy18	18	-	GC.Ch1	48	-	Moud.Roy53	78	-
Moud.Roy19	19	+	GC.Ch2	49	+	Conv.Laf4	79	-
Moud.Roy20	20	-	St A.Ros1	50	-			
Moud.Roy21	21	-	Bouil.Da1	51	-			
Moud.Roy22	22	-	StF.Chauss5	52	+			
Moud.Roy23	23	-	Conv.Laf1	53	-			
Moud.Roy24	24	-	Ab.Hib1	54	-			
Moud.Roy25	25	-	Ab.Hib2	55	-			
Moud.Roy26	26	+	Ab.Hib3	56	+			
Moud.Roy27	27	-	Moud.Roy44	57	-			
Moud.Roy28	28	-	Moud.Roy45	58	-			
Moud.Roy29	29	-	Moud.Roy46	59	-			
Moud.Roy30	30	-	Moud.Roy47	60	-			

Sur 79 prélèvements, 15 ont présenté un résultat positif à la détection d'*E.canis* par PCR nichée, soit 19%.

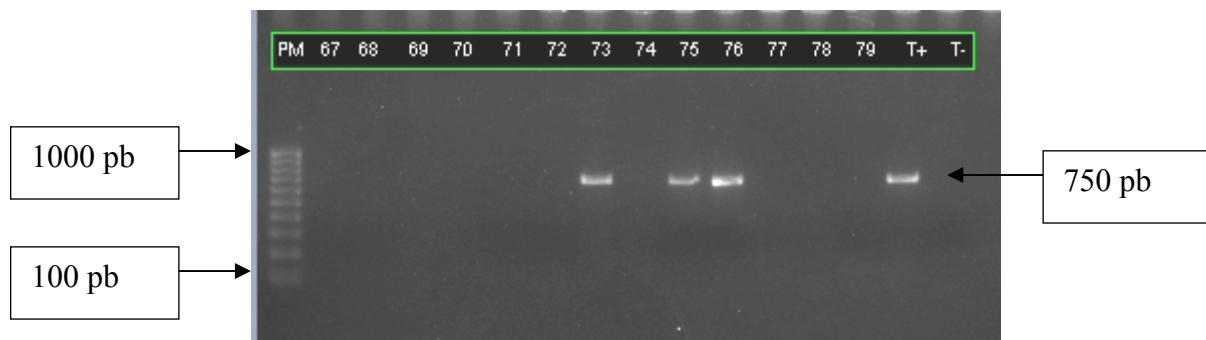
Sur ces 15 échantillons positifs, 3 étaient négatifs en PCR simple EHR16SR/EHR16SD (chiens n°19, 49 et 70).

II.2.5. Détection d'*Anaplasma platys*

Les 79 prélèvements ont été testés en PCR nichée spécifique d'*A.platys*.

La figure 17 donne un exemple des résultats obtenus avec cette PCR.

Figure 17 : Photo de gel d'agarose montrant les résultats de la PCR nichée spécifique d'*A.platys* pour les prélèvements 67 à 79. (T+ : témoin positif, T- : témoin négatif, PM : poids moléculaire)



La figure 17 montre que les échantillons 73, 75 et 76 étaient positifs à la détection d'*A.platys*. Les résultats obtenus pour l'ensemble des prélèvements sont résumés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Résultats de la PCR permettant la détection d'*A. platys*. Un + indique un résultat positif à la PCR de détection, un – un résultat négatif. Les résultats positifs apparaissent en gris.

Code échantillon	n°	Résultat	Code échantillon	n°	Résultat	Code échantillon	n°	Résultat
Moud.Roy1	01	-	Moud.Roy31	31	-	Moud.Roy48	61	-
Moud.Roy2	02	-	Moud.Roy32	32	-	Moud.Roy49	62	-
Moud.Roy3	03	+	Moud.Roy33	33	-	Moud.Roy50	63	-
Moud.Roy4	04	-	Moud.Roy34	34	-	Moud.Roy51	64	-
Moud.Roy5	05	-	Moud.Roy35	35	-	StR.Jol1	65	-
Moud.Roy6	06	-	Moud.Roy36	36	-	StA.Ros2	66	-
Moud.Roy7	07	-	Moud.Roy37	37	-	Conv.Laf2	67	-
Moud.Roy8	08	-	Moud.Roy38	38	-	CBE.Arn1	68	-
Moud.Roy9	09	-	Moud.Roy39	39	-	StA.Ros3	69	-
Moud.Roy10	10	-	Moud.Roy40	40	-	Pouc.Bg1	70	-
Moud.Roy11	11	-	Moud.Roy41	41	-	Conv.Laf3	71	-
Moud.Roy12	12	+	Moud.Roy42	42	-	Pouc.Bg2	72	-
Moud.Roy13	13	-	Moud.Roy43	43	-	StF.Chaus6	73	+
Moud.Roy14	14	+	StF.Chaus1	44	+	StF.Chaus7	74	-
Moud.Roy15	15	-	StF.Chaus2	45	-	StF.Chaus8	75	+
Moud.Roy16	16	-	StF.Chaus3	46	-	Moud.Roy52	76	+
Moud.Roy17	17	+	StF.Chaus4	47	-	StR.Jol2	77	-
Moud.Roy18	18	-	GC.Ch1	48	-	Moud.Roy53	78	-
Moud.Roy19	19	-	GC.Ch2	49	-	Conv.Laf4	79	-
Moud.Roy20	20	+	St A.Ros1	50	-			
Moud.Roy21	21	+	Bouil.Da1	51	-			
Moud.Roy22	22	+	StF.Chaus5	52	-			
Moud.Roy23	23	-	Conv.Laf1	53	-			
Moud.Roy24	24	-	Ab.Hib1	54	+			
Moud.Roy25	25	-	Ab.Hib2	55	-			
Moud.Roy26	26	-	Ab.Hib3	56	-			
Moud.Roy27	27	-	Moud.Roy44	57	-			
Moud.Roy28	28	-	Moud.Roy45	58	-			
Moud.Roy29	29	+	Moud.Roy46	59	-			
Moud.Roy30	30	-	Moud.Roy47	60	-			

Sur les 79 prélèvements testés, 13 ont présenté un résultat positif à la détection d'*A.platys* par PCR nichée, soit 16%.

Parmi ces 13 positifs, 1 échantillon (n°22) était négatif à la détection d'*Ehrlichia spp.* par PCR simple EHR16SR/EHR16SD.

II.2.6. Synthèse des résultats

Le tableau 15 regroupe l'ensemble des résultats obtenus en PCR simple et en PCR nichée spécifique d'*E. canis* et d'*A.platys* afin de comparer les différentes méthodes et d'identifier les espèces présentes.

Tableau 15: Résultats en PCR des 79 prélèvements. Un + indique un résultat positif à la PCR de détection, un – un résultat négatif. Les échantillons négatifs en PCR simple et positifs en PCR spécifique sont notés en gris.

Code échantillon	N°	Résultat à la détection d' <i>Ehrlichia spp.</i> par PCR simple	Résultat à la détection d' <i>E.canis</i> et <i>A.platys</i> par PCR spécifique
Moud.Roy1	01	-	-
Moud.Roy2	02	+	Canis
Moud.Roy3	03	+	Platys
Moud.Roy4	04	+	Canis
Moud.Roy5	05	-	-
Moud.Roy6	06	-	-
Moud.Roy7	07	-	-
Moud.Roy8	08	-	-
Moud.Roy9	09	-	-
Moud.Roy10	10	-	-
Moud.Roy11	11	-	-
Moud.Roy12	12	+	Platys
Moud.Roy13	13	-	-
Moud.Roy14	14	+	Platys
Moud.Roy15	15	-	-
Moud.Roy16	16	-	-
Moud.Roy17	17	+	Platys
Moud.Roy18	18	-	-
Moud.Roy19	19	-	Canis
Moud.Roy20	20	+	Platys
Moud.Roy21	21	+	Platys
Moud.Roy22	22	-	Platys

Code échantillon	N°	Résultat à la détection d' <i>Ehrlichia</i> spp. par PCR simple	Résultat à la détection d' <i>E.canis</i> et <i>A.platys</i> par PCR spécifique
Moud.Roy23	23	-	-
Moud.Roy24	24	-	-
Moud.Roy25	25	-	-
Moud.Roy26	26	+	Canis
Moud.Roy27	27	-	-
Moud.Roy28	28	-	-
Moud.Roy29	29	+	Platys
Moud.Roy30	30	-	-
Moud.Roy31	31	-	-
Moud.Roy32	32	-	-
Moud.Roy33	33	-	-
Moud.Roy34	34	+	Canis
Moud.Roy35	35	-	-
Moud.Roy36	36	-	-
Moud.Roy37	37	-	-
Moud.Roy38	38	-	-
Moud.Roy39	39	-	-
Moud.Roy40	40	+	Canis
Moud.Roy41	41	-	-
Moud.Roy42	42	-	-
Moud.Roy43	43	-	-
StF.Chauss1	44	+	Canis/Platys
StF.Chauss2	45	-	-
StF.Chauss3	46	-	-
StF.Chauss4	47	-	-
GC.Ch1	48	-	-
GC.Ch2	49	-	Canis
St A.Ros1	50	-	-
Bouil.Da1	51	-	-
StF.Chauss5	52	+	Canis
Conv.Lafl	53	-	-
Ab.Hib1	54	+	Platys
Ab.Hib2	55	-	-

Code échantillon	N°	Résultat à la détection d' <i>Ehrlichia</i> spp. par PCR simple	Résultat à la détection d' <i>E.canis</i> et <i>A.platys</i> par PCR spécifique
Ab.Hib3	56	+	Canis
Moud.Roy44	57	-	-
Moud.Roy45	58	-	-
Moud.Roy46	59	-	-
Moud.Roy47	60	-	-
Moud.Roy48	61	-	-
Moud.Roy49	62	-	-
Moud.Roy50	63	-	-
Moud.Roy51	64	-	-
StR.Jol1	65	-	-
StA.Ros2	66	-	-
Conv.Laf2	67	+	Canis
CBE.Arn1	68	+	Canis
StA.Ros3	69	-	-
Pouc.Bg1	70	-	Canis
Conv.Laf3	71	-	-
Pouc.Bg2	72	-	-
StF.Chauss6	73	+	Canis/Platys
StF.Chauss7	74	+	Canis
StF.Chauss8	75	+	Platys
Moud.Roy52	76	+	Platys
StR.Jol2	77	-	-
Moud.Roy53	78	-	-
Conv.Laf4	79	-	-

Sur les 79 prélèvements analysés,

- 22 (28 %) ont été positifs à la détection d'*Ehrlichia* spp. par PCR EHR16SR/EHR16SD.
- 26 (33 %) ont été positifs à la détection d'*E.canis* et/ou d'*A.platys* par PCR nichée:
 - o 13 ont été positifs à la détection d'*Ehrlichia canis* par PCR nichée.
 - o 11 ont été positifs à la détection d'*Anaplasma platys* par PCR nichée.
 - o 2 prélèvements ont été positifs à la fois à la détection d'*E.canis* et d'*A.platys* par PCR nichée (coinfections).

Tous les prélèvements positifs à la détection d'*Ehrlichia spp.* par PCR simple EHR16SR/EHR16SD étaient soit positifs à la détection d'*E.canis*, soit positifs à la détection d'*A.platys*, soit positifs aux deux détections.

4 prélèvements étaient négatifs à la détection d'*Ehrlichia spp.* par PCR simple EHR16SR/EHR16SD et se sont révélés positifs par PCR nichée spécifique d'*E.canis* (3 échantillons) ou d'*A.platys* (1 échantillon).

II.2.7. Caractéristiques de la PCR EHR16SR/EHR16SD

Nous avons calculé les valeurs intrinsèques (sensibilité -Se- et spécificité -Sp-) et extrinsèques de la PCR simple EHR16SR/EHR16SD (valeur prédictive positive -VPP- et négative -VPN-), en prenant comme références les résultats obtenus avec les PCR nichées.

Rappelons que la sensibilité de cette PCR se définit comme la probabilité qu'un animal ayant des bactéries circulantes (chien malade) donne bien un résultat positif à la PCR.

$Se = VP/(VP+FN)$, où VP sont les vrais positifs et FN les faux négatifs

La spécificité d'une PCR est la probabilité qu'un animal sain donne bien un résultat négatif au test.

$Sp = VN/(VN+FP)$, où VN sont les vrais négatifs et FP sont les faux positifs

La valeur prédictive positive de la PCR est la probabilité qu'un résultat positif à cette PCR désigne effectivement un animal malade.

$VPP = VP/(VP+FP)$

La valeur prédictive négative de la PCR est la probabilité qu'un résultat négatif à cette PCR désigne effectivement un animal sain.

$VPN = VN/(N+FN)$

En prenant les PCR nichées comme références, nous avons pu calculer les caractéristiques intrinsèques et extrinsèques de la PCR simple EHR16SR/EHR16SD. Le tableau 16 récapitule la répartition des 79 résultats pour les deux types de PCR effectués.

Tableau 16 : Répartition des 79 résultats en PCR simple et en PCR nichées

		PCR nichée canis ou platys	
		-	+
PCR simple EHR16S	-	53	4
	+	0	22

A partir de ces données, nous avons calculé les valeurs extrinsèques et intrinsèques de la PCR simple EHR16SR/EHR16SD. Les résultats sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17: Caractéristiques de la PCR simple EHR16SR/EHR16SD

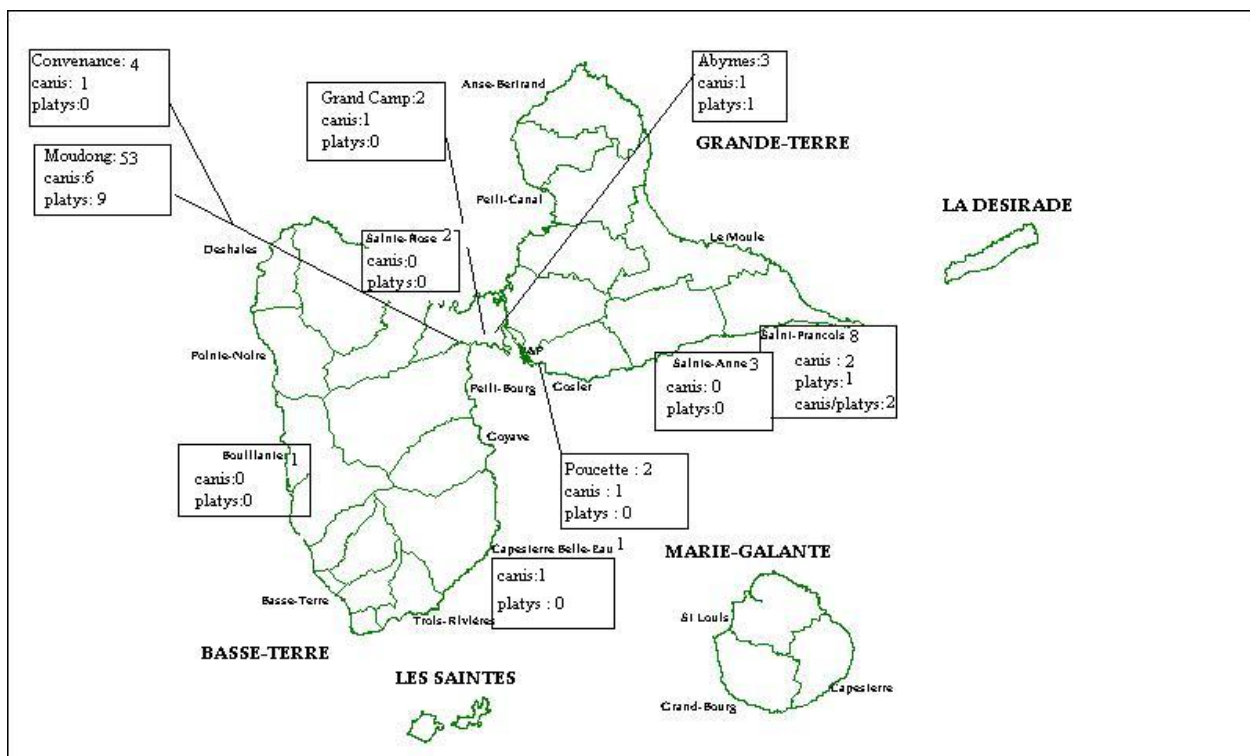
	sensibilité	spécificité	VPN	VPP
PCR simple EHR16S	92%	100%	93%	100%

La PCR EHR16SR/EHR16SD a donc une sensibilité de 92% et une spécificité de 100% quant à la détection d'*Ehrlichia spp.* dans le sang.

