

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT

Année 2001

**L'EHRlichIOSE MONOCYTAIRE CANINE : ETUDE
EXPERIMENTALE D'UNE NOUVELLE SOUCHE
D'*Ehrlichia canis***

THESE

pour le

DOCTORAT VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement

devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL
le

par

Stéphanie JOURET

Née le 17 juin 1977 à Aix-en-Provence (Bouches du Rhône)

JURY

PRESIDENT :

M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

MEMBRES :

M. CHERMETTE
M. BOULOUIS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'ALFORT
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'ALFORT

MEMBRES INVITES :

M. DAVOUST
M. PARZY

Vétérinaire Biologiste en Chef
Médecin en Chef

REMERCIEMENTS

A NOTRE JURY DE THESE :

- **A Monsieur le Professeur de Médecine de Créteil**

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommage respectueux.*

- **A Monsieur le Professeur CHERMETTE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort : Parasitologie et Maladies Parasitaires.**

*Qu'il trouve ici nos plus sincères remerciements pour nous avoir fait découvrir et aimer
la Parasitologie.*

- **A Monsieur le Professeur BOULOUIS
de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort : Pathologie Générale, Microbiologie,
Immunologie.**

*Pour s'être, dès le début, intéressé à notre projet et nous avoir supervisé.
Sincère reconnaissance.*

- **A Monsieur le Vétérinaire Biologiste en Chef DAVOUST
Conseiller vétérinaire interarmées en région Sud-Est.**

*Pour avoir inspiré ce travail, l'avoir suivi et corrigé ; pour sa disponibilité, son
professionnalisme et sa gentillesse.
Qu'il soit remercié pour son amitié et qu'il trouve ici le témoignage de notre immense
estime. Nos routes se recroiseront, je l'espère, dans le Service de Santé des Armées.*

- **A Monsieur le Médecin en Chef PARZY
Directeur de l'Unité de Parasitologie de l'Institut de Médecine Tropicale du
Service de Santé des Armées (Marseille).**

*Pour son accueil, sa confiance et son encadrement durant les cinq mois de notre étude.
Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.*

- **A l'ensemble de l'équipe de l'Unité de Parasitologie de l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (Marseille).**

Pour nous avoir adoptée pendant cinq mois. Remerciements chaleureux à tous, et en particulier, à Madame Elizabeth CARME et à Monsieur Housem BOUCHIBA pour leurs judicieux conseils techniques.

- **Au personnel de l'Unité de Chirurgie et Physiologie Expérimentale de l'Institut de Médecine Tropicale à Marseille.**

Pour m'avoir ouvert les portes du Fort d'Entrecasteaux avec sympathie et dévouement. Qu'ils soient tous grandement remerciés de leur aide. Affectueuses pensées pour Monsieur Patrick BARTHARES, Infirmier Major, et Madame NAMY.

- **Au personnel du Secteur Vétérinaire Interarmées de Marseille.**

Merci à Monsieur CHINCHILLA pour son assistance technique.

- **Aux personnels des Laboratoires de Biologie Clinique, Biochimie et Anatomo-Pathologie des Hôpitaux d'Instruction des Armées LAVERAN à Marseille et DESGENETTES à Lyon.**

*Pour avoir réalisé gracieusement les analyses.
Qu'ils trouvent ici l'expression de notre reconnaissance.*

- **A mes parents.**

*Pour leur soutien et leur tendresse quotidienne depuis toujours.
Je leur dois l'épanouissement de ma vocation.*

- **A Cyrille.**

Qui continuera à partager avec passion les moments forts de ma vie.

- **A ma famille.**

- **A tous mes amis.**

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PREMIERE PARTIE :

<u>ETUDE GENERALE DE L'EHRlichIOSE MONOCYTAIRE CANINE.....</u>	3
---	----------

1. AGENT ETIOLOGIQUE.....	4
1.1 Classification.....	4
1.2 Historique.....	6
1.3 Morphologie et cycle.....	7
1.4 Culture.....	8
1.5 Le Genre <i>Ehrlichia</i>	9
1.6 Les autres rickettsies du chien.....	11
2. EPIDEMIOLOGIE.....	12
2.1 Agent vecteur : la tique <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	12
2.1.1 Classification.....	12
2.1.2 Morphologie.....	12
2.1.3 Cycle.....	14
2.1.4 Hôtes.....	15
2.1.5 Répartition géographique.....	15
2.1.6 Contamination de la tique par <i>E. canis</i>	16
2.1.7 Transmission d' <i>E. canis</i>	17
2.1.7.1 Transmission naturelle.....	17
2.1.7.2 Infection expérimentale.....	18
2.1.8 <i>Rhipicephalus sanguineus</i> vectrice d'autres maladies.....	19
2.2 Espèces sensibles à <i>Ehrlichia canis</i>	19
2.3 Réservoirs.....	19
2.4 Répartition géographique.....	20
2.5 Distribution saisonnière.....	21
3. PATHOGENIE et IMMUNITE.....	21
3.1 Pathogénie.....	21
3.1.1 Phase aiguë.....	21
3.1.2 Phases subclinique et chronique.....	23
3.2 Immunité.....	23
3.2.1 Immunité à médiation humorale.....	23
3.2.2 Immunité à médiation cellulaire.....	24
4. CLINIQUE.....	25
4.1 Symptômes.....	25
4.1.1 Phase aiguë.....	25
4.1.2 Phase subclinique.....	26
4.1.3 Phase chronique.....	27
4.2 Modifications biochimiques et immunologiques.....	28
4.2.1 Hypoalbuminémie.....	28
4.2.2 Hyperprotidémie.....	29
4.2.3 Autres modifications biochimiques.....	30
4.3 Modifications hématologiques.....	30
4.3.1 Thrombopénie.....	31
4.3.2 Anémie.....	32
4.3.3 Numération leucocytaire anormale.....	33