II.2.8. Répartition des cas positifs en Guadeloupe

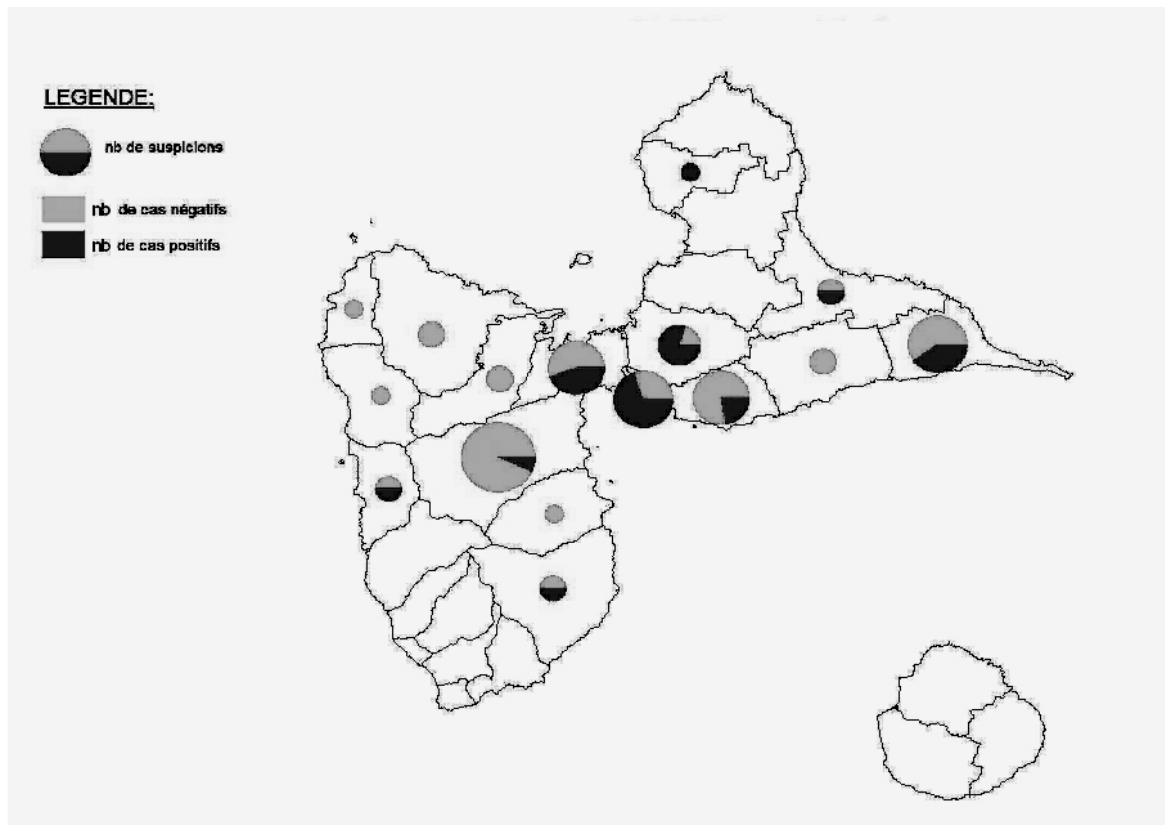
Nous avons reporté sur une carte de la Guadeloupe le nombre de prélèvements ainsi que les résultats positifs obtenus par clinique. La figure 18 montre la répartition géographique par clinique des échantillons sanguins et de leurs résultats.

Figure 18 : Répartition géographique des prélèvements sanguins et de leurs résultats par clinique d'origine.



Pour une plus grande précision, nous avons également considéré le domicile du propriétaire de chaque chien inclus dans l'étude. La figure 19 montre la répartition géographique par commune des prélèvements et des résultats obtenus.

Figure 19: Répartition des cas suspects d'ehrlichiose canine par commune. La taille du camembert est proportionnelle au nombre de cas suspects dans la commune.



L'étude de la répartition géographique des prélèvements réalisés sur les chiens suspects cliniques d'ehrlichiose ainsi que de leurs résultats montre que:

- **La majorité de cas d'ehrlichiose venaient du Sud de la Grande Terre et du centre de la Guadeloupe.** Notons que les deux cas de coinfection venaient de la même clinique (St François).
- **Peu de cas suspects ont été rapportés en Basse-Terre.**
- **Peu de cas suspects ont été rapportés dans le Nord de la Grande Terre.**

II.2.9. Caractéristiques épidémiologiques des chiens inclus dans l'étude

- o Les données épidémiologiques de 71 chiens ont pu être obtenues. Ces 71 chiens avaient un **âge moyen de 5.4 ans, allant de 2 mois à 15 ans.**
- o **31 de ces chiens étaient des femelles, soit 44%, et 40 étaient des mâles, soit 56%.**
Parmi les 26 chiens positifs, 14 étaient des mâles (soit 54%), 12 étaient des femelles (soit 46%). Ainsi, sur les 40 mâles, 14 étaient positifs (35 %), et sur les 31 femelles, 12 étaient positives (39%). Nous n'avons pas constaté de différence significative entre la proportion de chiens positifs chez les mâles et la proportion de chiens positifs chez les femelles ($p=0.748$, test du χ^2).
- o Beaucoup de races étaient représentées : yorkshire, pékinois, rottweiller, berger allemand, dogue allemand, dogue argentin, terre-neuve, beauceron, téckel, caniche, mâtin espagnol, labrador, dalmatien, boxer, american staffordshire terrier, berger belge, loulou de poméranie, shi-tzu, cane corso, coton de tuléar. Quelques chiens dits « créoles », c'est-à-dire croisés ont participé également à cette étude. Un berger allemand sur les deux inclus dans l'étude a été positif en PCR.
- o Parmi les 79 chiens inclus dans l'étude, 24 présentaient des tiques lors du mois précédent la consultation (observées par le propriétaire) ou lors de la consultation (observées par le vétérinaire). 11 ne présentaient pas de tiques. Nous n'avons pas obtenu d'informations concernant 44 chiens. Le tableau 18 regroupe les résultats en PCR simple EHR16SR/EHR16SD des chiens dont nous avons les informations concernant la présence de tiques dans le mois précédent l'apparition des symptômes évocateurs d'ehrlichiose.

Tableau 18 : Présence ou absence de tiques sur les chiens dont le sang a été analysé par PCR

	Résultat à la détection d' <i>Ehrlichia</i> spp. par PCR simple	
	-	+
11 chiens sans tiques	9 (82%)	2 (18%)
24 chiens avec tiques	12 (50%)	12 (50%)

Parmi les chiens ayant présenté des tiques, il y avait autant de chiens positifs que de chiens négatifs en PCR. **Parmi les chiens n'ayant pas présenté de tiques, 82% étaient négatifs en PCR.**

La différence obtenue entre la proportion de positifs chez les chiens infestés de tiques et la proportion de positifs chez les chiens ne présentant pas de tiques n'est pas significative. (p = 0.137, test exact de Fisher).

II.2.10. Données cliniques et examens complémentaires

- Durée d'évolution des symptômes :

Les informations concernant la durée d'évolution des symptômes ont été obtenues pour 40 des 79 chiens de l'étude. **Le temps d'évolution des symptômes des 40 chiens prélevés a varié de 2 heures à 2 mois et demi avec une moyenne de 7 jours et une médiane de 3 jours.**

Les informations concernant la durée d'évolution des symptômes ont été obtenues pour 17 des 26 chiens positifs en PCR. **Parmi ces 17 chiens positifs, le temps d'évolution des symptômes a varié de 2 heures à 15 jours, avec une moyenne à 5 jours et une médiane à 3 jours.**

- Signes cliniques :

- o Température :

Nous avons obtenu la valeur chiffrée de la température de 43 chiens de l'étude. La température moyenne de ces 43 chiens prélevés ainsi que leur température médiane étaient de 39.3°C.

La température moyenne des chiens négatifs était de 39.5°C, leur température médiane était de 39.7°C.

La **température moyenne des chiens positifs** à la détection d'*Ehrlichia spp.* de notre étude était de **39.0°C** (de 36.8°C à 40.5°C). La **température médiane** se situait à **39.1°C**.

La **température moyenne des 13 chiens atteints d'ehrlichiose à *Ehrlichia canis*** était de **39.2°C** (avec des valeurs allant de 38°C à 40.5°C), celle des **11 chiens atteints d'ehrlichiose à *Anaplasma platys*** était de **39.0°C** (avec des valeurs allant de 36.8°C à 40°C).

- o Examen clinique :

L'examen clinique a été reporté sous la forme d'un tableau regroupant 15 critères : abattement, dysorexie/anorexie, jetage nasal, amaigrissement, troubles de l'hémostase, douleur

articulaire, troubles oculaires, troubles respiratoires, adénomégale, diarrhée, vomissement, splénomégale, troubles cutanés, troubles nerveux et pâleur des muqueuses.

Ces données ont été obtenues pour 69 des 79 chiens inclus dans l'étude.

Le tableau 19 ci-dessous regroupe les différents signes cliniques observés chez 43 des 53 chiens négatifs, chez les 26 chiens positifs à *Ehrlichia spp.* (13 chiens positifs à *E.canis*, 11 chiens positifs à *A.platys* et 2 chiens avec coinfection).

Tableau 19 : Signes cliniques observés chez 69 chiens de l'étude.

	abattement	dysorexie	jetage nasal	amaigrissement	troubles de l'hémostase	douleur articulaire	troubles oculaires
43 chiens négatifs à <i>Ehrlichia spp.</i>	21 (49%)	13 (30%)	6 (14%)	8 (19%)	11 (26%)	4 (9%)	3 (7%)
26 chiens positifs à <i>Ehrlichia spp.</i>	14 (54%)	12 (46%)	5 (19%)	6 (23%)	8 (31%)	3 (12%)	5 (19%)
13 chiens positifs à <i>E.canis</i>	9	6	2	5	4	1	3
11 chiens positifs à <i>A.platys</i>	4	5	0	1	3	2	2
2 chiens avec coinfections	1	1	1	0	1	0	0

	troubles respiratoires	adénomégale	diarrhée	vomissement	splénomégale	troubles cutanés	troubles nerveux	muqueuses pâles
43 chiens négatifs à <i>Ehrlichia spp.</i>	6 (14%)	1 (2%)	1 (2%)	5 (12%)	0	6 (14%)	4 (9%)	7 (16%)
26 chiens positifs à <i>Ehrlichia spp.</i>	6 (23%)	0	2 (8%)	5 (19%)	1	2 (8%)	1 (4%)	9 (35%)
13 chiens positifs à <i>E.canis</i>	5	0	0	0	1	2	0	6
11 chiens positifs à <i>A.platys</i>	1	0	2	5	?	0	1	3
2 chiens avec coinfections	0	0	0	0	?	0	0	0

Afin d'évaluer la significativité de la présence d'un de ces symptômes, nous avons comparé les taux de positivité en PCR obtenus chez les chiens présentant un symptôme considéré et chez ceux ne présentant pas ce symptôme. Les valeurs obtenues soit avec le test du chi2 soit avec le test exact de Fisher sont regroupées dans le tableau 20.

Tableau 20 : Valeurs de p obtenues pour les différents critères cliniques

	valeur de p obtenue avec le test du chi2	valeur de p obtenue avec le test exact de Fisher
abattement	0,687	-
dysorexie	0,182	-
jetage nasal	0,562	-
amaigrissement	0,654	-
troubles de l'hémostase	0,640	-
douleur articulaire	-	1
troubles oculaires	-	0,143
troubles respiratoires	0,333	-
adénomégalie	-	1
diarrhée	-	0,552
vomissement	0,385	-
splénomégalie	-	0,377
troubles cutanés	-	0,701
troubles nerveux	-	0,643
muqueuses pâles	0,080	-

Nous n'avons pas constaté de différence significative entre les signes cliniques observés chez les animaux négatifs en PCR et ceux observés chez les animaux positifs en PCR.

Les troubles de l'hémostase rencontrés dans notre étude ont été: la présence de pétéchies, épistaxis, hématurie et méléna.

Plus particulièrement, le tableau 21 montre la présence d'une épistaxis chez les chiens ayant été testés en PCR.

Tableau 21 : Présence d'une épistaxis chez les 43 chiens négatifs et chez les 26 chiens positifs à la détection d'*Ehrlichia spp.*

	43 chiens négatifs à la détection d' <i>Ehrlichia spp.</i>	26 chiens positifs à la détection d' <i>Ehrlichia spp.</i>		
épistaxis	4 (9%)	3 (11%)		
		13 chiens positifs à la détection d' <i>E. canis</i>	11 chiens positifs à la détection d' <i>A. platys</i>	2 chiens avec coinfection
		2	0	1

Nous n'avons pas constaté de différence significative entre la proportion de chiens ayant présenté une épistaxis parmi les chiens négatifs (9%) et la proportion de chiens ayant présenté une épistaxis parmi les chiens positifs (11%) ($p=1$, test exact de Fisher).

Ainsi, les signes cliniques observés chez les animaux positifs de notre étude étaient, par ordre d'importance :

- **abattement (54%)**
- **dysorexie (46%)**
- **pâleur des muqueuses (35%)**
- **troubles de l'hémostase (31%)**
- **amaigrissement / troubles respiratoires (23%)**
- **jetage / troubles oculaires / vomissement (19%)**
- **troubles nerveux (4%)**

- Examens complémentaires :

- o Hématologie :

- Données brutes :

Les données brutes sont regroupées dans les tableaux 22 et 23. Elles concernent 11 chiens positifs et 13 chiens négatifs en PCR. Les valeurs s'écartant des normes en vigueur pour l'espèce canine ont été notées en gras lorsqu'elles étaient en défaut, en italique lorsqu'elles étaient en excès.

Le tableau 22 regroupe les valeurs hématologiques obtenues pour 11 chiens positifs en PCR.

Tableau 22 : Données hématologiques recueillies pour 11 chiens positifs en PCR.

Légende : Ht= hématoците, Hb = hémoglobine, GB : globules blancs, L/M : rapport lympho-monocytaire, cell = cellules, canis : prélèvement positif à la détection d'*E.canis*, platys : prélèvement positif à la détection d'*A. platys*

n° du prélèvement	Ht (37-55)	Hb (12-18 g/dl)	réticulocytes	plaquettes (175-500 10 ⁹ cell/l)
12 (platys)	38,6	13		>146
22 (platys)	47,3	15,9		407
29 (platys)	39,4	13,1	0,5%	424
40 (canis)	26,3	8,8	>5%	131
49 (canis)	35,4	10,7		120
54 (canis)	28,7	10,3		126
56 (canis)	27,4	9,2	0	134
67 (canis)	44	15,4		75
68 (canis)	38	12,1		15
70 (canis)	32,8	11,2		125
76 (platys)	34	11,6	1,3%	315

n° du prélèvement	GB (6-16,9 10 ⁹ cell/l)	granulocytes (3,3-12,0 10 ⁹ cell/l)	neutrophiles (2,8-10,5 10 ⁹ cell/l)	éosinophiles (0,5-1,5 10 ⁹ cell/l)	L/M (1,1-6,3 10 ⁹ cell/l)
12 (platys)	9,5	4,9	15,4	0,9	4,6
22 (platys)	18,9	16,3	20,3	0,9	2,6
29 (platys)	27,6	23,4		4,2	4,2
40 (canis)	12,5	6,7			5,8
49 (canis)	13,6	10,3			3,3
54 (canis)					
56 (canis)	7,1	4,1			3
67 (canis)	5,7		3,8	0	1,9
68 (canis)	9,7		5,1	0,3	1,9
70 (canis)	13	5,2	3,8	1,4	7,8
76 (platys)	17,3	14,4			2,9

Parmi les 11 chiens atteints d'ehrlichiose ayant eu une numération formule sanguine, **6** **présentaient une anémie**, dont 4 chiens porteurs d'*E.canis* et 2 d'*A.platys*. Notons le cas d'**une aplasie médullaire** (chien n°56).