5. LÉSIONS.....	34
5.1 Lésions hémorragiques.....	34
5.2 Lésions de plasmocytose.....	34
5.2.1 Foie.....	35
5.2.2 Rate.....	35
5.2.3 Reins.....	35
5.2.4 Vaisseaux.....	36
5.2.5 Nœuds lymphatiques.....	36
5.2.6 Cerveau.....	36
5.2.7 Poumons.....	36
5.3 Lésions médullaires.....	37
5.4 Autres lésions.....	37
6. DIAGNOSTIC.....	37
6.1 Diagnostic épidémiologique.....	37
6.2 Diagnostic clinique.....	37
6.3 Diagnostic expérimental.....	38
6.3.1 Diagnostic hématologique et biochimique.....	38
6.3.1.1 Bilan sanguin.....	38
6.3.1.2 Electrophorèse des protéines.....	38
6.3.2 Diagnostic cytologique.....	39
6.3.2.1 Recherche de morula.....	39
6.3.2.2 Recherche de corps d'inclusion.....	40
6.3.2.3 Mise en culture.....	41
6.3.3 Diagnostic sérologique.....	42
6.3.3.1 Immunofluorescence indirecte.....	42
6.3.3.2 ELISA.....	43
6.3.3.3 Immunomigration rapide.....	44
6.3.3.4 Immunotransfert : Western Blot.....	46
6.3.4 Diagnostic génétique.....	46
6.3.4.1 Objectif.....	46
6.3.4.2 Principe de la PCR.....	47
6.3.5 Diagnostic nécropsique.....	49
6.4 Diagnostic différentiel.....	49
7. PRONOSTIC.....	50
7.1 Phase aiguë.....	50
7.2 Phase chronique.....	51
8. TRAITEMENT.....	51
8.1 Traitement étiologique.....	51
8.1.1 Sensibilité d' <i>E. canis</i> aux antibiotiques <i>in vitro</i>	51
8.1.2 Traitement anti-infectieux des formes cliniques.....	52
8.1.2.1 Doxycycline.....	52
8.1.2.2 Tétracycline.....	53
8.1.2.3 Dipropionate d'imidocarbe.....	53
8.2 Traitements adjuvants.....	54
9. PROPHYLAXIE.....	54
9.1 Prophylaxie sanitaire.....	54
9.1.1 Mesures concernant les chiens porteurs ou suspects.....	54
9.1.2 Mesures concernant le vecteur.....	55
9.1.2.1 Transmission directe : <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	55
9.1.2.2 Transmission indirecte.....	56
9.2 Prophylaxie médicale.....	56

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE D'UNE SOUCHE D'EHRlichia CANIS.....59

1. INTRODUCTION.....	60
1.1 Objectifs généraux.....	60
1.2 Collaborations.....	60
1.3 Matériel et méthodes communs aux quatre études.....	61
1.3.1 Souche Borgo d' <i>E. canis</i>	61
1.3.1.2 Cas princeps.....	61
1.3.1.3 Prélèvement.....	61
1.3.1.4 Conservation.....	62
1.3.2 Animaux.....	62
2. ETUDE CLINIQUE.....	63
2.1 Objectifs.....	63
2.2 Matériel et méthodes.....	64
2.2.1 Protocole expérimental d'inoculation.....	64
2.2.2 Protocole expérimental de réinoculation.....	64
2.2.3 Protocole thérapeutique.....	65
2.2.4 Suivi clinique et biologique.....	65
2.3 Résultats.....	66
2.3.1 Ehrlichiose aiguë symptomatique traitée.....	66
2.3.1.1 Phase aiguë.....	66
2.3.1.2 Guérison clinique par traitement.....	70
2.3.2 Ehrlichiose fruste.....	70
2.3.3 Ehrlichioses aiguës bénignes passant à la chronicité.....	71
2.3.4 Ehrlichiose aiguë suite à une inoculation sous-cutanée.....	76
2.4 Discussion.....	76
2.4.1 Aspects cliniques.....	76
2.4.2 Sensibilité à la réinfection.....	79
2.4.3 Infection par inoculation expérimentale sous-cutanée.....	79
3. ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE.....	80
3.1 Objectifs.....	80
3.2 Matériel et méthodes.....	80
3.2.1 Protocole de l'immunofluorescence indirecte (IFI).....	80
3.2.1.1 Préparation des lames d'antigène.....	80
3.2.1.2 Etape qualitative du dépistage.....	81
3.2.1.3 Etape quantitative de titrage.....	83
3.2.2 Test d'immunomigration rapide.....	83
3.3 Résultats.....	84
3.3.1 Analyse cinétique de la production d'anticorps.....	84
3.3.1.1 Cinétique des anticorps chez un sujet naïf avant et après traitement.....	84
3.3.1.2 Cinétique des anticorps chez des sujets séropositifs.....	84
3.3.1.3 Séroconversion chez un sujet naïf à forme fruste.....	85
3.3.2 Analyse du taux de lymphocytes.....	85
3.3.3 Comparaison de l'IFI et du test d'immunomigration rapide.....	86
3.3.4 Corrélation entre résultats sérologiques et manifestations cliniques.....	87
3.3.4.1 Cas d'ehrlichiose aiguë traitée.....	87
3.3.4.2 Cas d'ehrlichiose aiguë de sujets séropositifs.....	88
3.3.4.3 Cas d'ehrlichiose fruste.....	88
3.4 Discussion.....	88
3.4.1 Cinétique d'apparition des anticorps.....	88
3.4.2 Evaluation du test d'immunomigration rapide (IMR).....	91
4. ETUDE IN VITRO.....	92
4.1 Objectifs.....	92

4.2 Matériel et méthodes.....	92
4.2.1 Culture cellulaire.....	92
4.2.1.1 Equipement du laboratoire.....	92
4.2.1.2 Lignées cellulaires support de culture d' <i>E. canis</i>	92
4.2.1.3 Milieux de culture.....	93
4.2.1.4 Techniques de base en culture cellulaire.....	95
4.2.2 Isolement des <i>Ehrlichia</i>	96
4.2.2.1 Prélèvement de sang infecté.....	96
4.2.2.2 Séparation des monocytes.....	96
4.2.3 Infection des flasques supports	97
4.2.4 Mise en évidence de la phagocytose d' <i>E. canis</i> par les cellules.....	97
4.3 Résultats.....	98
4.4 Discussion.....	98
5.ETUDE MOLECULAIRE.....	100
5.1 Objectifs.....	100
5.2 Matériel et méthodes.....	101
5.2.1 Prélèvements.....	101
5.2.2 Extraction du matériel génétique.....	101
5.2.3 Amplification de l'ADN.....	102
5.2.3.1 Choix des amorces oligonucléotidiques.....	103
5.2.3.2 Protocoles de PCR.....	106
5.2.3.3 Détection des amplicons d'ADN.....	107
5.2.4 Séquençage de l'ADN.....	107
5.2.4.1 Choix des amorces.....	107
5.2.4.2 Purification de l'amplicon.....	107
5.2.4.3 Réaction de séquence.....	108
5.3 Résultats.....	109
5.3.1 Mise au point d'une PCR pour le dépistage de l'ehrlichiose canine.....	109
5.3.2 Dépistage par PCR appliqué à quatre d'ehrlichiose expérimentale.....	110
5.3.3 Détection d' <i>E. canis</i> par PCR sur tissus.....	112
5.3.4 Vérification de l'infection des cultures par PCR.....	112
5.3.5 Essai de séquençage partiel du gène ARNr 16S	113
5.4 Discussion.....	114
5.4.1 Sensibilité et spécificité de la PCR	114
5.4.2 Etude de la bactériémie.....	114
5.4.3 Application de la PCR aux tissus.....	115
5.4.4 Etude de la séquence partielle du gène ARNr 16S.....	117
 CONCLUSION.....	 119
 ANNEXES.....	 121
 BIBLIOGRAPHIE.....	 131