Sept chiens présentaient une thrombocytopénie, dont 6 chiens porteurs d'*E.canis*, 1 d'*A.platys*. Notons le cas de deux thrombocytopénies sévères (chiens n°67 et 68).

Pour 5 chiens sur 7, anémie et thrombocytopénie étaient associées, 4 de ces 5 chiens étaient porteurs d'*E.canis*.

Parmi ces 11 chiens, **3 tous porteurs d'*A.platys* présentaient une leucocytose par granulocytose**.

Le tableau 23 regroupe les mêmes données hématologiques, obtenues pour 13 chiens négatifs en PCR :

Tableau 23 : Données hématologiques recueillies pour 13 chiens négatifs en PCR.

Légende : Ht= hématocrite, Hb = hémoglobine, GB : globules blancs, L/M : rapport lympho-monocytaire, cell = cellules, canis : prélèvement positif à la détection d'*E.canis*, platys : prélèvement positif à la détection d'*A. platys*

n° du prélèvement	Ht (37-55)	Hb (12-18 g/dl)	réticulocytes	plaquettes (175-500 10 ⁹ cell/l)
9	39,9	13,9		199
16	21	6,6		157
18	25	7,9		834
23	22,7	7,6	1,8%	232
25	34,9	12	0,3%	292
31	42,8	14,7	0,3%	254
35	36,4	10,8		407
47				207
48	29,9	10,4		
58	30,8	10,7	1,2%	106
66	29	9,2		84
72	46,7	15,4	3,3%	50
77	34,5	11,5		186
78	33,9	11,4	0,4%	541

n° du prélèvement	GB (6-16,9 10 ⁹ cell/l)	granulocytes (3,3-12,0 10 ⁹ cell/l)	neutrophiles (2,8-10,5 10 ⁹ cell/l)	éosinophiles (0,5-1,5 10 ⁹ cell/l)	L/M (1,1-6,3 10 ⁹ cell/l)
9	9,8	9,2			0,6
16	33,6	21,4			11
18	34	28			14
23	20	16,8	12,5	4,2	3,3
25	10,8	7	5,7	1,3	3,8
31	34,3	9	7	2	3,1
35	15,3	9,7			5,6
48					
58	18,8	16,2	13,3		
66	63				
72	14,3	10,2	8,1	2,1	4,1
77	14,1	11,8	7,5	4,3	2,3
78	13,1	11,7	10	1,7	1,4

Six chiens négatifs en PCR présentaient une anémie, 5 présentaient une leucocytose.

□ Analyse statistique :

A partir des tableaux 22 et 23, nous avons pu étudier les résultats en PCR des animaux présentant une anémie, une leucocytose, une leucopénie ou une thrombopénie. Le tableau 24 regroupe les données obtenues.

Tableau 24: Résultats en PCR des animaux ayant présenté des modifications hématologiques

	résultat à la détection d' <i>Ehrlichia</i> spp. par PCR simple	
	-	+
anémie (12)	6	6
leucocytose (8)	5	3
leucopénie (1)	0	1
thrombopénie (14)	7	7

Parmi les chiens ayant présenté une anémie, il y avait autant de chiens négatifs que de chiens positifs en PCR. De même pour les chiens ayant présenté une thrombopénie. Nous

n'avons pas constaté de différence significative entre la proportion de chiens positifs ayant présenté une leucopénie et la proportion de chiens négatifs ayant présenté une leucopénie ($p=1$, test exact de Fisher). De même, nous n'avons pas constaté de différence significative entre la proportion de chiens positifs ayant présenté une leucocytose et la proportion de chiens négatifs ayant présenté une leucocytose. ($p=1$, test exact de Fisher)

Nous avons plus particulièrement étudié les cas de thrombopénie. Le tableau 25 regroupe les résultats en PCR des chiens ayant présenté une thrombopénie.

Tableau 25: Exploration de la thrombopénie chez 27 chiens testés en PCR.

	Nombre de chiens (et %) ayant présenté une thrombopénie (numération $< 145 \cdot 10^9/l$)
17 chiens négatifs à <i>Ehrlichia spp.</i>	7 (41%)
10 chiens positifs à <i>Ehrlichia spp.</i>	7 (70%)

Parmi les 10 chiens positifs en PCR dont nous avons la numération plaquettaire, 70% présentaient une thrombopénie, alors que parmi les 17 chiens négatifs, 41% présentaient une thrombopénie. Parmi les 14 chiens thrombopéniques, 7 étaient positifs en PCR ; soit 50% (tableau 25). Parmi 13 chiens dont la numération plaquettaire était normale, 3 étaient positifs en PCR, soit 23% (données non représentées). Nous n'avons pas constaté de différence significative entre la proportion de chiens positifs en PCR présentant une thrombopénie (7/10) et la proportion de chiens positifs en PCR ayant une numération plaquettaire normale (3/10) ($p = 0.148$, test du χ^2).

o Biochimie

Quatre chiens ont eu une analyse biochimique parmi les 26 positifs.

Un chien était insuffisant rénal. Nous ne disposons d'aucune information quant à la chronicité de l'insuffisance rénale (pas de ionogramme). Cependant, l'animal était âgé de 6 ans et les symptômes étaient apparus 3 jours avant la visite chez le vétérinaire, ce qui était plus en faveur d'une insuffisance rénale aiguë due à l'ehrlichiose (glomérulopathie).

Un chien était insuffisant hépatique. L'animal était âgé de 1,5 an, l'origine infectieuse de l'insuffisance hépatique était la plus probable.

Un chien était insuffisant rénal et présentait des ALAT augmentées. Ce chien était âgé de 12 ans. L'ehrlichiose n'était donc peut être pas la seule cause de l'augmentation de ces paramètres biochimiques.

Un chien présentait un bilan biochimique normal.

o Tests sérologiques rapides

Lorsque les vétérinaires praticiens de l'île ont été face à un animal présentant des symptômes évocateurs d'ehrlichiose, ils ont pu utiliser trois types de test sérologique rapide :

- Witness®Ehrlichia (laboratoire Synbiotics)
- Speed®Ehrli (laboratoire BVT)
- Snap 3DX (laboratoire Idexx)

Ces tests sont fondés sur le principe de l'immunomigration sur membrane : après ajout d'une goutte de sang total, de sérum ou de plasma et d'un réactif, les complexes conjugués-anticorps formés migrent par capillarité sur une bande de papier et, en présence d'anticorps spécifiques, forment des complexes colorés au niveau de l'antigène d'*Ehrlichia canis*. Le mélange continue ensuite de migrer jusqu'à une zone de contrôle à l'extrémité de la fenêtre, où les particules colorées forment une bande de contrôle (rose ou bleue), témoin positif confirmant la validité du test.

Le SNAP 3DX détecte de façon simultanée l'antigène de *Dirofilaria immitis* (responsable de la dirofilariose), l'anticorps de *Borrelia burgdorferi* (responsable de la maladie de Lyme) et l'anticorps d'*Ehrlichia canis*. Les deux autres tests détectent uniquement les anticorps d'*Ehrlichia canis*.

Le tableau 26 met en parallèle les résultats obtenus en PCR et au test rapide à la clinique. Un résultat noté + est positif, - est négatif, et ? est douteux.

Tableau 26: Résultats au test sérologique et en PCR de 47 chiens. Un + indique un résultat positif, un – un résultat négatif, un ? un résultat douteux. W = test Witness®Ehrlichia, 3D = test Snap 3DX, S = test Speed®Ehrli.

Code échantillon	N°	PCR	test sérologique	Code échantillon	N°	PCR	test sérologique
Moud.Roy2	02	+ canis	+ (W)	StF.Chauss1	44	+canis/+platys	+ (3D)
Moud.Roy3	03	+ platys	+ (W)	StF.Chauss3	46	-	+ (3D)
Moud.Roy6	06	-	+ (W)	GC.Ch1	48	-	+ (S)
Moud.Roy7	07	-	- (W)	GC.Ch2	49	+ canis	+ (S)
Moud.Roy14	14	+ platys	+ (W)	St A.Ros1	50	-	+ (3D)
Moud.Roy16	16	-	+ (W)	Ab.Hib1	54	+ platys	- (W)
Moud.Roy17	17	+ platys	+ (W)	Ab.Hib2	55	-	+ (3D)
Moud.Roy18	18	-	+ (W)	Ab.Hib3	56	+ canis	- (3D)
Moud.Roy19	19	+ canis	+ (3D)	Moud.Roy45	58	-	+ (W)
Moud.Roy21	21	+ platys	+ (W)	Moud.Roy46	59	-	+ (W)
Moud.Roy22	22	+ platys	+ (W)	Moud.Roy47	60	-	+ (W)
Moud.Roy23	23	-	+ (W)	Moud.Roy50	63	-	+ (W)
Moud.Roy29	29	+ platys	+ (W)	StR.Jol1	65	-	- (3D)
Moud.Roy30	30	-	+ (W)	StA.Ros2	66	-	- (3D)
Moud.Roy32	32	-	+ (W)	Conv.Laf2	67	+ canis	+ (S)
Moud.Roy33	33	-	+ (W)	Pouc.Bg1	70	+ canis	+ (3D)
Moud.Roy34	34	+ canis	+ (3D)	Conv.Laf3	71	-	+ (S)
Moud.Roy36	36	-	+ (W)	Pouc.Bg2	72	-	+ (3D)
Moud.Roy37	37	-	+ (W)	StF.Chauss6	73	+canis/+platys	+ (3D)
Moud.Roy38	38	-	+ (W)	StF.Chauss8	75	+ platys	+ (3D)
Moud.Roy39	39	-	+ (3D)	Moud.Roy52	76	+ platys	+ (W)
Moud.Roy40	40	+ canis	+ (W)	StR.Jol2	77	-	+ (3D)
Moud.Roy41	41	-	+ (W)	Moud.Roy53	78	-	+ (W)
Moud.Roy42	42	-	+ (W)				

Dans notre étude, 51 chiens ont été testés avec l'un de ces trois kits sérologiques rapides. 4 résultats ont été douteux et se sont révélés négatifs en PCR. Ils n'ont pas été inclus dans l'analyse.

Nous nous proposons de calculer les valeurs intrinsèques (sensibilité -Se- et spécificité -Sp-) et extrinsèques de ces tests (valeur prédictive positive -VPP- et négative -VPN-), en prenant comme références les résultats obtenus par PCR.

Rappelons que la sensibilité d'un test sérologique se définit comme la probabilité qu'un animal porteur d'anticorps spécifiques (chien malade ou séropositif) donne bien un résultat positif au test.

$Se = VP/(VP+FN)$, où VP sont les vrais positifs et FN les faux négatifs

La spécificité d'un test sérologique est la probabilité qu'un animal séronégatif donne bien un résultat négatif au test.

$Sp = VN/(VN+FP)$, où VN sont les vrais négatifs et FP sont les faux positifs

La valeur prédictive positive d'un test est la probabilité qu'un résultat positif au test désigne effectivement un animal malade.

$VPP = VP/(VP+FP)$

La valeur prédictive négative d'un test est la probabilité qu'un résultat négatif au test désigne effectivement un animal sain.

$VPN = VN/(N+FN)$

Le tableau 27 regroupe les données obtenues pour les 47 chiens testés (les deux coinfections ont été notées entre parenthèses).

Tableau 27: Résultats en PCR des 47 chiens testés avec un test sérologique rapide. Les deux coinfections sont notées entre parenthèses.

			PCR canis ou platys			
			PCR -	total PCR +	PCR + canis	PCR + platys
witness 28	-	2	1	1	0	1
	+	26	17	9	2	7
SNAP 3Dx 15	-	3	2	1	0	1
	+	12	6	6	3 (+2)	1(+2)
speed 4	-	0	0	0	0	0
	+	4	2	2	2	0

▫ Si on choisit comme référence un résultat positif en PCR à la détection d'*Ehrlichia canis* ou d'*Anaplasma platys*, les valeurs intrinsèques et extrinsèques obtenues pour les 3 tests rapides sont présentées dans le tableau 28.

Tableau 28: Valeurs intrinsèques et extrinsèques des 3 tests sérologiques rapides utilisés en Guadeloupe (référence : résultat positif en PCR à la détection d'*Ehrlichia canis* ou d'*Anaplasma platys*)

Légende : NC : non calculable

	sensibilité	spécificité	VPP	VPN
WITNESS	90%	6%	35%	50%
SNAP 3Dx	86%	25%	50%	67%
SPEED	100%	NC	50%	NC

▫ Si on choisit comme référence un résultat positif en PCR spécifique d'*E.canis*, le tableau 29 regroupe les données obtenues pour les 47 chiens testés (les deux coinfections ont été notées entre parenthèse) :

Tableau 29 : Résultats à la détection d'*E. canis* par PCR nichée des 47 chiens testés avec un test sérologique rapide. Les deux coinfections sont notées entre parenthèses.

			- PCR <i>E.canis</i>	+ PCR <i>E.canis</i>
witness 28	-	2	2	0
	+	26	24	2
SNAP 3Dx 15	-	3	3	0
	+	12	7	3 (+2)
speed 4	-	0	0	0
	+	4	2	2

Les valeurs intrinsèques et extrinsèques obtenues pour le 3 tests rapides sont présentées dans le tableau 30 : (les 2 coinfections ont été notées entre parenthèse).

Tableau 30 : Valeurs intrinsèques et extrinsèques des 3 tests sérologiques rapides utilisés en Guadeloupe (référence : résultat positif en PCR spécifique d'*E.canis*)

Légende : NC : non calculable

	sensibilité	spécificité	VPP	VPN
WITNESS	100%	8%	8%	100%
SNAP 3Dx	86%	25%	50%	67%
SPEED	100%	NC	50%	NC

II.3. Discussion

II.3.1. Sensibilité et spécificité des méthodes de PCR

La PCR nichée spécifique d'*E.canis* a permis de détecter 3 échantillons de plus par rapport à la PCR simple EHR16SR/EHR16SD. La PCR nichée spécifique d'*A.platys* a permis de détecter 1 échantillon de plus. Ces résultats montrent une sensibilité plus élevée de ce type de PCR par rapport à une PCR simple.

Wen et coll. ont démontré que la PCR nichée spécifique d'*E.canis* permettait de détecter une quantité minimale de 0.2 pg d'ADN, 4 jours au minimum après une infection expérimentale c'est-à-dire avant ou en même temps que la séroconversion [45]. Cependant, la sensibilité de la PCR nichée décroît lorsqu'il s'agit du stade chronique de la maladie, ceci étant dû à la faible représentation de la bactérie dans le sang périphérique [1].

La littérature décrit la réalisation d'une PCR nichée appelée 8f/1448R, PLATYS/EHR16SR sur de l'ADN d'*A.platys* dilué à plusieurs titres. Cette PCR nichée montre une sensibilité au moins deux fois supérieure à celle d'une PCR simple appelée PLATYS/EHR16SR [26]. Nos résultats sont en accord avec ces constatations.

Les deux PCR nichées que nous avons employées sont d'une grande spécificité : la PCR nichée permettant la détection d'*E.canis* n'a amplifié qu'un seul fragment de 478 pb pendant la première phase puis, à partir de cet unique amplicon, un seul fragment de 389 pb, pendant la seconde phase. Ces résultats correspondent avec ceux décrits dans la littérature [45]. Les produits d'amplification de la PCR spécifique d'*E. canis* ont été envoyés à séquencer afin de connaître les souches d'*E. canis* circulant en Guadeloupe. Ces produits d'amplification concernent des zones polymorphes du gène de l'ARN ribosomal 16S.

La PCR nichée permettant la détection d'*Anaplasma platys* a permis d'amplifier un produit unique d'environ 750 pb. Notons que, dans la littérature, la taille du produit de PCR attendu est de 678 pb [26]. Il serait intéressant de connaître la souche d'*A.platys* circulant en Guadeloupe. Pour cela il conviendrait de séquencer le produit de PCR de 750 pb.

II.3.2. Perspectives de diagnostic

A terme, cette étude a permis d'adapter des techniques de PCR utilisables « en routine » sur l'île : les trois types de PCR utilisées seront proposées aux vétérinaires praticiens.

Ceux-ci pourront choisir un dépistage précis avec la réalisation des deux PCR nichées, techniques les plus sensibles, permettant ainsi une caractérisation précise de l'espèce d'*Ehrlichia* en cause.

Ils pourront aussi choisir de réaliser une analyse en PCR simple EHR16SR/EHR16SD et ainsi détecter la présence d'*Ehrlichia spp.*, sachant que dans nos tests cette méthode a une valeur prédictive négative de 93% et une valeur prédictive positive de 100% (la méthode de référence utilisée pour le calcul est la PCR nichée).

Il est également envisageable de réaliser les trois types de PCR, l'existence d'autres espèces d'*Ehrlichia* restant possible et ne pouvant dans ce cas être détecté avec les PCR spécifiques d'*E. canis* et d'*A. platys*. Par exemple, *Ehrlichia ewingii* est une espèce d'*Ehrlichia* transmise par *Rhipicephalus sanguineus* et infectant le Chien qui pourrait théoriquement se trouver en Guadeloupe.

Une autre technique de biologie moléculaire pourrait être envisagée pour la détection des *Ehrlichia* : la Reverse Line Blot hybridization (RLB). Cette technique est fondée sur l'utilisation de sondes nucléotidiques spécifiques de genre ou d'espèce bactériens [26] et permet de tester simultanément la présence de plusieurs espèces bactériennes. Elle pourrait être utilisée lors de coinfections. Cependant, la RLB est plus longue et plus coûteuse que la PCR nichée [26] et de moindre sensibilité qu'une PCR, même simple [23]. En dehors d'une utilisation pour la détection des coinfections, son application semble limitée dans notre cas.

II.3.3. Répartition des cas positifs en Guadeloupe

Ehrlichia canis et *Anaplasma platys* sont les deux espèces d'*Ehrlichia* circulant en Guadeloupe continentale. Ces deux espèces sont d'égale importance quantitative.

Comme le montrent les figures 18 et 19, la majorité des cas d'ehrlichiose de notre étude venait du centre de la Guadeloupe et du Sud de la Grande Terre. L'ehrlichiose canine semblerait donc sévère de façon plus épisodique en Basse Terre et au Nord de la Grande Terre.

Cependant, ces résultats sont à interpréter avec précaution. En effet, la différence de degré de participation est à prendre en compte : la clinique de Moudong par exemple a fourni 10 prélèvements en 3 mois (ce qui correspond aux chiffres de 1 à 2 suspicions par semaine annoncés

lors de l'enquête épidémiologique préalable), la clinique des Abymes en a fourni 3 (pour 2 suspicions par jour annoncées lors de cette même enquête).

De plus, la majorité des cliniques de l'île sont concentrées au centre de la Guadeloupe, dans le secteur de Jarry et de Baie-Mahault, où une plus grande médicalisation des animaux habitant dans ce secteur est généralement observée. Ceci explique certainement le nombre de cas suspects plus important observé au centre de la Guadeloupe.

Les résultats obtenus dans cette étude sont donc avant tout qualitatifs.

Par ailleurs, cette étude a inclus uniquement des chiens médicalisés (c'est-à-dire rencontrés par le vétérinaire dans sa clinique) et suspects cliniques d'ehrlichiose. Or beaucoup de chiens ne sont pas ou peu médicalisés en Guadeloupe. Une étude sérologique incluant des chiens cliniquement sains médicalisés et des chiens errants pourrait être intéressante afin d'objectiver la prévalence réelle de la maladie sur l'île, comme cela a déjà été réalisé dans d'autres départements [14, 25].

II.3.4. Analyse des commémoratifs

II.3.4.1. Données épidémiologiques

- Analyse des données épidémiologiques des 26 animaux positifs en PCR :
 - o La littérature rapporte le Berger allemand comme étant une race prédisposée à l'ehrlichiose canine [43]. La maladie aurait une expression clinique plus sévère, due à une dépression de l'immunité à médiation cellulaire. Le pronostic serait donc plus mauvais dans cette race.
Dans notre étude, le nombre de suspicions chez les Bergers allemands est resté faible et en tous cas n'a pas été plus élevé que dans les autres races. Ce résultat est à pondérer par le fait que chaque race était représentée en faible effectif.
 - o Les données concernant le lieu de vie de 28 chiens ont été obtenues. Le degré de contact avec la campagne environnante n'a pas pu être évalué de manière fiable par notre questionnaire : aucune analyse concernant le degré de contact avec la campagne et la présence de tiques n'a pu être faite. Ceci met en évidence une possibilité d'amélioration du questionnaire ; on pourrait imaginer par exemple une question sous la forme d'une note allant de 1 à 10 où le propriétaire évaluerait lui-même le degré de contact de son animal avec l'extérieur.

- o Rappelons que la différence obtenue entre la proportion de positifs chez les chiens infestés de tiques et la proportion de positifs chez les chiens ne présentant pas de tiques n'est pas significative. Rappelons également que parmi les chiens n'ayant pas présenté de tiques, 82% étaient négatifs en PCR. Ainsi, bien que la présence de tiques ne soit pas un facteur déterminant, l'absence de tiques semble être un facteur discriminant.

II.3.4.2. Données cliniques

- Examen clinique :

Nous avons retrouvé chez les animaux positifs en PCR les symptômes habituels, peu spécifiques de l'ehrlichiose : hyperthermie, abattement, dysorexie, muqueuses pâles, troubles de l'hémostase.

Bien que le pourcentage d'animaux présentant certains signes cliniques (dysorexie, troubles oculaires et pâleurs des muqueuses) ait été supérieur chez les animaux positifs, nous n'avons pas constaté de différence significative entre les signes cliniques observés chez les animaux positifs en PCR et ceux observés chez les animaux négatifs en PCR. Un nombre plus important de cas pourrait peut-être permettre d'observer certaines différences.

Les troubles de l'hémostase n'ont été ici rencontrés que dans 31% des cas. La littérature décrit des chiffres allant jusqu'à 50% [3]. Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux cas d'épistaxis, seuls 3 des 26 chiens positifs ont présenté ce signe clinique, soit 11%. La littérature décrit ce symptôme comme étant rencontré dans 27 à 31% des cas [3, 27], en phase terminale de la maladie. Les troubles de l'hémostase concomitant d'une ehrlichiose sembleraient donc moins fréquents en Guadeloupe.

Notre étude a montré que la particularité de la Guadeloupe réside dans le fait qu'*A.platys* semble responsable de près de la moitié des cas d'ehrlichiose de l'île. Or cet agent est décrit comme peu pathogène [27] et peu d'études sur l'expression clinique de l'ehrlichiose à *A.platys* ont été réalisées. La souche circulant en Guadeloupe semble donc être d'une plus grande virulence. Une souche plus virulente d'*A. platys* a déjà été suspectée en France Métropolitaine, en Grèce et en Israël [4, 5, 15, 22, 27].

Les effectifs ont été trop faibles pour pouvoir conclure à une différence significative entre l'expression clinique de l'ehrlichiose monocyttaire canine due à *E.canis* et de la thrombopénie cyclique infectieuse due à *A.platys*.

Notons également qu'après examen approfondi des cas cliniques, il apparaît que les douleurs articulaires ou l'adénomégalie mentionnées dans certains comptes-rendus n'étaient pas à mettre en relation avec l'ehrlichiose (cas de dysplasie ancienne par exemple). Nous ne pouvons donc pas tirer de conclusion par rapport à ces signes cliniques. La splénomégalie est un élément clinique rapporté dans la littérature [3, 27]. Cependant, elle est difficilement évaluable, ce qui explique que nous n'ayons, dans notre étude, que peu de cas où elle ait été mentionnée.

II.3.4.3. Examens complémentaires

II.3.4.3.1. Hématologie

Du fait du faible effectif de chiens ayant eu une numération et formule sanguine, il est difficile de conclure face à ces données. Nous avons retrouvé les modifications de la formule sanguine décrites dans la littérature: anémie régénérative ou arégénérative, thrombopénie et leucocytose. [3, 14, 25, 27].

Les chiens inclus dans notre étude ont tous été suspects cliniques d'ehrlichiose et ont un profil clinique analogue. Or les signes cliniques sont, comme nous l'avons vu, peu spécifiques. Une étude sur la significativité des examens complémentaires incluant un plus grand effectif de chiens serait intéressante. Ceci permettrait, en comparant les résultats en PCR d'un lot de chiens sans modifications hématologiques à un lot de chiens ayant un paramètre hématologique modifié, de dégager plus précisément le profil d'un chien atteint d'ehrlichiose en Guadeloupe.

La thrombopénie touchait 70% des chiens positifs. Un chien suspect clinique et thrombopénique avait 50% de chance d'être positif en PCR alors qu'un chien suspect clinique présentant une numération plaquettaire normale avait 23% de chance d'être atteint d'ehrlichiose. Ce critère pourrait donc être un signe d'appel intéressant de l'ehrlichiose canine en Guadeloupe.

Rappelons que parmi les chiens présentant une anémie, il y avait autant de chiens négatifs que de chiens positifs en PCR et que sur 11 chiens atteints d'ehrlichiose 6 présentaient une anémie, soit 55%. L'anémie ne semble pas être un critère spécifique de l'ehrlichiose en Guadeloupe.

De même, nous n'avons pas constaté de différence significative entre la proportion de chiens négatifs ayant présenté une leucocytose et la proportion de chiens positifs ayant présenté une leucocytose. Ce critère ne semble pas spécifique de l'ehrlichiose canine. 27% des chiens positifs présentaient une leucocytose, alors que la littérature mentionne peu ce critère [3,10] et les chiffres publiés sont de l'ordre de 18 à 20% [25, 27].

Notons que parmi les 11 chiens positifs en PCR, les 3 animaux présentant une leucocytose par granulocytose étaient tous les 3 porteurs d'*A.platys*. Or, la modification de la formule leucocytaire des chiens atteints de thrombopénie cyclique infectieuse décrite dans la littérature [27] est une légère leucopénie. Ce résultat va également dans le sens d'une pathogénicité plus grande de la souche présente en Guadeloupe.

II.3.4.3.2. Biochimie

Peu de résultats biochimiques chiffrés ont été obtenus. Seules les données de quelques chiens positifs ont pu être analysées.

Les cas d'insuffisance rénale transitoire et d'insuffisance hépatique rencontrés dans notre étude ont aussi été décrits dans la littérature [3, 27, 33].

Une étude plus approfondie des paramètres biochimiques des chiens de Guadeloupe atteints d'ehrlichiose reste à effectuer, de façon à pouvoir déterminer si certains paramètres se modifient de façon systématique. La mise en évidence de paramètres modifiés précocément permettrait aussi de les utiliser comme critères diagnostics supplémentaires.

II.3.4.3.3. Tests sérologiques rapides

Les tests sérologiques rapides ont été évalués par leur fabricant respectif en les comparant à la méthode de référence pour le diagnostic sérologique de l'ehrlichiose monocyttaire canine: l'immuno-fluorescence indirecte (IFI). Les résultats non concordants ont été testés par Western Blot, test reconnu très spécifique et très sensible, afin de confirmer les résultats de l'IFI. En 2004, Martin et coll. ont comparé les résultats obtenus avec le Speed®EHRLI, le WITNESS®Ehrlichia et le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli aux résultats obtenus par l'IFI. De même, les sérums non-concordants ont ensuite été testés par Western Blot [27]. Les deux premiers tests sont utilisés en Guadeloupe alors que c'est le SNAP 3Dx qui a remplacé le SNAP®COMBO. Nous n'avons donc pu exploiter que les résultats obtenus pour le Speed®EHRLI et pour le WITNESS®Ehrlichia.

Le tableau 31 regroupe les principales caractéristiques des trois tests sérologiques rapides (Les données notées en italique sont issues de [27], les données soulignées proviennent des fiches produits diffusées par le laboratoire fabricant.).

Tableau 31: Principales caractéristiques des tests sérologiques rapides utilisés par les vétérinaires praticiens en Guadeloupe. Les données notées en italique sont issues de [27], les données soulignées proviennent des fiches-produits diffusées par le laboratoire fabricant, jointes dans les annexes 1 à 3.

	Antigène	Réactions croisées décrites	sensibilité	spécificité	VPP	VPN	tests de comparaison
WITNESS	<i>E.canis</i>	<i>E.ewingii/E. risticii</i>	73,0%	98,3%	96,4%	85,5%	<i>IFA/Western blot</i>
SNAP 3Dx	<i>E.canis</i> str Jake		<u>99,0%</u>	<u>100,0%</u>	=	=	<u>IFA/Western blot</u>
SPEED Ehrli	<i>E.canis</i>		86,5%	95,0%	91,4%	91,9%	<i>IFA/Western blot</i>
			<u>79,2%</u>	<u>95,3%</u>	<u>93,3%</u>	<u>84,7%</u>	<u>IFA/Western blot (2000)</u>

Ainsi, le tableau 31 montre que le SNAP 3Dx semble avoir une meilleure sensibilité et une spécificité comparable aux deux autres tests.

Dans notre étude,

- Les résultats obtenus avec le Speed®Ehrli sont à pondérer du fait du faible nombre de chiens testés avec ce kit dans notre étude.
- Sept chiens atteints d'ehrlichiose à *Anaplasma platys* ont été testés positifs avec le Witness®Ehrlichia, et 1 chien avec le Snap 3Dx. Ces résultats mettent en évidence des réactions sérologiques croisées entre *E.canis* et *A.platys*. Ces réactions sont peu décrites dans la littérature [13, 26, 27, 43].
- Les valeurs des sensibilités obtenues dans notre étude sont apparemment similaires à celles publiées par les laboratoires pharmaceutiques. Ce résultat est à pondérer par le fait que l'effectif ayant servi à calculer ces valeurs est faible pour chacun des tests.
- Les valeurs des spécificités (6 à 25%) et des VPP (8 à 50%) que nous avons obtenues sont très faibles et très différentes de celles publiées par les laboratoires, que l'on prenne une PCR positive à *E.canis* ou *A.platys* ou une PCR positive à *E.canis* comme référence.

Ces différences sont à mettre en relation avec le fait que les tests sérologiques détectent les anticorps alors que la PCR détecte la bactérie en circulation dans le sang périphérique. Les chiens peuvent avoir subi une infection ancienne : le taux d'anticorps sériques reste élevé 15 à 31 mois

après l'infection [43]. Cependant, peu d'antécédents d'ehrlichiose ont été mentionnés dans les commémoratifs des chiens inclus dans notre étude. La maladie, de par ses signes cliniques peu spécifiques et parfois frustrés, a pu passer inaperçue aux yeux du propriétaire. Les symptômes alors présentés par l'animal lors de la consultation n'ont plus de rapport avec l'ehrlichiose, bien que le test sérologique soit positif.

L'existence de porteurs sains, c'est-à-dire d'animaux en phase sub-clinique de la maladie peut également expliquer la faible spécificité des tests sérologiques dans notre étude: les bactéries sont alors séquestrées dans la rate et non détectables par PCR réalisée sur du sang périphérique, alors que le taux sérique d'anticorps reste élevé. De plus, dans les zones endémiques d'ehrlichiose, les chiens peuvent atteindre des taux sériques d'anticorps importants sans manifester de signes cliniques et ainsi donner des résultats faussement positifs aux tests sérologiques [8].

Nous avons bien entendu vérifié que la négativité en PCR n'était pas liée à un traitement: tous les animaux ont été prélevés avant la mise en place de celui-ci.

Un problème de conservation pourrait aussi expliquer un résultat négatif en PCR : retard de congélation ou succession de congélation et de décongélation due à un problème de panne de courant. Dans notre étude, les prélèvements ont été correctement conservés à la clinique vétérinaire et acheminés au laboratoire.

Cette étude met donc en évidence l'existence de deux espèces bactériennes responsables de l'ehrlichiose canine en Guadeloupe et d'égale importance quantitative: *Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys*. Les signes cliniques des animaux de notre étude atteints d'ehrlichiose sont peu spécifiques. Les tests sérologiques disponibles dans le commerce seraient peu adaptés en Guadeloupe, l'île étant probablement une zone d'endémie. De plus, ces tests détectent spécifiquement les anticorps anti-*Ehrlichia canis*, alors qu'*Anaplasma platys* est responsable de la moitié des cas d'ehrlichiose de l'île, avec des symptômes analogues.

Conclusion

L'ehrlichiose monocyttaire canine à *E.canis* est aujourd'hui l'ehrlichiose canine la mieux connue et la plus répandue, notamment dans notre pays. Son diagnostic précoce est essentiel compte-tenu de la gravité potentielle des formes chroniques.