TABLES DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure	Page	Titre
Figure 1	5	Evolution de la classification de 1984 à 1998
Figure 2	6	Phylogénie d' <i>Ehrlichia</i> spp. à partir de la séquence du gène ARNr 16S
Figure 3	7	Morula d' <i>E. canis</i> dans un monocyte canin – coloration MGG G X 1000
Figure 4	8	Cycle de développement d' <i>E. canis</i> dans les monocytes
Figure 5	13	Tique <i>Rhipicephalus sanguineus</i> femelle gorgée
Figure 6	13	Schémas d'une femelle de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Figure 7	13	Description du genre <i>Rhipicephalus</i>
Figure 8	14	Cycle de développement de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Figure 9	16	Répartition géographique de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Figure 10	20	Situation géographique de l'ehrlichiose canine
Figure 11	26	Quelques manifestations cliniques de l'ehrlichiose canine monocyttaire à <i>E. canis</i>
Figure 12	29	Comparaison de l'électrophorèse des protéines d'un chien ehrlichien et d'un chien sain
Figure 13	34	Lésions hémorragiques d'ehrlichiose canine
Figure 14	40	Morulas intramonocytaires d' <i>E. canis</i>
Figure 15	41	Morulas d' <i>E. canis</i> en microscopie électronique
Figure 16	43	Principe de l'immunofluorescence indirecte
Figure 17	45	Principe de l'immunomigration rapide
Figure 18	48	Cycle d'amplification de l'ADN par PCR
Figure 19	48	Principe de la Polymérase Chain Reaction
Figure 20	64	Chronologie des passages <i>in vivo</i> de la souche Borgo
Figure 21	66	Evolution de la température rectale du chien n°1
Figure 22	67	Evolution de la thrombocytemie du chien n°1
Figure 23	67	Evolution de la numération leucocytaire du chien n°1
Figure 24	68	Evolution de l'hémoglobinemie du chien n°1
Figure 25	68	Evolution des enzymes hépatiques ASAT du chien n°1
Figure 26	69	Evolution de la bêtaglobulinémie du chien n°1
Figure 27	69	Evolution de l'albuminémie sérique du chien n°1
Figure 28	71	Evolution de la thrombocytemie et de la température rectale du chien n°2
Figure 29	72	Evolution de la température rectale du chien n°4
Figure 30	72	Rate du chien n°4
Figure 31	73	Foie du chien n°4
Figure 32	73	Evolution de la thrombocytemie du chien n°4
Figure 33	74	Evolution de la numération leucocytaire du chien n°4
Figure 34	74	Evolution de l'hémoglobinemie du chien n°4
Figure 35	75	Evolution de l'albuminémie du chien n°4
Figure 36	76	Coupe d'un ganglion mésentérique hémorragique du chien n°4
Figure 37	82	Fluorescence de morulas intracytoplasmiques (chien n°1)
Figure 38	84	Evolution du titre en anticorps des chiens n°1,2,3 et 4
Figure 39	85	Evolution du titre en anticorps chez le chien n°2
Figure 40	86	Evolution du taux de lymphocytes chez les chiens n°1 et n°2

Figure 41	87	Comparaison de l'évolution de la température rectale et du titre en anticorps du chien n°1
Figure 42	87	Comparaison de l'évolution de la thrombocytémie et du titre en anticorps du chien n°1
Figure 43	88	Comparaison de l'évolution de la thrombocytémie et du titre en anticorps du chien n°2
Figure 44	97	Schéma de récupération de l'anneau de cellules mononuclées
Figure 45	106	Séquence partielle du gène ARNr 16S d' <i>E. canis</i> souche Oklahoma
Figure 46	109	Exemple de résultat-séquence à la sortie du séquenceur
Figure 47	110	Détection du fragment de 385 paires de base spécifique d' <i>E. canis</i> sur sang total des témoins positif et négatif avec les amorces HE1C et HE3S
Figure 48	110	Détection du fragment de 789 paires de base du gène ARNr 16S bactérien sur sang total d'un témoin positif avec les amorces P0mod et PC3mod
Figure 49	111	Résultats partiels des PCR de dépistage sur prélèvements de sang total du chien n°1
Figure 50	112	Résultats des PCR sur tissus des chiens n°1,2, 3 et 4
Figure 51	112	Résultats des PCR sur suspensions cellulaires
Figure 52	113	Alignement partiel des séquences du gène ARNr 16S détecté sur sang total des chiens n°1 et 4
Figure 53	113	Alignement partiel des séquences du gène ARNr 16S des souches connues d' <i>E. canis</i>
Figure 54	118	Choix d'amorces spécifiques pour l'amplification et le séquençage du gène ARNr 16S d' <i>E. canis</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	page	Titre
Tableau I	10	Caractéristiques des bactéries du genre <i>Ehrlichia</i>
Tableau II	28	Symptômes décrits dans l'ehrlichiose canine
Tableau III	86	Comparaison des résultats de l'IFI et de l'IMR concernant les chiens n°1 et 2
Tableau IV	104	Couples d'amorces du gène ARNr 16S d'amplification spécifique d' <i>E. canis</i>
Tableau V	104	Couples d'amorces du gène ARNr 16S d'amplification spécifiques du du genre <i>Ehrlichia</i>
Tableau VI	105	Couples d'amorces du gène ARNr 16S d'amplification universelle des bactéries
Tableau VII	106	Protocoles de PCR en fonction des amorces utilisées
Tableau VIII	111	Résultats des PCR sur sang total des chiens n°1,2,3 et 4 avec les amorces HE1C et HE3S

LISTE DES ANNEXES

Annexe	page	Titre
Annexe I	122	Alignement des séquences du gène ARNr 16S de plusieurs espèces d' <i>Ehrlichia</i> et d' <i>Escherichia coli</i>
Annexe II	126	Alignement des séquences partielles du gène ARNr 16S des souches de l'espèce <i>Ehrlichia canis</i>
Annexe III	130	Alignement des séquences des amplicons de 385 paires de base spécifiques d' <i>E. canis</i> du gène ARNr 16S détecté sur sang total de quatre chiens infectés expérimentalement

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS (ordre alphabétique)

° C :	degré Celsius
Ac :	Anticorps
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ALAT :	Alanine AminoTransférase
ARNr :	Acide Ribonucléique ribosomique
ASAT :	Aspartate AminoTransférase
ATP :	Adénosine Triphosphorique
BSA :	Bovine Serum Albumine
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO :	Diméthyl Sulfoxide
dNTP :	Nucléotides Triphosphates
EDTA :	Ethylène Diamine Tetracetic
Elisa :	Enzyme Linked Immunoassay Sorbent
EMC :	Ehrlichiose Monocytaire Canine
Hepes :	Acide N-2-Hydroxy-Ethyl-piperazine N-5-éthane sulfonique
IFI :	Immunofluorescence indirecte
Ig :	Immunoglobuline
IMR :	Immunomigration Rapide
IMTSSA :	Institut de Medecine Tropicale du Service de Santé des Armées
kDa :	Kilodalton
min :	minutes
PAL :	Phosphatases alcalines
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PMIF :	Facteur Inhibant la Migration Plaquettaire
RT-PCR :	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
Taq :	Thermus aquaticus
Th :	Température d'hybridation
UI :	Unité Internationale
UV :	Ultra Violet

INTRODUCTION

L'ehrlichiose canine est une maladie infectieuse causée par une bactérie intramonocytaire, *Ehrlichia canis*. La maladie a été décrite pour la première fois en 1935 par DONATIEN et LESTOQUARD en Algérie. Ses principales manifestations sont hémorragiques.

Transmise par la tique brune *Rhipicephalus sanguineus*, l'infection a une distribution mondiale. Elle est rencontrée aux Etats-Unis, en Afrique, en Asie du Sud, en Inde et en Europe, notamment en France où elle sévit dans le pourtour Méditerranéen.

L'essor des techniques de Biologie Cellulaire et Moléculaire permet depuis dix ans de compléter la connaissance de sa répartition géographique, de découvrir l'existence de nouvelles souches de l'agent pathogène de l'ehrlichiose monocyttaire canine et, de mieux comprendre sa pathogénie.

Ainsi, nos travaux expérimentaux, réalisés au sein de l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées à Marseille, portent sur l'étude de ces techniques, appliquées à une souche d'*Ehrlichia canis* isolée en Corse en 1989. A l'occasion de l'inoculation expérimentale de quatre chiens avec cette souche, nous avons effectué un suivi clinique et biologique notamment sérologique de l'ehrlichiose canine, avant de réaliser un travail de recherche sur la souche elle-même.

PREMIERE PARTIE

ETUDE GENERALE **DE L'EHRlichiose MONOCYTAIRE CANINE**

1.AGENT ETIOLOGIQUE

Situées entre les *Rickettsiae* et les *Chlamydiales*, les *Ehrlichiae* sont des bactéries Gram négatif intracellulaires obligatoires, visibles en microscopie optique. Ces agents pathogènes ont en commun leur tropisme pour les éléments figurés du sang sauf les érythrocytes (on les rencontre dans les monocytes, granulocytes ou plaquettes selon les espèces), leur développement dans le cytoplasme des cellules et pour la plupart, leur mode de transmission par un Arthropode.

1.1 Classification

L'agent étiologique de l'Ehrlichiose monocyttaire canine (EMC) appartenait à l'Ordre des Rickettsiales, Famille des *Rickettsiaceae*, Tribu des *Ehrlichieae*, genre *Ehrlichia*.

D'après la classification traditionnelle datant d'avant 1997, la tribu des *Ehrlichieae* comportait 3 genres : *Ehrlichia*, *Cowdria*, et *Neorickettsia* (Cf. Figure 1) (7).

Une révision de la taxonomie s'est imposée depuis 1994 avec la première utilisation de l'amplification génomique et du séquençage de l'ADN d'*Ehrlichia canis* (84) (gène ARNr 16S et gène opéron *groEL* (127)). Ces outils de la biologie moléculaire ont permis de compléter progressivement l'arbre phylogénétique.

Ainsi, la tribu des *Ehrlichieae* n'appartient plus à la famille des *Rickettsiaceae* (dont elle reste néanmoins très proche ; nous nommerons d'ailleurs les *Ehrlichia* « rickettsies » au sens large du terme) et la tribu est partagée en 4 groupes génomiques (Cf. Figure 2). Cette division comporte des modifications par rapport à la classification traditionnelle (21,65).

Les *Ehrlichia* sont rapprochées des *Wolbachia* et des *Anaplasma* (22). Ce rapprochement avec les *Wolbachia* est d'autant plus intéressant que ces dernières ont la propriété unique de pouvoir modifier le génome des cellules eucaryotes (22).