Notre étude a permis de mettre en évidence l'existence de deux espèces bactériennes circulant en Guadeloupe responsables de l'ehrlichiose canine : *Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys*. Les signes cliniques observés chez les chiens atteints de la maladie sont ceux peu spécifiques de l'ehrlichiose canine. Les tests sérologiques rapides disponibles dans le commerce semblent peu adaptés à la situation de la Guadeloupe, probable zone d'endémie. Dans notre étude, les PCR nichées spécifiques d'*E.canis* et d'*A.platys* ont permis de détecter un nombre supérieur d'échantillons par rapport à la PCR simple EHR16SR/EHR16SD. Nos résultats ont donc montré une sensibilité plus élevée de la PCR nichée par rapport à la PCR simple. Les deux PCR nichées que nous avons employées ont également montré une grande spécificité.

Grâce à notre étude, les trois types de PCR (simple, nichée spécifique d'*E. canis* et nichée spécifique d'*A. platys*) sont maintenant à la disposition des vétérinaires praticiens de Guadeloupe. Cette avancée, en termes de diagnostic moléculaire, devrait permettre d'améliorer considérablement la qualité du dépistage des ehrlichioses canines sur l'île.

Ainsi, les méthodes de diagnostic direct, comme la PCR, devraient prendre de l'importance pour le diagnostic de la maladie, comme cela est déjà le cas pour nombre de maladies infectieuses ou parasitaires.

Bibliographie

1. AGUIRRE E., SAINZ A., DUNNER S., AMUSATEGUI I., LOPEZ L., RODRIGUEZ-FRANCO F. *et al.*, First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain, *Vet. Parasitol.*, 2004, **125**, 365-372.
2. ARRAGA-ALVARADO C., PALMAR M., PARRA O., SALAS P., *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maraicabo Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections, *Vet. Pathol.*, 2003, **40**, 149-156.
3. BAROCHE N.M., *Ehrlichiose canine: revue des connaissances actuelles*, Thèse Méd. Vét. Toulouse, 1996, n°96, 101p.
4. BEAUFILS J.P., INOKUMA H., MARTIN-GRANEL J., JUMELLE Ph., BARBAULT-JUMELLE M., BROUQUI P., *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France : description of the case, and characterization of the agent, *Revue Méd. Vét.*, 2002, **153**, 85-90.
5. BEAUFILS J.P., MARTIN-GRANEL J., JUMELLE P., Diagnostic cytogique des ehrlichioses canines, *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1995, **30**, 189-195.
6. BREITSCHWERDT E.B., ABRAMS-OGG A.C.G., LAPPIN M.R., BIENZLE D., HANCOCK S.I., COWAN S.M., *et al.*, Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats, *J. Vet. Intern. Med.*, 2002, **16**, 642-649.
7. BROWN G.K., MARTIN A.R., ROBERTS T.K., AIKTEN R.J., Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia, *Aust. Vet. J.*, 2001, **79**, 554-558.
8. BULLA C., KIOMI TAKAHIRA R., PESSAO ARAUJO Jr. J., TRINCA L.A., SOUZA LOPES R. *et al.*, The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area, *Vet. Res.*, 2004, **35**, 141-146.
9. CHEN S.M., DUMLER J.S., BAKKEN J.S., WALKER D.H., Identification of a Granulocytic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease, *J. of Clin. Microbiol.*, 1994, **32**, 589-595.
10. DAVOUST B., KEUNDJIAN A., ROUS V., MAURIZI L., PARZY D., Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline, *Vet. Microbiol.*, 2005, **107**, 279-283.
11. DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P.J., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C. *et al.*, Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and

Ehrlichia with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*, *Int. J. of Systematic And Evolutionary Microbiol.*, 2001, **51**, 2145-2165.

12. EWING S.A., DAWSON J.E., KOCAN A.A, BARKER R.W., WARNER C.K., PANCIERA R.J. *et al.*, Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari : Ixodidae), *J. Med. Entomol.*, 1995, **32**, 368-374.

13. FRENCH T.W., HARVEY J.W., Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test, *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44**, 2407-2411.

14. GOUVERNAYRE F.A., *Enquête séro-épidémiologique concernant l'ehrlichiose canine à Ehrlichia canis dans le département de l'Isère*, Thèse Méd. Vét. Lyon, 1998, n°76, 135p.

15. HARRUS S., AROCH I., LAVY E., BARK H., Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia, *Vet. Rec.I*, 1997, **141**, 247-250.

16. HARRUS, S., KASS, P., H., KLEMENT, E., WANER, T., Canine monocytic ehrlichiosis: A retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet.Rec*, 1997. **141**, 360-363.

17. HARRUS S., KENNY M., MIARA L., AIZENBERG I., WANER T., SHAW S., Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 4488-4490.

18. HARRUS, S., WANER, T., ELDOR, A., ZWANG, E., BARK, H., Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet.Rec*, 1996. September 21, 290-293.

19. INOKUMA H., PAROLA P., RAOULT D., BROUQUI P. Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamaguchi Prefecture in Japan, *Vet. Parasitol.*, 2001, **99**, 335-339.

20. INOKUMA H., RAOULT D., BROUQUI P., Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan, *J. of Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 4219-4221.

21. JENKINS A., KRISTIANSEN B.E., ALLUM A.G., AAKRE R.K., STRAND L., KLEVELAND E.J. *et al.*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* ticks from Southern Norway, *J. of Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 3666-3671.

22. KONTOS V.I., PAPADOPOULOS O., FRENCH T.W., Natural and experimental canine infections with a greek strain of *Ehrlichia platys*, *Vet. Clin. Path.*, 1991, **20**, 101-105.

23. KRIEGER N., *Intérêt des outils moléculaires dans le diagnostic des maladies tropicales transmises par les tiques*, Thèse Méd. Vét. Lyon, 1999, n°34, 156p.
24. KUEHN, N., F., GAUNT, S., D., Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *J.Am.Vet.Med.Assoc*, 1985. **186**(4), 355-358.
25. LANDRU J., *Ehrlichiose canine : enquête sérologique à l'île de la Réunion*, Thèse Méd. Vét. Lyon, 2003, n°71, 87p.
26. MARTIN A.R., BROWN G.K., DUNSTAN R.H., ROBERTS T.K., *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs, *Exp. Parasitol.*, 2005, **109**, 176-180.
27. MARTIN C., *Les ehrlichioses du chien : étude bibliographique, diagnostic et comparaison de trois kits de diagnostic sérologique rapide de l'ehrlichiose monocyttaire*, Thèse Méd. Vét. Lyon, 2004, n°59, 180p.
28. MASON R.J., LEE J.M., CURRAN J.M., MOSS A., VAN DER HEIDE B., DANIELS P.W., Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from the major population centres of northern Australia, *Aust. Vet. J.*, 2001, **79**, 559-562.
29. MASSUNG R.F., SLATER K.G., Comparison of PCR assays for detection of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*, *J. of Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 717-722.
30. NDIP L.M., NDIP R.N., ESEMU S.N., DICKMU V.L., FOKAN E.B., WALKER D.H. *et al.*, Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*, *Vet. Parasitol.*, 2005, **111**, 59-66
31. PAROLA P., CORNET J.P., SANOGO Y.O., MILLER R.S., THIENH V., GONZALES J.P. *et al*, Detection of *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Rickettsia spp.*, and other eubacteria in ticks from the Tahi-Myanmar Border in Vietnam, *J. of Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 1600-1608.
32. POITOUT F.M., SHINOZAKI J.K., STOCKWELL P.J., HOLLAND C.J., SHUKLA S.K., Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting Dogs in Western Washington State, *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 796-801.
33. ROY X.D.H., *Contribution à l'étude de l'ehrlichiose canine, de la cowdriose, et de maladies transmissibles par les tiques du chien en Guadeloupe*, Thèse Méd. Vét. Toulouse, 1987, n°46, 83p.
34. SARIH M.H., M'GHIRBI Y., BOUATTOUT A., GERN L., BARANTON G., POSTIC D., Detection and identification of *Ehrlichia spp.* in ticks collected in Tunisia and Morocco, *J. of Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 1127-1132.

35. SCHOULS L.M., VAN DE POL I., RIJPKEMA S.G.T., SCHOT C.S., Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in dutch *Ixodes ricinus* ticks, *J. of Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 2215-2222.
36. SHIBATA S.I., KAWAHARA M., RIKIHISA Y., FUJITA H., WATANABE Y., SUTO C. *et al.*, New *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan, *J. of Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 1331-1338.
37. STICH R.W., RIKIHISA Y., EWING S.A., NEEDHAM G.R., GROVER D.L., JITTA PALAPONG S., Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with p-30 based PCR assay, *J. of Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 540-546.
38. SUKSAWAT J., PITULLE C., ARRAGA-ALVARADO C., MADRIGAL K., HANCOCK S.I., BREITSCHWERDT E.B., Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DAN secondary structure, *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 90-93
39. TROY, G., C., VULGAMOTT, J., C., TURNWALD, G., H., Canine ehrlichiosis : A retrospective study of 30 naturally occurring cases. *J.Am.Anim.Hosp.Assoc.*, 1980. **16**, 181-187.
40. UNVER A., PEREZ M., ORELLANA N., HUANG H., RIKIHISA Y., Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela, *J. of Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 2788-2793.
41. WADDLE, J.R., LITTMAN, M.P., A retrospective study of 27 cases of natural occurring canine ehrlichiosis. *J.Am.Anim.Hosp.Assoc.*, 1988. **24**, 615-620.
42. WANER, T., HARRUS, S., WEISS, D., J., BARK, H., KEYSARY, A., Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet.Immun.and Immunopath.*, 1995. **48**, 177-182.
43. WANER T., HARMUS S., JONGEJAN F., BARK H., KEYSARY A., CORNELISSEN A.W.C.A, Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*, *Vet. Parasitol.*, 2001, **95**, 1-15.
44. WEISBURG W.G., BARNS S.M., PELLETIER D.A., LANE D.J., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J.of bacteriol.*, 1991, **173**, 697-703.
45. WEN B., RIKIHISA Y., MOTT J.M., GREENER R., KIM H.Y., ZHIN N. *et al.*, Comparison of Nested PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline, *J. of Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 1852-1855.

Annexes

<u>Annexe 1</u> : Fiche produit du Speed®Ehrli – laboratoire BVT.....	131
<u>Annexe 2</u> : Fiche produit du Witness®Ehrlichia – laboratoire Synbiotics.....	132
<u>Annexe 3</u> : Fiche produit du SNAP 3Dx – laboratoire Idexx.....	133
<u>Annexe 4</u> : Questionnaire proposé aux vétérinaires de Guadeloupe en vue d’une enquête épidémiologique concernant l’Ehrlichiose canine.....	134
<u>Annexe 5</u> : Protocole d’extraction d’ADN de sang sur ABI PRISM 6100.....	135
<u>Annexe 6</u> : Protocole de la PCR EHR16SR/EHR16SD.....	141
<u>Annexe 7</u> : Protocole de la PCR nichée permettant la détection spécifique d’ <i>E.canis</i>	144
<u>Annexe 8</u> : Protocole de la PCR nichée permettant la détection spécifique d’ <i>A.platys</i>	149

Annexe 1 : Fiche produit du Speed®Ehrli – laboratoire BVT

Principe

Le Speed®EHRLI est un test qualitatif basé sur le principe de l'immuno-chromatographie (ou immuno-migration sur membrane). L'échantillon (sang total, sérum ou plasma) est déposé dans un puits sur du papier absorbant contenant un conjugué, sous forme d'anticorps anti-Ig de chien fixés à des particules colorées. Après l'ajout d'un réactif, les complexes conjugués-anticorps migrent sur la membrane, et, en présence d'Ac spécifiques, produisent une bande rose au niveau de l'antigène d'*Ehrlichia canis*.

Le mélange continue à migrer sur le support et atteint alors une zone de contrôle à l'extrémité de la fenêtre, où les particules colorées forment une bande de contrôle rose, témoin positif qui confirme la validité et la bonne réalisation du test.

Mode d'emploi

Placer la cellule-test sur une surface plane et horizontale.

Déposer une goutte de l'échantillon prélevé avec la pipette dans le puits circulaire (ou deux gouttes de sang frais).

Ajouter ensuite 5 gouttes de réactif dans le puits, et la migration débute. Si celle-ci ne démarre pas, rajouter 2 gouttes de réactif supplémentaires.

Le temps de réaction est de 20 minutes.

Vérifier l'apparition de la bande de contrôle positif à l'extrémité droite de la plage de migration ; l'absence de cette bande rend le test invalide.

La bande sur la gauche est la bande de positivité (antigène spécifique d'*Ehrlichia canis*). Un test peut être considéré comme positif dès l'instant où la bande rose apparaît. Si l'intensité de la bande est très faible, le résultat doit être considéré comme douteux et la probabilité d'ehrlichiose ne peut être écartée. Le laboratoire préconise de tester à nouveau après 10 à 15 jours.

Comme tout résultat biologique, il doit, bien entendu, être corrélé au tableau clinique, au contexte épidémiologique et aux autres résultats d'analyse.

L'apparition d'un fond rosé sur la fenêtre de migration ne modifie en rien la validité du test. Par contre, l'utilisation de sérums hémolysés ou d'échantillon de sang total mal conservés peut conduire à une lecture plus délicate du test. Il est préférable dans ce cas de renouveler le prélèvement.

Présentation

Les cellules-test sont conditionnées sous emballage unitaire, en kits de six unités, et sont munies de pipettes à usage unique permettant l'adjonction de l'échantillon (40 µL), d'un flacon compte-goutte de réactif et d'une notice.

Recommandations

Les tests sont valables 18 mois à température ambiante à partir de la date de fabrication. Une date de péremption est indiquée sur chaque kit.

Les échantillons doivent être utilisés frais dans la journée ou doivent être conservés 7 jours au maximum au réfrigérateur pour sérum et plasma et 3 jours pour le sang total frais sur anticoagulant.

Le sérum et le plasma peuvent être également conservés à -20°C.

Déposer les kits sur une surface plane et utiliser une pipette neuve à chaque prélèvement.

Annexe 2 : Fiche produit du Witness®Ehrlichia – laboratoire Synbiotics

Principe

Ce test est basé sur une technique d'immunomigration rapide (R.I.M.®). Le conjugué est constitué de particules d'or colloïdal sensibilisées avec la protéine A de *Staphylococcus aureus* fixées sur une membrane de nitrocellulose au fond du puits. Après l'ajout de l'échantillon à tester puis du tampon, ces particules migrent par capillarité sur la bande de papier et peuvent former des complexes colorés au niveau des bandes réactives (bande de positivité et témoin positif).

Mode d'emploi

Déposer une goutte d'échantillon (sang total sur anticoagulant, plasma ou sérum) dans le puits, suivie de trois gouttes de solution tampon.

Le temps de migration est de 10 minutes environ.

La bande de droite correspond au témoin positif et la bande de gauche à la bande de positivité (antigène spécifique d'*E.canis*). Une bande de couleur rose clairement visible sera considérée comme positive.

Présentation

Les tests sont livrés en coffrets comprenant 5 plaquettes, 5 pipettes permettant de prélever les 40 µL d'échantillon et un flacon compte-gouttes de solution tampon (3mL).

Recommandations particulières

Les coffrets doivent être conservés entre +2°C et +25°C et utilisés rapidement après ouverture.

Le test doit être réalisé sur une surface plane.

Annexe 3 : fiche produit du SNAP3Dx – laboratoire Idexx

Le Kit de test SNAP Ag filaire des chiens/Ac *Borrelia burgdorferi*/Ac *Ehrlichia canis* est un immunodosage enzymatique permettant la détection simultanée de l'antigène de *Dirofilaria immitis*, de l'anticorps de *Borrelia burgdorferi* et de l'anticorps de *Ehrlichia canis* dans le sang total, le sérum ou le plasma canin.

Répondue dans le monde entier, la filaire des chiens est provoquée par le nématode filarien de *D. immitis*. L'insecte porteur de *D. immitis* est le moustique.

L'ehrlichiose canine est une maladie du chien transmise par la tique et provoquée par le parasite à rickettsies *E. canis*. Le diagnostic de l'ehrlichiose canine s'effectue à partir de l'observation de signes cliniques types et le titrage d'anticorps significatifs de *E. canis*.¹ Un résultat positif au test SNAP d'anticorps *E. canis* indique un titre d'anticorps significatifs de *E. canis*.