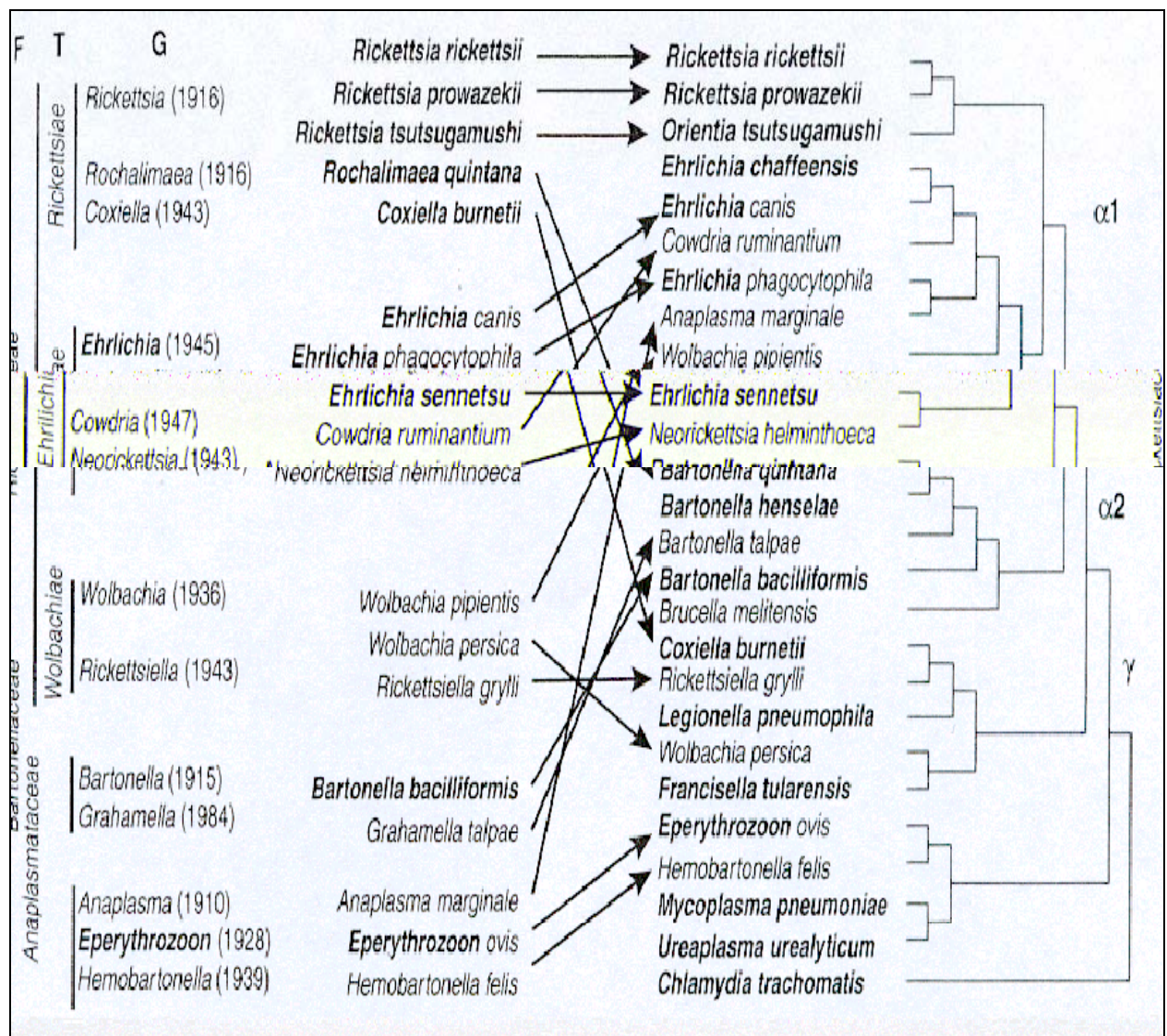


Figure 1: Evolution de la classification (droite : édition 1984, gauche : édition 1998) (120)

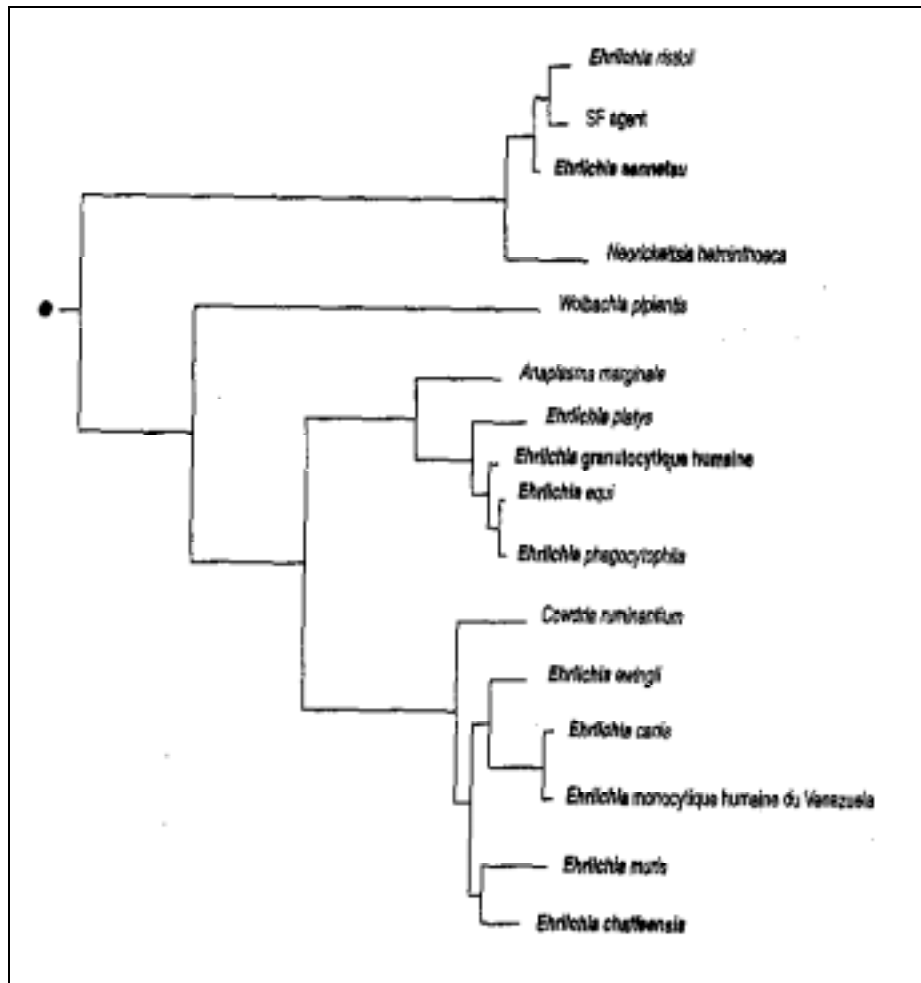


Figure 2 : Phylogénie d'*Ehrlichia* spp. à partir de la séquence du gène ARNr 16S (120)
 (• arbre père : protéobactéries du groupe α 1)

1.2 Historique

L'agent pathogène responsable de l'ehrlichiose canine a été découvert en 1935 par DONATIEN et LESTOQUARD en Algérie dans le sang de chiens entretenus à l'Institut Pasteur d'Alger, et fut baptisé *Rickettsia canis* (57). En 1937, ils montrent que l'infection est transmise par la tique *Rhipicephalus sanguineus* et établissent que l'infection sévit aussi en France à Montpellier et Marseille (60).

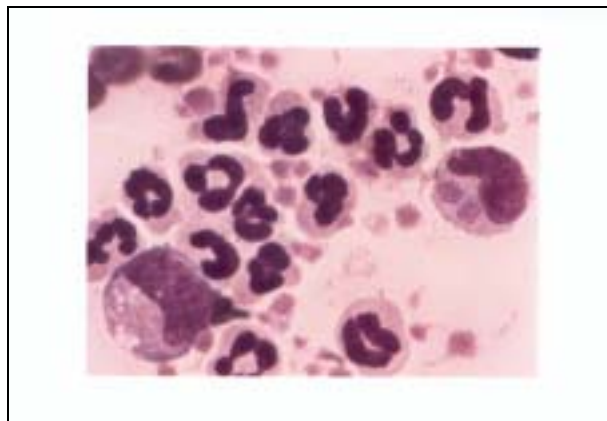
Dans les années suivantes, la maladie est identifiée en Afrique, Inde, Moyen-Orient, Etats-Unis, Antilles. La rickettsiose est désormais appelée ehrlichiose, en hommage au savant allemand EHRLICH.

L'intérêt pour l'ehrlichiose est croissant depuis la terrible épidémie de 1968 qui décima une partie de la population canine militaire lors de la guerre de Vietnam (106). Sa forme clinique particulièrement redoutable la fit nommer « pancytopenie tropicale canine ».

Ce n'est qu'en 1971, après une longue période d'absence de diagnostic, que l'agent causal est isolé, rebaptisé *Ehrlichia canis* (*E. canis*) et la technique de culture mise au point (108). Le test sérologique d'immunofluorescence indirecte est adopté en 1972 pour une mise en évidence spécifique (119).

1.3. Morphologie et cycle

En microscopie optique, on observe un microorganisme immobile, de petite taille (0,5 à 4µm) qui infecte le cytoplasme des leucocytes (monocytes sanguins, macrophages tissulaires, cellules réticulo-endothéliales et histiocytes de différents organes) et des thrombocytes du chien et des autres canidés. Cette bactérie ne prend pas la coloration de Gram, mais apparaît à la coloration de May-Grünwald-Giemsa comme une inclusion cellulaire basophile (rouge, lilas ou bleu foncé selon le stade de développement de la bactérie : les corps élémentaires sont pourpre, les corps initiaux gris bleu) (29, 108) (Cf. Figure 3).



**Figure 3 : Morula d'*E. canis* dans un monocyte canin Coloration MGG (GX1000)
(cliché D. PARZY 1996)**

Les *Ehrlichia* se présentent sous trois formes morphologiques successives : - les corps élémentaires (0,5 µm) – les corps initiaux (0,5-2,5 µm) – les morulas (4 µm) (47).

- Les corps élémentaires sont des éléments aux contours ovoïdes, limités par une double membrane et isolés du cytoplasme de la cellule-hôte par la membrane d'une vacuole. La membrane externe peut paraître ridée, la membrane interne semble adhérer au cytoplasme.
- Les corps initiaux sont hétérogènes, constitués de sous-unités. Ils représentent une forme intermédiaire.
- Les morula sont les formes mûres d'*E. canis*. Elles renferment 2 à 40 corps élémentaires dans une vacuole produite par la cellule-hôte.

Les trois stades du cycle d'*E. canis* survivent en position intracellulaire (Cf. Figure 4). En effet le mode de survie intracellulaire est ainsi expliqué : les *Ehrlichia* pénètrent dans la cellule hôte par phagocytose dirigée et se multiplient dans le phagosome en inhibant la fusion phagolysosomiale (23). Cette inhibition de la fusion phagosome-lysosome est étroitement liée à l'activité métabolique de la bactérie comme en témoigne sa restitution en présence de tétracycline, antibiotique connu pour ses capacités de blocage de la synthèse des protéines des procaryotes (23).

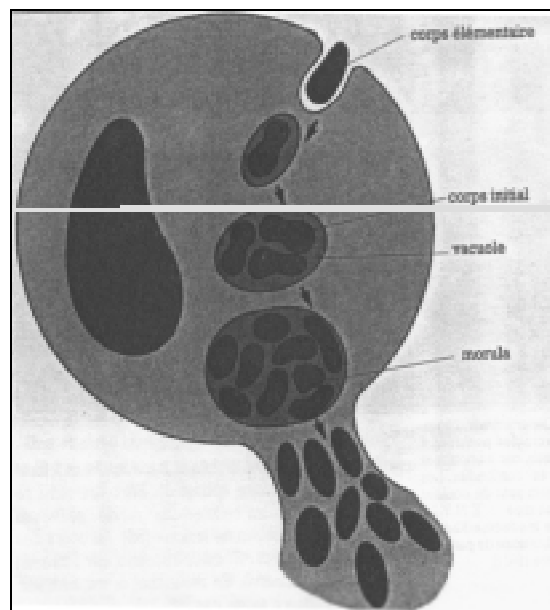


Figure 4 : Cycle de développement d'*E. canis* dans les monocytes (108)

La propagation de l'infection se fait par lyse du phagosome et libération des bactéries dans l'environnement (29).

Ce cycle de développement est voisin de celui des bactéries de l'ordre des *Chlamydiales*, le genre *Ehrlichia* diffère cependant des espèces de la famille des *Chlamydiaceae* par ses caractères génétiques, antigéniques (absence de réaction croisée en immunofluorescence indirecte) et métaboliques (les *Ehrlichia* sp. sont aptes à oxyder la L-glutamine et à générer de l'ATP) (65).

1.4 Culture

En 1971, NYINDO et al. de l'Université de l'Illinois, furent les premiers à cultiver avec succès *E. canis* dans des monocytes du sang périphérique de chiens infectés expérimentalement, prélevés pendant la phase aiguë de la maladie (108).

La méthode a été améliorée en transférant des monocytes infectés par *E.canis* sur une culture cellulaire de monocytes canins normaux, provenant de chiens non infectés (79).

Cette première lignée cellulaire, permettant une propagation massive d' *E.canis*, appelée MDH (cellules hybrides MDH-SP) a été développée par HOLLAND et RISTIC (81).

D'autres méthodes de culture ont utilisé des macrophages de péritoine du chien (124), des cellules humaines-hybrides (125) et des lignées de macrophages de chiens (lignée DH82 promue par WELLMAN *et al.* (139) en 1988, développée par DAWSON *et al.* en 1993 (49), et utilisée depuis à grande échelle pour la culture d'*E. canis*).

La mise en culture est longue : il faut 14 à 34 jours pour voir apparaître les premiers microorganismes (84).