La détection de l'antigène de la filaire des chiens se fait par le diagnostic d'une infection par *D. immitis*.² L'agent responsable de la maladie de Lyme a été identifié comme étant le spirochète transmis par la morsure de tique, *Borrelia burgdorferi*.³ Il est possible d'évaluer l'exposition à *B. burgdorferi* par dosage des anticorps canins spécifiques à *B. burgdorferi*. Le test SNAP d'anticorps de la maladie de Lyme a été conçu pour détecter l'exposition à *B. burgdorferi*. Lors d'une étude contrôlée, le test n'a présenté aucune réaction au sérum de chiens vaccinés contre la maladie de Lyme. Des chiens exempts d'organismes pathogènes spécifiques ont reçu des doses multiples de deux vaccins antibactériens à cellules totales (Lyme Vax[®] [Fort Dodge Laboratories] et Galaxy Lyme [Schering-Plough Animal Health]) et un vaccin recombinant (Recombitek[™] Lyme [MERIAL]). Neuf chiens ont reçu 5 doses de vaccin sur une période de 10 mois et ont développé, suite au vaccin, des titres d'anticorps élevés dans le test d'immunofluorescence (titres de 1:1600 à 1:6400) ainsi que des réactions d'anticorps importantes dans le Western blot. Aucun des sérums de ces chiens n'a réagi au test SNAP Ac Lyme sur la totalité de l'étude. La plupart des chiens vaccinés contre la maladie de Lyme seront non réactifs à ce test. Mais, dans une étude de 82 échantillons de chiens vaccinés, le "Western blot" a démontré que 3 (3.6%) de ces chiens étaient réactifs.

Composants du kit

	5 Test	15 Test	30 Test
• 1 Flacon de conjugué Anti-HTWM/ <i>B. burgdorferi</i> / <i>E. canis</i> HRPO	8.0 mL	8.0 mL	8.0 mL
• Dispositifs de test	5	15	30
Réactifs présents dans chaque dispositif :			
• Solution de lavage	0.4 mL	0.4 mL	0.4 mL
• Solution de substrat	0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL

Autres composants

- pipettes de transfert
- tubes de prélèvement
- portoir à réactif

Conditions de conservation

- Les dispositifs SNAP et les réactifs de test restent stables jusqu'à la date de péremption s'ils sont conservés entre 2° et 7°C.
- Conservation à température ambiante (facultatif) : les dispositifs SNAP et les réactifs peuvent être conservés à température ambiante entre 15° et 27°C pendant 90 jours ou jusqu'à la date de péremption figurant sur l'emballage si celle-ci survient avant.
- Dès que les dispositifs SNAP ne sont plus conservés à une température de 2° et 7°C pendant plus 24 heures, leur date de péremption est de 90 jours, sauf si la date de péremption figurant sur l'emballage survient avant.
- Si la date de péremption de 90 jours survient avant la date de péremption figurant sur l'emballage, noter cette date sur le kit.
- Tous les composants doivent être parvenus à température ambiante avant d'effectuer le test. Prévoir environ 30 minutes, selon la température de votre laboratoire—**ne pas chauffer**.

Précautions d'emploi et mises en garde

- Utiliser un tube à prélèvement et une pipette de transfert différents pour chaque test.
- Les pastilles bioactives ont été teintées lors du processus de fabrication pour permettre le contrôle de qualité sans que cela interfère avec les résultats du test ni leur interprétation.
- Tous les déchets doivent être adéquatement décontaminés avant la mise au rebut.
- Ne pas utiliser les composants après la date de péremption.
- Ne pas mélanger les composants de kits ayant différents numéros de lot.
- Le dispositif SNAP doit être en position horizontale sur une surface plane pour effectuer le test.
- Ne pas utiliser le dispositif SNAP s'il a été activé avant l'ajout du prélèvement.

Informations concernant les prélèvements

- Les prélèvements doivent être conservés à température ambiante avant d'effectuer la procédure de test.
- Il est possible d'utiliser du sérum ou du plasma frais, congelé ou conservé entre 2° et 7°C pour ce test.
- Le sérum et le plasma peuvent être conservés pendant 7 jours maximum entre 2° et 7°C. Pour une durée de conservation plus longue, congeler l'échantillon (-20°C ou plus).
- Les prélèvements congelés ou moins récents doivent être centrifugés avant l'emploi.
- Les prélèvements hémolysés ou lipémiques n'affectent pas les résultats.
- La présence d'EDTA ou d'héparine dans le plasma n'affecte pas les résultats.
- Il est possible d'utiliser du sang total. Le sang total doit être anticoagulé (ex. EDTA, héparine) et peut **s'utiliser frais ou après réfrigération à 2°-7°C pendant une semaine maximum.**

Annexe 4 : Questionnaire proposé aux vétérinaires de Guadeloupe en vue d'une enquête épidémiologique concernant l'Ehrlichiose canine

1. a. combien de cas suspects rencontrez-vous par an?
- b. nombre de cas confirmés par an :
- c. test utilisé :

2. Existe-t-il une ou des période(s) particulière(s) dans l'année où le nombre de cas augmente?

3. quels sont les éléments cliniques vous faisant suspecter une ehrlichiose canine ?

4. quels examens complémentaires utilisez-vous afin de confirmer cette hypothèse ?

5. quel traitement mettez-vous en place ? (principe(s) actif(s), posologie, nombre de prise quotidienne, durée du traitement)

Annexe 5 : Protocole d'extraction d'ADN de sang sur ABI PRISM 6100

I. Objet et domaine d'application

Ce mode opératoire décrit les étapes à suivre pour l'extraction d'ADN de sang total animal frais ou congelé sur l'ABI prism 6100. Cette étape est obligatoire avant toute amplification par PCR ou quantification de l'ADN. Ce mode opératoire s'adresse à toute personne susceptible d'utiliser cette méthode d'extraction d'ADN de sang (chercheur, technicien, stagiaire), pour l'extraction de 20 ou plus d'échantillons.

II. Principe de la méthode

L'ABI prism 6100 (Applied Biosystems) joue le rôle d'une pompe à vide, aspirant les différents réactifs.

Le processus d'extraction comporte 2 étapes : - digestion du sang à **58°C** en présence de protéinase K et de tampon BloodPrep de digestion PK ; la lyse est complétée par l'ajout de la solution BloodPrep de purification de l'ADN

- lavages-élution : le lysat est ensuite déposé dans un puits contenant une membrane de fibre de verre, lavée plusieurs fois (solution BloodPrep de lavage de l'ADN) ; l'ADN est élué en 2 étapes (tampons d'élution 1 et 2) afin d'assurer un rendement satisfaisant ; le tampon d'élution est à un pH adéquat pour la conservation des ADN.

III. Moyens employés

§1. Le matériel

Le matériel critique est identifié par un astérisque *.

- gants*
- pipetmans* alloués à chaque paillasse
- cônes à filtres* 0.1 à 10 µL, 30 µL, 200 µL et 1000 µL
- plaque 96 puits « genomic DNA purification tray II » et film autocollant (protection puits non utilisés)*
- plaque de protection contre les éclaboussures « splash guards » à usage unique
- portoir
- barrettes de PCR

- tubes eppendorf stériles 1 mL
- balance
- bain-marie bleu de parasitologie
- ABI prism 6100 *
- micro-ondes
- cuve à électrophorèse*
- Chemidoc
- spatule
- parafilm
- éprouvette graduée
- erlenmeyer
- huile de paraffine
- alcool à 70%
- papier absorbant
- feutre fin résistant

§2. Les réactifs

Les réactifs critiques sont identifiés par un astérisque *.

- protéinase K*
- tampon de digestion PK*
- solution BloopPrep de purification de l'ADN *
- solution BloodPrep de lavage de l'ADN *
- solutions BloodPrep a et b d'élution de l'ADN *
- agarose standard pour biologie moléculaire
- bromure d'éthidium* (réf E25-15, Sigma)
- tampon TAE
- poids moléculaire* Lambda EcoRI Hind III (réf GEPMQR08, Eurobio)
- tampon de charge 6x
- H₂O distillée

§3. Processus opératoire

1) Préparation des échantillons – lyse des cellules

Les tubes utilisés pour la préparation des échantillons, sont des tubes eppendorf stériles de 1 mL.

Attention : le volume de sang utilisé est de **50 μ L** au lieu de 150 μ L ; les autres volumes étant maintenus (§« lyse whole blood » le volume total sera donc de 650 μ L et non 750 μ L).

Le sang doit être homogénéisé avant prélèvement. Le sang congelé doit être amené à température ambiante (décongélation sur paillasse) avant le début du protocole.

Les réactifs utilisés doivent préalablement être aliquotés en tubes Falcon.

2) Purification de l'ADN

Avant l'installation de la plaque de purification, mettre une plaque de protection bleue-« splash guard ». Protéger les puits non utilisés de la plaque de purification par un film plastique fourni. La plaque de purification doit être bloquée par les taquets métalliques sur le chariot. Le chariot est d'abord installé en haut de l'appareil, position « déchets » puis en bas de l'appareil en position « collection » lors de l'élution. Lors du passage de l'une à l'autre position, le chariot doit être débloqué et agité légèrement (« touch off ») afin que les gouttes encore accrochées aux puits, tombent.

Il est possible de régler la durée (time) et le pourcentage d'application du vide (vacuum) de l'extracteur.

Suivre ensuite les étapes ci-dessous :

Après l'étape de lyse réalisée en tube eppendorf, les échantillons sont chargés dans la plaque de purification et une première aspiration est réalisée. Ajouter la solution de purification BloodPrep pour compléter la lyse des cellules et faire une seconde aspiration. Suivent 3 lavages avec la solution de lavage BloodPrep pour ôter protéines et contaminants. Une aspiration sans ajout de réactif « pre-elution vacuum » précède le “touch off” (déblocage du chariot et petite agitation), réalisé avant de déplacer le chariot pour le mettre en position de collection. Avant de déplacer le chariot, des barrettes de PCR de 0.2 mL doivent préalablement être installées afin de récupérer l'ADN, selon les positions occupées dans la plaque de purification.

La solution d'élution 1 doit être incubée 180 secondes avant aspiration ; la solution d'élution 2 ajuste au bon pH.

STEP	ACTION	Total DNA Purification of Blood, Tissue Culture Cells, or Buccal Cells Using the 6100 PrepStation				
1	Set up the 6100 PrepStation for blood samples	Set up the DNA purification parameters for the blood sample on the protocol tab of the 6100 PrepStation software:				
		Step	Description	Volume (μL)	Position	Incubation (sec)
						Vacuum (%)
						Time (sec)
		Note: Tape over empty wells of the purification tray with adhesive tape or an adhesive tray cover, or pre-wet all empty wells with 50 μL of BloodPrep DNA Purification Solution to ensure even vacuum. Position the carriage with the purification tray over the 6100 waste station.				
		1	Load Samples ^a	650	Waste	0
						80
						300
		2	Add BloodPrep DNA Purification Solution ^a	650	Waste	0
						80
						400
		3	Add BloodPrep DNA Wash Solution	650	Waste	0
						80
						60
		4	Add BloodPrep DNA Wash Solution	600	Waste	0
						80
						60
		5	Add BloodPrep DNA Wash Solution	300	Waste	0
						80
						60
		6	Pre-Elution Vacuum	–	Waste	0
						100
						120
		7	Touch Off	–	Waste	–
						–
		8	BloodPrep DNA Elution Solution 1 ^b	100	Collection	180
						60
						120
		9	BloodPrep DNA Elution Solution 2 ^c	100	Collection	0
						60
						120
		10	Touch Off	–	Collection	–
						–
		a. If the well evacuates slowly, increase the vacuum setting to 100% and repeat the step.				
		b. Elution volume is between 75 μL and 200 μL in a standard PCR microplate. Elution volumes below 75 μL result in lowered yields of DNA. You may lower the total elution volume to 75 μL, but the volumes of Elution Solution 1 and 2 must remain equal.				
		c. It is very important that you use the elution solutions in the correct order. Elution Solution 1 must be incubated with the DNA on the membrane for 3 minutes to ensure maximum yield. Then an equal volume of Elution Solution 2 must follow to give the correct pH for DNA storage.				

Réf : « quick reference card, BloodPrep Chemistry », Applied Biosystems

Les ADN doivent être enregistrés dans la base de données ADN et aliquotés (2 aliquots par échantillon). Un nettoyage de l'appareil est impératif côté déchets afin d'éviter la corrosion. La plaque blanche doit être démontée avec une clé.

3) Migration des échantillons d'ADN

1. Préparation du gel d'agarose seakem 1, 5%

- Mettre 0,75 gr Agarose Seakem dans 50 mL de TAE 1X
- Faire fondre au micro-onde
- Vérifier qu'il n'y ait plus de grumeaux translucides, sinon chauffer à nouveau
- Laisser refroidir à 50°C et ajouter 2 μL de BET (10 mg/mL)
- Après avoir mis le peigne, couler le gel et le laisser polymériser
- Dans le bac, mettre du TAE 1X de manière à recouvrir entièrement le gel

2. Chargement des puits

- Sur du papier parafilm, faire plusieurs dépôts de 2μL de tampon de charge
- Pour chaque échantillon prélever 8 μL d'ADN, mélanger avec 2μL de tampon de charge

- Placer dans un puits
- Pour le marqueur de poids moléculaires 4 μ L Lambda Eco RI Hind III + 6 μ L de TAE + 2 μ L de tampon de charge
- Laisser migrer pendant 1h30 dans du tampon TAE à 80 volts

Branchement de la grande cuve d'électrophorèse : - négatif (noir) au-dessus
 - positif (rouge) en dessous

3. Photographie de la migration

Vérifier la mise au point du Chemidoc

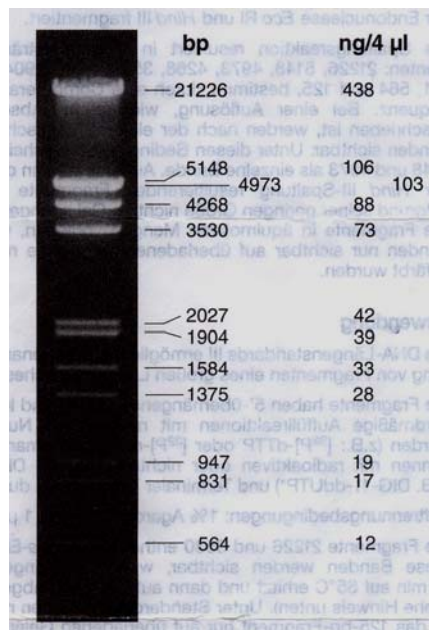
Bien identifier chaque échantillon sur la photo

§4. Expression des résultats

1. L'ADN ne migre pas du fait de sa taille importante, variable selon le tissu extrait ; l'intensité du fragment obtenu dépend de la concentration en ADN. Si aucun fragment n'est visible, l'ADN peut être totalement dégradé (une traînée est donc visible) ou simplement en faible quantité ; l'échantillon est conservé.

2. Une quantification est généralement faite par « produit en croix » ; l'intensité de la bande « échantillon » et celle du poids moléculaire dont la taille est identique ou proche (la concentration est connue et différente pour chaque bande avec « LambdaEcoRIHindIII »), sont relevées. Connaissant la quantité d'ADN correspondant au fragment de l'échelle de poids moléculaire pris pour référence, la quantité d'ADN de l'échantillon considéré peut être définie.

Migration de 4 μ L de poids moléculaire Lambda Eco RI Hind III à 250 μ g/mL



3. La quantité minimale d'ADN migré visible à l'œil sur un gel est de 10 ng.

§5. Conditions de conservation et d'élimination des échantillons

Avant migration, les échantillons sont aliquotés (2 aliquots par échantillon), étiquetés, conservés à –20°C et répertoriés dans la base de données DNATHèque.

Annexe 6 : Protocole de la PCR EHR16SR/EHR16SD

I. Amorces du gène 16S

EHR16SD: 5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' (Proligo, déssalé HPLC) TH⁽²⁾=61°C

Solution stock : 0.49 µg /µl (concentration à vérifier suivant le stock)

Solution intermédiaire (250 ng/µl) : 25.51 µl dans 24.49 µl H₂O ⁽¹⁾

Solution de travail (50ng/µl): Dilution de la solution stock au 1/4 (4µl de solution mère +16µl H₂O)

EHR16SR: 5' -TAGCACTCATCGTTTACAGC-3' (Proligo, déssalé HPLC) TH⁽²⁾=58°C

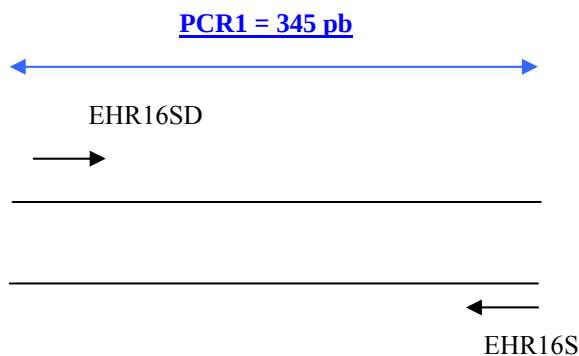
Solution stock : 0.51 µg /µl (concentration à vérifier suivant le stock)

Solution intermédiaire (250 ng/µl) : 24.51 µl dans 25.49 µl H₂O ⁽¹⁾

Solution de travail (50ng/µl): Dilution de la solution intermédiaire au 1/5 (5µl de solution mère +20µl H₂O)

⁽¹⁾ H₂O eau de pharmacie stérile pour injection en ampoule, aliquoter par 500 µl en tube PCR RNase, DNase free

⁽²⁾ Température d'hybridation



II. PCR

A Préparations des échantillons ADN

La recherche du gène 16S se fait sur ADN d'Ehrlichia

ADN extrait de broyat de tique / ADN extrait de sang

- Volume ADN 1µl par échantillon pour une concentration comprise entre 10 et 30ng/µl pour un ADN purifié ou ADN extrait de sang (concentration à vérifier après chaque extraction)

- Volume final 25µl

- Volume mix PCR 8,1 µl

- Mettre dans les tubes de PCR ⁽³⁾

* Les échantillons 15,9 µl H₂O + 5 µl ADN

* Le Positif 15,9 µl H₂O + 1 µl ADN positif ⁽⁴⁾

* Le négatif ⁽⁵⁾ 16,9 µl H₂O

⁽³⁾ Les tubes PCR sont traités Dnase, Rnase free

⁽⁴⁾ ADN positif = ADN Ehrlichia ruminantium Gardel p18 1/100

⁽⁵⁾ Le témoin négatif H₂O

Le témoin positif est traité en avant dernier. Terminer toujours avec le témoin négatif pour vérifier la contamination possible par les autres échantillons.

Mettre à dénaturer l'ADN avant d'ajouter le mix et l'huile si utilisation du thermocycleur Perkin Elmer.
Centrifuger brièvement avant l'ajout de 8,1 µl du mix.

B Préparation du mix de PCR

Préparation du mix de PCR dans un tube eppendorf® (n tubes + 1 tous les 5 tubes)

Tampon Taq 10X	2,5 µl / tube(vérifier que le tampon n'a pas de MgCl ₂)
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl / 3 mM / tube
dNTP (2,5 mM)	2 µl / 200 µM / tube
EHR16SD (50 ng / µl)	1 µl / 50 ng /tube
EHR16SR (50 ng /µl)	1 µl / 50 ng /tube
Taq (5 U/µl)	0,1 µl / 0,5 U / tube (à mettre au dernier moment)

- Ajouter 8,1 µl / tube du mix (volume final 25 µl)
- Ajouter une goutte d'huile minérale avant de mettre les tubes dans le thermocycleur Perkin Helmer, si vous utilisez le thermocycleur Thermo Hybaid, il ne faut pas rajouter d'huile.
- Centrifuger brièvement les tubes (2 phases)
- Démarrer l'appareil et attendre que la température atteigne au moins 80°C avant de mettre les tubes dans le thermocycleur

Programme **-Perkin Elmer®**

Attention : avec cet appareil étape de dénaturation avec l'ADN et l'eau séparément avant de rajouter le mix PCR

Dénaturation 94°C-----3' puis 4°C

Centrifuger brièvement après la dénaturation

Ajout de 8,1µl de mix PCR et d'une goutte d'huile par tube

Dénaturation	94°C	50"	} 40 cycles
Hybridation	57°C	50"	
Elongation	72°C	50"	
Elongation	72°C	----10'	puis Conservation 4°C-----10'

-Machine Thermo Hybaid®

Dénaturation 94°C-----3'

Dénaturation	94°C	50"	} 40 cycles
Hybridation	57°C	50"	
Elongation	72°C	50"	
Elongation	72°C	----10'	puis Conservation 4°C-----10'

-A la fin du programme, mettre les tubes à 4°C ou les faire migrer sur un gel d'agarose à 1.5%. Centrifuger les tubes avant de prélever le produit d'amplification à faire migrer.

III. Migration des échantillons

A. Préparation du gel d'agarose seakem 1,5%

- Mettre 0,75gr Agarose Seakem dans 50 ml de TAE 1X
- Faire fondre au micro-ondes
- Vérifier qu'il n'y ait plus de grumeaux translucides, sinon chauffer à nouveau
- Laisser refroidir à 50°C et ajouter 2 µl de BrEt (10 mg/ml)
- Après avoir mis le peigne, couler le gel et le laisser polymériser
- Dans le bac mettre du TAE 1X de manière à recouvrir entièrement le gel

B. Chargement des puits

- Sur du papier parafilm, faire plusieurs dépôts de 1µl de tampon de charge
- Pour chaque échantillon, prélever 5 µl du produit d'amplification (prélever en dessous de l'anneau d'huile), essuyer l'huile déposée sur le cône, mélanger avec 1µl de tampon de charge
- Placer dans un puits
- Pour le marqueur de poids moléculaires 4 µl ADN ladder 100pb + 6 µl de TAE + 2µl de tampon de charge
- **Laisser migrer pendant 1h30 à 80 volts. La cuve contient du tampon TAE qui recouvre le gel.**

C. Photographie de la migration

Vérifier la mise au point de l'appareil

Bien identifier chaque échantillon sur la photo

D. Interprétation

Taille attendue du produit d'amplification : produit = 345pb

IV. Réactifs et matériel utilisé

Tube PCR RNase DNase free 0,5 ml Marque Molecular Bio Products (MBP)

H2O eau de pharmacie stérile pour injection en ampoule, aliquoter par 500 µl en tube PCR RNase, DNase free

Cônes à filtre : Gilson diamond filter ou Eurodisposable labware

Agarose : agarose standard molecular biology grade Eurobio Ref: GEPAGA07-065

Poids moléculaire: Echelle de poids moléculaire 100pb Eurobio 100µg/ml Ref : GEPMQR 01-26

Tampon de charge : Eurobio 6x Ref : 017513

Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA)

- Solution stock [50X]
- préparer 100 mL de solution EDTA à 0.5 M et pH=8.0, bien dissoudre (peser 18,61 g et 70 ml d'eau ajuster avec NaOH à pH8 pour dissoudre puis ajuster à 100ml)
 - ajouter 242 g de Tris base et de l'H₂O ultra-pure pour faciliter la dissolution
 - ajouter 57.1 mL d'acide acétique à 100 %
 - ajuster à **1 L** avec de l'eau ultra-pure

Solution de travail [1X] 20ml de la solution stock dans 980ml d'H₂O (⁶)

(⁶) H₂O ultra pure (purifiée avec l'unité de filtration millipore) autoclavée

Annexe 7 : Protocole de la PCR nichée permettant la détection spécifique d'*E.canis*

I. Amorces du gène 16S

ECC: 5' AGACCGAACGCTGGCGGCAAGCC 3' (Proligo, déssalé HPLC) TH⁽²⁾=69°C

Solution stock : 0.29 µg /µl (concentration à vérifier suivant le stock)

Solution intermédiaire (250 ng/µl) : 43.10 µl dans 6.90 µl H₂O (¹)

Solution de travail (50ng/µl): Dilution de la solution stock au 1/5 (5µl de solution mère +20µl H₂O)

ECB: 5' CGTATTACCGCGGCTGCTGGC 3' (Proligo, déssalé HPLC) TH⁽²⁾=63°C

Solution stock : 0.40 µg /µl (concentration à vérifier suivant le stock)

Solution intermédiaire (250 ng/µl) : 31.25 µl dans 18.75 µl H₂O (¹)

Solution de travail (50ng/µl): Dilution de la solution intermédiaire au 1/5 (5µl de solution mère +20µl H₂O)

HE-3: 5'- TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT -3' (Proligo, déssalé HPLC) TH⁽²⁾=53°C

Solution stock : 0.53 µg /µl (concentration à vérifier suivant le stock)

Solution intermédiaire (250 ng/µl) : 23.58µl dans 26.42 µl H₂O (¹)

Solution de travail (50ng/µl): Dilution de la solution intermédiaire au 1/5 (5µl de solution mère +20µl H₂O)

ECA: 5' - CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-3' (Proligo, déssalé HPLC) TH⁽²⁾=56°C

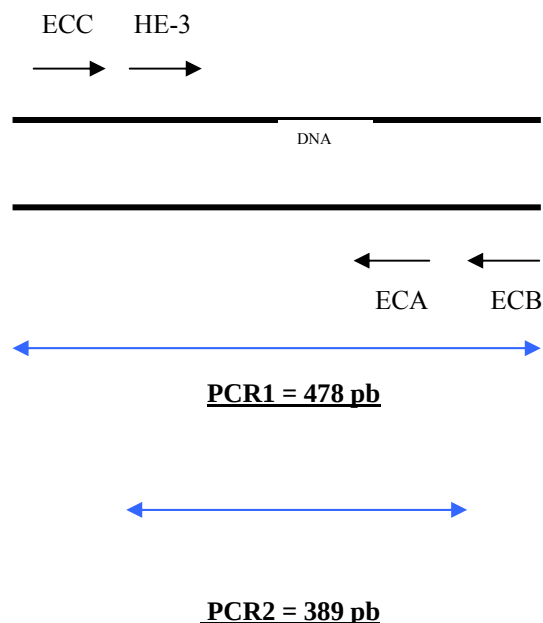
Solution stock : 0.54 µg /µl (concentration à vérifier suivant le stock)

Solution intermédiaire (250 ng/µl) : 23.15µl dans 26.85 µl H₂O (¹)

Solution de travail (50ng/µl): Dilution de la solution intermédiaire au 1/5 (5µl de solution mère +20µl H₂O)

(¹) H₂O eau de pharmacie stérile pour injection en ampoule, aliquoter par 500 µl en tube PCR RNase, DNase free

(²) Température d'hybridation



II PHASE 1

A Préparations des échantillons ADN

La recherche du gène 16S se fait sur

ADN d'E. canis

ADN extrait de broyat de tique / ADN extrait de sang

- Volume ADN 1 µl par échantillon pour une concentration comprise entre 10 et 30 ng/µl pour un ADN purifié ou ADN extrait de sang (concentration à vérifier après chaque extraction)

- Volume final 25 µl

- Volume mix PCR 8,1 µl

- Mettre dans les tubes de PCR (³)

* Les échantillons 15,9 µl H₂O + 5 µl ADN

* Le Positif 15,9 µl H₂O + 1 µl ADN positif (⁴)

* Le négatif (⁵) 16,9 µl H₂O

(³) Les tubes PCR sont traités Dnase, Rnase free

(⁴) Pour l'instant nous ne disposons pas d'ADN d'E. canis

(⁵) Le témoin négatif H₂O

Le témoin positif est traité en avant dernier. Terminer toujours avec le témoin négatif pour vérifier la contamination possible par les autres échantillons.

Mettre à dénaturer l'ADN avant d'ajouter le mix et l'huile si utilisation du thermocycleur Perkin Elmer.

Centrifuger brièvement avant l'ajout de 8,1 µl du mix.

B Préparation du mix de PCR

Préparation du mix de PCR dans un tube eppendorf (n tubes + 1P tous les 5 tubes)

Tampon Taq 10X	2,5 µl / tube (vérifier que le tampon n'a pas de MgCl ₂)
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl / 3 mM / tube
dNTP (2,5 mM)	2 µl / 200 µM / tube
ECC (50 ng / µl)	1 µl / 50 ng / tube
ECB (50 ng / µl)	1 µl / 50 ng / tube
Taq (5 U/µl)	0,1 µl / 0,5 U / tube (à mettre au dernier moment)

- Ajouter 8,1 µl / tube du mix (volume final 25 µl)

- Ajouter une goutte d'huile minérale avant de mettre les tubes dans le thermocycleur Perkin Helmer, si vous utilisez le thermocycleur Thermo Hybaid, il ne faut pas rajouter d'huile.

- Centrifuger brièvement les tubes (2 phases)

- Démarrer l'appareil et attendre que la température atteigne au moins 80°C avant de mettre les tubes dans le thermocycleur

Programme **-Perkin Elmer**

Attention : avec cet appareil étape de dénaturation avec l'ADN et l'eau séparément avant de rajouter le mix PCR

Dénaturation 94°C-----3' puis 4°C

Centrifuger brièvement après la dénaturation

Ajout de 8,1 µl de mix PCR et d'une goutte d'huile par tube

Dénaturation	94°C	50"	} 40 cycles
Hybridation	60°C	50"	
Elongation	72°C	50"	

Elongation 72°C----10' puis Conservation 4°C-----10'

-Machine Thermo Hybaid

Dénaturation 94°C-----3'

Dénaturation	94°C	50"	} 40 cycles
Hybridation	60°C	50"	
Elongation	72°C	50"	

Elongation 72°C----10' puis Conservation 4°C-----10'

III PHASE 2

A. Préparations des échantillons ADN

Reprendre les produits d'amplification de la première phase comme matrice ADN

Mettre dans les tubes de PCR (³) * Les échantillons 15,9 µl H₂O + 1 µl ADN (produit première phase)

* Le Positif 15,9 µl H₂O + 1 µl ADN positif (produit première phase)

* Le négatif (⁵) 15,9 µl H₂O + 1 µl T- (produit première phase)

Le témoin positif est traité en avant dernier. Terminer toujours avec le témoin négatif pour vérifier la contamination possible du mix.

Mettre à dénaturer l'ADN avant d'ajouter le mix et l'huile si utilisation du thermocycleur Perkin Elmer.

Centrifuger brièvement avant l'ajout de 8,1 µl du mix.

B. Préparation du mix de PCR

Préparation du mix de PCR dans un tube eppendorf (n tubes + 1P tous les 5 tubes)

Tampon Taq 10X	2,5 µl / tube(vérifier que le tampon n'a pas de MgCl ₂)
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl / 3 mM / tube
dNTP (2,5 mM)	2 µl / 200 µM / tube
HE-3 (50 ng / µl)	1 µl / 50 ng /tube
ECA (50 ng /µl)	1 µl / 50 ng /tube
Taq (5 U/µl)	0,1 µl / 0,5 U / tube (à mettre au dernier moment)

- Ajouter 8,1 µl / tube du mix (volume final 25 µl)

- Ajouter une goutte d'huile minérale avant de mettre les tubes dans le thermocycleur Perkin Helmer, si vous utilisez le thermocycleur Thermo-Hybaid, il ne faut pas rajouter d'huile.

- Centrifuger brièvement les tubes (2 phases)

- Démarrer l'appareil et attendre que la température atteigne au moins 80°C avant de mettre les tubes dans le thermocycleur

Programme **-Perkin Elmer**

Attention : avec cet appareil, étape de dénaturation avec l'ADN et l'eau séparément avant d'ajouter le mix PCR

Dénaturation 94°C-----3' puis 4°C

Centrifuger brièvement après la dénaturation

Ajout de 8,1 µl de mix PCR et d'une goutte d'huile par tube

Dénaturation 94°C 50"	}	40 cycles
Hybridation 60°C 50"		
Elongation 72°C 50"		

Elongation 72°C----10' puis Conservation 4°C-----10'

-Thermo Hybaid

Dénaturation 94°C-----3'

Dénaturation 94°C 50"	}	40 cycles
Hybridation 60°C 50"		
Elongation 72°C 50"		

Elongation 72°C----10' puis Conservation 4°C----2h30

- A la fin du programme, mettre les tubes à 4°C ou les faire migrer sur un gel d'agarose à 1.5%. Centrifuger les tubes avant de prélever le produit d'amplification à faire migrer.