Récemment, une lignée de cellules endothéliales immortelles d'origine humaine (EU. HMEC-1) a été testée comme support de culture intéressant pour *E. canis*, *E. chaffeensis* (agent de l'Ehrlichiose humaine) et *Rickettsia rickettsii* (agent de la Fièvre Pourprée des Montagnes Rocheuses chez l'homme et le chien) (3,52). Il semblerait même qu'*E. canis* aurait une meilleure croissance sur ces cellules que sur les cellules DH82. Ce nouveau support cellulaire reste à explorer plus précisément.

1.5 Le Genre Ehrlichia

On a longtemps pensé que les *Ehrlichia* infectaient leurs hôtes de manière spécifique, ce qui explique leur appellation (*E. canis*, *E. equi* ...). Mais expérimentalement, il est prouvé que l'infection interspèces est possible pour plusieurs de ces bactéries, le doute persiste concernant l'infection naturelle.

La pathogénicité d'*E. canis* pour l'homme a par exemple longtemps été suspectée à cause de la réaction sérologique croisée obtenue en 1986 lors du premier cas humain d'ehrlichiose répertorié par MAEDA *et al.* (98) et lors de l'étude de PARZY *et al.* en 1991 (112) . Cependant, grâce à l'isolement en 1991, de l'agent pathogène sur un malade, une étude de biologie moléculaire a pu être réalisée. Elle a conduit à mettre en évidence des différences génomiques entre la bactérie isolée et *E. canis* : la nouvelle bactérie fut nommée *Ehrlichia chaffeensis* (55) (Cf. Tableau I).

Tableau I : Caractéristiques des bactéries du genre *Ehrlichia* (21)

Génogroupe	Espèce	Hôte naturel	Symptomatologie	Cellules cibles in vivo	Vecteur	Géographie
1	<i>E. sennetsu</i>	Homme	Fièvre glandulaire	Monocytes, Macrophages	Helminthes ?	Japon
	Agent SF	Métacercarie du parasite	Fièvre CN et CT Adénopathie souris	Cellules mononucléées	<i>Stellantchasmus fallacus</i> (helminthe)	Japon
	<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	Chiens et canidés	Salmon poisoning, Syndrome hémorragique	Macrophages	<i>Nanophyetus salmincola</i> (helminthe)	USA
	<i>E. risticii</i>	Cheval	Ehrlichiose équine monocytique ou Potomac horse fever	Monocytes, macrophages Cellules épithéliales intestin	Helminthes ?	USA Europe
2	<i>Wolbachia</i>	Insectes	Incompatibilité fertile Parthénogénèse	?	<i>Culex pipiens</i> (moustique)	?
3	<i>C. ruminantum</i>	Chèvre, moutons, bétail	Péricardite	Cellules endothéliales Monocytes-macrophages	<i>Amblyomma sp</i>	Afrique
	<i>E. canis</i>	Chiens	Ehrlichiose canine ou Pancytopenie canine tropicale	Granulocytes	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ubiquitaire
	<i>E. ewingii</i>	Chiens	Ehrlichiose canine granulocytaire	Monocytes	?	USA
	Ehrlichiose humaine du Venezuela	Homme	Asymptomatique	Monocytes	?	Venezuela
	<i>E. chaffeensis</i>	Homme	Ehrlichiose humaine américaine	Monocytes Macrophages	<i>Amblyomma americanum</i>	USA
	WSU86-1044 <i>E. muris</i>	Bétail Souris	? ?	? Monocytes	? ?	Japon
4	<i>Anaplasma</i>	Bovins, Ovins, Caprins	Anémie hémolytique	Erythrocytes	<i>Dermacentor andersonii</i> et <i>D. variabilis</i>	Europe Sud
	Ehrlichiose granulocytaire humaine	Moutons, Chevaux, chiens, cerfs	Ehrlichiose granulocytaire humaine	Granulocytes	<i>Ixodes ricinus</i>	Ubiquitaire
	<i>E. phagocytophila</i> <i>E. equi</i> <i>E. platys</i>	Moutons, bétail, bison Cheval Chiens	Tick-born fever Ehrlichiose équine Thrombocytopénie cyclique canine	Granulocytes Granulocytes Plaquettes	<i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes sp</i> ? ?	
Non groupé	<i>E. bovis</i> et <i>ovina</i>	Moutons, bétail	Ehrlichioses bovines et ovines	Monocytes, macrophages	<i>Hyalomma Rhipicephalus</i>	Moyen-Orient,
	<i>E. ondiri</i>	Bétail, moutons	Fièvre pétéchiale bovine	Granulocytes	?	Afrique Sri Lanka Kenya

1.6. Les autres rickettsies du chien (7,47)

- ***Ehrlichia platys*** : Infectant les plaquettes du chien, elle est responsable d'une thrombopénie et d'une thrombopathie par période d'une à deux semaines : il s'agit de la Thrombopénie cyclique du chien. La bactérie a été isolée dans différents états des Etats-Unis sans mise en évidence d'un pouvoir pathogène, et plus récemment en Grèce et à Taïwan. Il semblerait qu'il existe une variabilité génétique à l'origine de plusieurs souches distinctes. Il n'existe pas de réaction croisée sérologique avec *E. canis*.

- ***Ehrlichia risticii*** : Responsable de l'ehrlichiose monocyttaire équine (EME) ou Potomac Horse Fever, elle peut être inoculée expérimentalement aux carnivores domestiques, provoquant des symptômes modérés et transitoires (diarrhée, hyperthermie, abattement, adénomégalie) et une séroconversion systématique. Dans les conditions naturelles, elle serait responsable d'une ehrlichiose canine atypique. Il est donc possible que les chiens et les chats soient les réservoirs d'*E. risticii*.

- ***Ehrlichia ewingii*** : Cette *Ehrlichia* intragranulocytaire infecte les granulocytes neutrophiles et éosinophiles. Elle est responsable d'une ehrlichiose granulocytaire canine caractérisée par des signes cliniques moins marqués que lors de l'ehrlichiose classique, avec prédominance de symptômes locomoteurs : boiterie d'un ou plusieurs membres, raideur, dos voussé, difficultés à se lever ou à marcher, articulations douloureuses ou enflées .

Il existe des croisements sérologiques avec *E. canis*.

- ***Ehrlichia equi*** : Cette *Ehrlichia* infecte les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles dans l'espèce équine. Chez le chien, elle est responsable d'une infection accompagnée de légers troubles de l'hémogramme (anémie et thrombopénie), qui passe la plupart du temps inaperçue. Elle est très proche génétiquement d'*E. phagocytophila* (un nucléotide de différence sur le gène ARNr 16S), responsable de la Tick Borne Fever des ruminants, décrite aussi ponctuellement chez le chien et de l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine.