IV. Migration des échantillons

A. Préparation du gel d'agarose seakem 1,5%

- Mettre 0,75gr Agarose Seakem dans 50 ml de TAE 1X
- Faire fondre au micro-ondes
- Vérifier qu'il n'y ait plus de grumeaux translucides, sinon chauffer à nouveau
- Laisser refroidir à 50°C et ajouter 2 µl de BrEt (10 mg/ml)
- Après avoir mis le peigne, couler le gel et le laisser polymériser
- Dans le bac mettre du TAE 1X de manière à recouvrir entièrement le gel

B. Chargement des puits

- Sur du papier parafilm, faire plusieurs dépôts de 1 µl de tampon de charge
- Pour chaque échantillon, prélever 5 µl du produit d'amplification (prélever en dessous de l'anneau d'huile), essuyer l'huile déposée sur le cône, mélanger avec 1 µl de tampon de charge
- Placer dans un puits
- Pour le marqueur de poids moléculaires 4 µl ADN ladder 100pb + 6 µl de TAE + 2 µl de tampon de charge
- **Laisser migrer pendant 1h30 à 80 volts. La cuve contient du tampon TAE qui recouvre le gel.**

C. Photographie de la migration

Vérifier la mise au point de l'appareil

Bien identifier chaque échantillon sur la photo

D. Interprétation

Taille attendue du produit d'amplification : 1^{er} produit = 478 pb

2^{ème} produit = 389 pb

V. Réactifs et matériel utilisé

Tube PCR RNase DNase free 0,5 ml Marque Molecular Bio Products (MBP)

H₂O eau de pharmacie stérile pour injection en ampoule, aliquoter par 500 µl en tube PCR RNase, DNase free

Cônes à filtre : Gilson diamond filter ou Eurodisposable labware

Agarose : agarose standard molecular biology grade Eurobio Ref: GEPAGA07-065

Poids moléculaire: Echelle de poids moléculaire 100pb Eurobio 100µg/ml Ref : GEPMQR 01-26

Tampon de charge : Eurobio 6x Ref : 017513

Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA)

Solution stock [50X] - préparer 100 mL de solution EDTA à 0.5 M et pH=8.0, bien dissoudre (peser 18,61 g et 70 ml d'eau ajuster avec NaOH à pH8 pour dissoudre puis ajuster à 100ml)
 - ajouter 242 g de Tris base et de l'H₂O ultra-pure pour faciliter la dissolution
 - ajouter 57.1 mL d'acide acétique à 100 %
 - ajuster à **1 L** avec de l'eau ultra-pure

Solution de travail [1X] 20ml de la solution stock dans 980ml d'H₂O (°)

(°) H₂O ultra pure (purifiée avec l'unité de filtration millipore) autoclavée

Annexe 8 : Protocole de la PCR nichée permettant la détection spécifique d'*A.platys*

I. Amorces du gène 16S

8F: 5'-AGTTTGATCATGGCTCAG-3' (Proligo, déssalé HPLC) $TH(^2)=52^{\circ}C$

Solution stock : 0.40 µg /µl (concentration à vérifier suivant le stock)

Solution intermédiaire (250 ng/µl) : 31.25 µl dans 18.75 µl H₂O (¹)

Solution de travail (50ng/µl): Dilution de la solution stock au 1/5 (5µl de solution mère +20µl H₂O)

1448F: 5'-CCATGGCGTGACGGGCAGTGTG- 3' (Proligo, déssalé HPLC) $TH(^2)=67^{\circ}C$

Solution stock : 0.35 µg /µl (concentration à vérifier suivant le stock)

Solution intermédiaire (250 ng/µl) : 35.71 µl dans 14.29 µl H₂O (¹)

Solution de travail (50ng/µl): Dilution de la solution intermédiaire au 1/5 (5µl de solution mère +20µl H₂O)

PLATYS: 5'- TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT -3' (Proligo, déssalé HPLC) $TH(^2)=51^{\circ}C$

Solution stock : 2.45 µg /µl (concentration à vérifier suivant le stock)

Solution intermédiaire (250 ng/µl) : 5.10µl dans 44.90 µl H₂O (¹)

Solution de travail (50ng/µl): Dilution de la solution intermédiaire au 1/5 (5µl de solution mère +20µl H₂O)

EHR16SR: 5' -TAGCACTCATCGTTTACAGC-3' (Proligo, déssalé HPLC) $TH(^2)=58^{\circ}C$

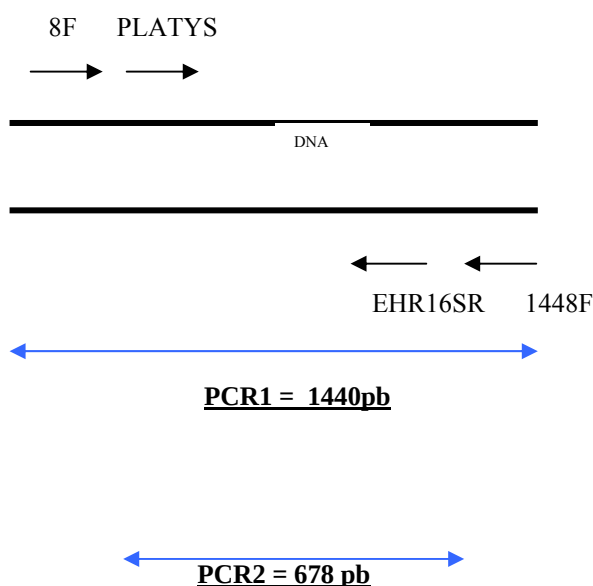
Solution stock : 0.51 µg /µl (concentration à vérifier suivant le stock)

Solution intermédiaire (250 ng/µl) : 24.51 µl dans 25.49 µl H₂O (¹)

Solution de travail (50ng/µl): Dilution de la solution intermédiaire au 1/5 (5µl de solution mère +20µl H₂O)

(¹) H₂O eau de pharmacie stérile pour injection en ampoule, aliquoter par 500 µl en tube PCR RNase, DNase free

(²) Température d'hybridation



II PHASE 1

A Préparations des échantillons ADN

La recherche du gène 16S se fait sur

ADN d'E. Platys

ADN extrait de broyat de tique / ADN extrait de sang

- Volume ADN 1 µl par échantillon pour une concentration comprise entre 10 et 30 ng/µl pour un ADN purifié ou ADN extrait de sang (concentration à vérifier après chaque extraction)

- Volume final 25 µl

- Volume mix PCR 8,1 µl

- Mettre dans les tubes de PCR (³)

* Les échantillons

15,9 µl H₂O + 5 µl ADN

* Le Positif

15,9 µl H₂O + 1 µl ADN positif (⁴)

* Le négatif (⁵)

16,9 µl H₂O

(³) Les tubes PCR sont traités Dnase, Rnase free

(⁴) Pour l'instant nous ne disposons pas d'ADN d'E. platys

(⁵) Le témoin négatif H₂O

Le témoin positif est traité en avant dernier. Terminer toujours avec le témoin négatif pour vérifier la contamination possible du mix.

Mettre à dénaturer l'ADN avant d'ajouter le mix et l'huile si utilisation du thermocycleur Perkin Elmer.

Centrifuger brièvement avant l'ajout de 8,1 µl du mix.

B Préparation du mix de PCR

Préparation du mix de PCR dans un tube eppendorf (n tubes + 1P tous les 5 tubes)

Tampon Taq 10X	2,5 µl / tube (vérifier que le tampon n'a pas de MgCl ₂)
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl / 3 mM / tube
dNTP (2,5 mM)	2 µl / 200 µM / tube
8F (50 ng / µl)	1 µl / 50 ng / tube
1448R (50 ng / µl)	1 µl / 50 ng / tube
Taq (5 U/µl)	0,1 µl / 0,5 U / tube (à mettre au dernier moment)

- Ajouter 8,1 µl / tube du mix (volume final 25 µl)

- Ajouter une goutte d'huile minérale avant de mettre les tubes dans le thermocycleur Perkin Helmer, si vous utilisez le thermocycleur Thermo Hybaid, il ne faut pas rajouter d'huile.

- Centrifuger brièvement les tubes (2 phases)

- Démarrer l'appareil et attendre que la température atteigne au moins 80°C avant de mettre les tubes dans le thermocycleur

Programme **-Perkin Elmer**

Attention : avec cet appareil étape de dénaturation avec l'ADN et l'eau séparément avant de rajouter le mix PCR

Dénaturation 94°C-----3' puis 4°C

Centrifuger brièvement après la dénaturation

Ajout de 8,1 µl de mix PCR et d'une goutte d'huile par tube

Dénaturation	94°C	1'	} 40 cycles	
Hybridation	45°C	1'		
Elongation	72°C	1'40		
Elongation	72°C	----10'	puis Conservation 4°C-----10'	

-Machine Thermo Hybaid

Dénaturation	94°C	-----3'		
Dénaturation	94°C	1'	} 40 cycles	
Hybridation	45°C	1'		
Elongation	72°C	1'40		
Elongation	72°C	----10'	puis Conservation 4°C-----10'	

III PHASE 2

A. Préparations des échantillons ADN

Reprendre les produits d'amplification de la première phase comme matrice ADN

Mettre dans les tubes de PCR (³)	* Les échantillons	15,9 µl H ₂ O + 1 µl ADN (produit première phase)
	* Le Positif	15,9 µl H ₂ O + 1 µl ADN positif (produit première phase)
	* Le négatif (⁵)	15,9 µl H ₂ O + 1 µL T- (produit première phase)

Le témoin positif est traité en avant dernier. Terminer toujours avec le témoin négatif pour vérifier la contamination possible du mix.

Mettre à dénaturer l'ADN avant d'ajouter le mix et l'huile si utilisation du thermocycleur Perkin Elmer.

Centrifuger brièvement avant l'ajout de 8,1 µl du mix.

B. Préparation du mix de PCR

Préparation du mix de PCR dans un tube eppendorf (n tubes + 1P tous les 5 tubes)

Tampon Taq 10X	2,5 µl / tube(vérifier que le tampon n'a pas de MgCl ₂)
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl / 3 mM / tube
dNTP (2,5 mM)	2 µl / 200 µM / tube
PLATYS (50 ng / µl)	1 µl / 50 ng /tube
EHR16SR (50 ng /µl)	1 µl / 50 ng /tube
Taq (5 U/µl)	0,1 µl / 0,5 U / tube (à mettre au dernier moment)

- Ajouter 8,1 µl / tube du mix (volume final 25 µl)

- Ajouter une goutte d'huile minérale avant de mettre les tubes dans le thermocycleur Perkin Helmer, si vous utilisez le thermocycleur Thermo-Hybaid, il ne faut pas rajouter d'huile.

- Centrifuger brièvement les tubes (2 phases)

- Démarrer l'appareil et attendre que la température atteigne au moins 80°C avant de mettre les tubes dans le thermocycleur

Programme **-Perkin Elmer**

Attention : avec cet appareil, étape de dénaturation avec l'ADN et l'eau séparément avant d'ajouter le mix PCR

Dénaturation 94°C-----3' puis 4°C

Centrifuger brièvement après la dénaturation

Ajout de 8,1 µl de mix PCR et d'une goutte d'huile par tube

Dénaturation 94°C 30"	}	40 cycles
Hybridation 55°C 30"		
Elongation 72°C 30"		

Elongation 72°C----10' puis Conservation 4°C-----10'

-Thermo Hybaid

Dénaturation 94°C-----3'

Dénaturation 94°C 30"	}	40 cycles
Hybridation 55°C 30"		
Elongation 72°C 30"		

Elongation 72°C----10' puis Conservation 4°C----2h30

-A la fin du programme, mettre les tubes à 4°C ou les faire migrer sur un gel d'agarose à 1.5%. Centrifuger les tubes avant de prélever le produit d'amplification à faire migrer.

IV. Migration des échantillons

A. Préparation du gel d'agarose seakem 1,5%

- Mettre 0,75gr Agarose Seakem dans 50 ml de TAE 1X
- Faire fondre au micro-ondes
- Vérifier qu'il n'y ait plus de grumeaux translucides, sinon chauffer à nouveau
- Laisser refroidir à 50°C et ajouter 2 µl de BrEt (10 mg/ml)
- Après avoir mis le peigne, couler le gel et le laisser polymériser
- Dans le bac mettre du TAE 1X de manière à recouvrir entièrement le gel

B. Chargement des puits

- Sur du papier parafilm, faire plusieurs dépôts de 1 µl de tampon de charge
- Pour chaque échantillon, prélever 5 µl du produit d'amplification (prélever en dessous de l'anneau d'huile), essuyer l'huile déposée sur le cône, mélanger avec 1 µl de tampon de charge
- Placer dans un puits
- Pour le marqueur de poids moléculaires 4 µl ADN ladder 100pb + 6 µl de TAE + 2 µl de tampon de charge
- **Laisser migrer pendant 1h30 à 80 volts. La cuve contient du tampon TAE qui recouvre le gel.**

C. Photographie de la migration

Vérifier la mise au point de l'appareil. Bien identifier chaque échantillon sur la photo

D. Interprétation

Taille attendue du produit d'amplification : 1^{er} produit = 1440 pb

2^{ème} produit = 678 pb

V. Réactifs et matériel utilisé

Tube PCR RNase DNase free 0,5 ml Marque Molecular Bio Products (MBP)

H₂O eau de pharmacie stérile pour injection en ampoule, aliquoter par 500 µl en tube PCR RNase, DNase free

Cônes à filtre : Gilson diamond filter ou Eurodisposable labware

Agarose : agarose standard molecular biology grade Eurobio Ref: GEPAGA07-065

Poids moléculaire: Echelle de poids moléculaire 100pb Eurobio 100µg/ml Ref : GEPMQR 01-26

Tampon de charge : Eurobio 6x Ref : 017513

Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA)

Solution stock [50X] - préparer 100 mL de solution EDTA à 0.5 M et pH=8.0, bien dissoudre (peser 18,61 g et 70 ml d'eau ajuster avec NaOH à pH8 pour dissoudre puis ajuster à 100ml)
- ajouter 242 g de Tris base et de l'H₂O ultra-pure pour faciliter la dissolution
- ajouter 57.1 mL d'acide acétique à 100 %
- ajuster à **1 L** avec de l'eau ultra-pure

Solution de travail [1X] 20ml de la solution stock dans 980ml d'H₂O (⁶)

(⁶) H₂O ultra pure (purifiée avec l'unité de filtration millipore) autoclavée

CARACTERISATION ET DIVERSITE GENETIQUE DES EHRLICHIOSES CANINES EN GUADELOUPE

SALADIN Claire, Marie

Résumé :

Les ehrlichioses sont d'importantes maladies émergentes humaines et animales, transmissibles par les tiques. La diversité des ehrlichioses entraîne une variété de signes cliniques et biologiques qui rend le diagnostic de ces maladies difficile.

Une étude réalisée en Guadeloupe sur 79 chiens a permis de mettre en évidence par PCR la circulation d'*Ehrlichia canis* et d'*Anaplasma platys* sur l'île. L'utilisation de tests sérologiques rapides en Guadeloupe, probable zone d'endémie, semblerait peu adaptée et les méthodes de diagnostic direct devraient prendre de l'importance dans le diagnostic différentiel de la maladie dans l'avenir.

Mots clés : EHRLICHIOSE - TIQUE - GENETIQUE - DIVERSITE GENETIQUE - CARNIVORE - CHIEN - GUADELOUPE

Jury : Président : Pr. D'ORTHO

Directeur : Dr. M. ABITBOL

Assesseurs : Pr. H.J. BOULOUIS - Pr. F. QUINTIN-COLONNA

CARACTERIZATION AND GENETIC DIVERSITY OF CANINE EHRLICHIOSIS IN GUADELOUPE

SALADIN Claire, Marie

Summary:

Ehrlichiosis are important emerging tick-borne diseases in both human and animal. The diversity of ehrlichiosis leads to a variety of clinical and biological signs which makes the diagnosis of these diseases difficult.

A study carried out in Guadeloupe on 79 dogs made it possible to highlight by PCR the circulation of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* on the island. The use of fast serological tests in Guadeloupe, probably an endemic region, would seem little adapted and the methods of direct diagnosis should take importance in the differential diagnosis of the disease in the future.

Keywords: EHRLICHIOSIS - TICK - GENETIC - GENETIC DIVERSITY - CARNIVORE -
DOG - GUADELOUPE

Jury : President: Pr. D'ORTHO

Director : Dr. M. ABITBOL

Assessors : Pr. H.J. BOULOUIS - Pr. F. QUINTIN-COLONNA