Il existe un test sérologique spécifique.

- ***Ehrlichia chaffeensis*** : L'agent de l'ehrlichiose monocyttaire humaine peut infecter en milieu naturel le chien (56). Les manifestations de la maladie peuvent être graves. Ainsi, le rôle éventuel des chiens comme réservoir zoonotique de l'infection humaine n'a pas été écarté.

- ***Rickettsia rickettsii*** : Cette rickettsie est responsable de la Rocky Mountain Spotted Fever (Fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses), une maladie qui affecte plusieurs espèces de vertébrés, dont l'homme et le chien. Jusqu'à ces dernières années, la maladie n'a été décrite que sur le continent américain. Récemment, des cas ont été suspectés en Italie. La transmission transovarienne de cette rickettsie de la tribu des *Rickettsiaceae*, dans la tique vectrice, est intéressante à signaler par opposition à *E. canis* .

- ***Rickettsia conorii*** : Elle provoque chez l'homme la Fièvre boutonneuse méditerranéenne, qui est fréquente dans le Sud-Est de la France. Certaines enquêtes épidémiologiques rapportent une prévalence élevée de chiens infectés dans les régions concernées, et posent ainsi la question d'un éventuel réservoir canin.

2. EPIDEMIOLOGIE

2.1 Agent vecteur : la tique *Rhipicephalus sanguineus*

2.1.1 Classification (28)

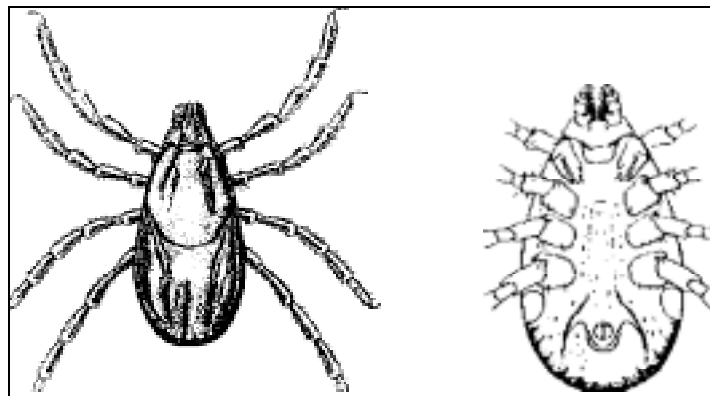
Les tiques représentent un des groupes les plus importants d'ectoparasites qui affectent la santé humaine et animale. Elles font partie des Acariens, sous-ordre des *Ixodides* caractérisé par la présence de stigmates en arrière des hanches IV (métastigmatiques). On distingue deux familles : les *Ixodidés* (« tiques dures ») et les *Argasidés* (« tiques molles »). *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*), dite tique brune du chien, appartient aux *Ixodidés*.

2.1.2 Morphologie (28)

Les caractères généraux des *Ixodidés* montrent un dimorphisme sexuel très marqué, en relation avec le repas sanguin (Cf. Figures 5 et 6).



Figure 5 : Photographie d'une tique *Rhipicephalus sanguineus* femelle gorgée (Cliché Merial)



vue dorsale

vue ventrale

Figure 6 : Schémas d'une femelle de *Rhipicephalus sanguineus* (28)

Le genre *Rhipicephalus* est Métastricata, brévirostre, à capitulum hexagonal. Sa reconnaissance apparaît donc assez aisée (Cf. Figure 7).

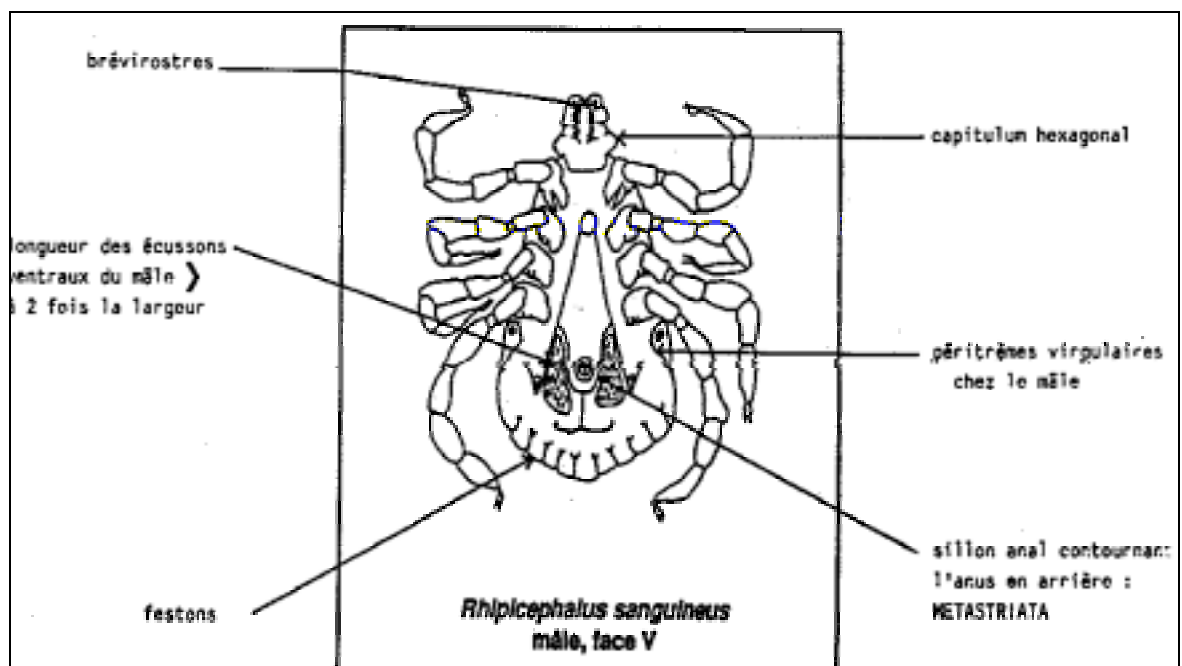


Figure 7 : Description du genre *Rhipicephalus* (28)

2.1.3 Cycle (17,28)

Le cycle de *Rhipicephalus sanguineus* est trixène : la tique se fixe sur un hôte différent à chaque stade (larve, nymphe et adulte). Les trois hôtes sont généralement de la même espèce, elle est donc dite monotrope (Cf. Figure 8).

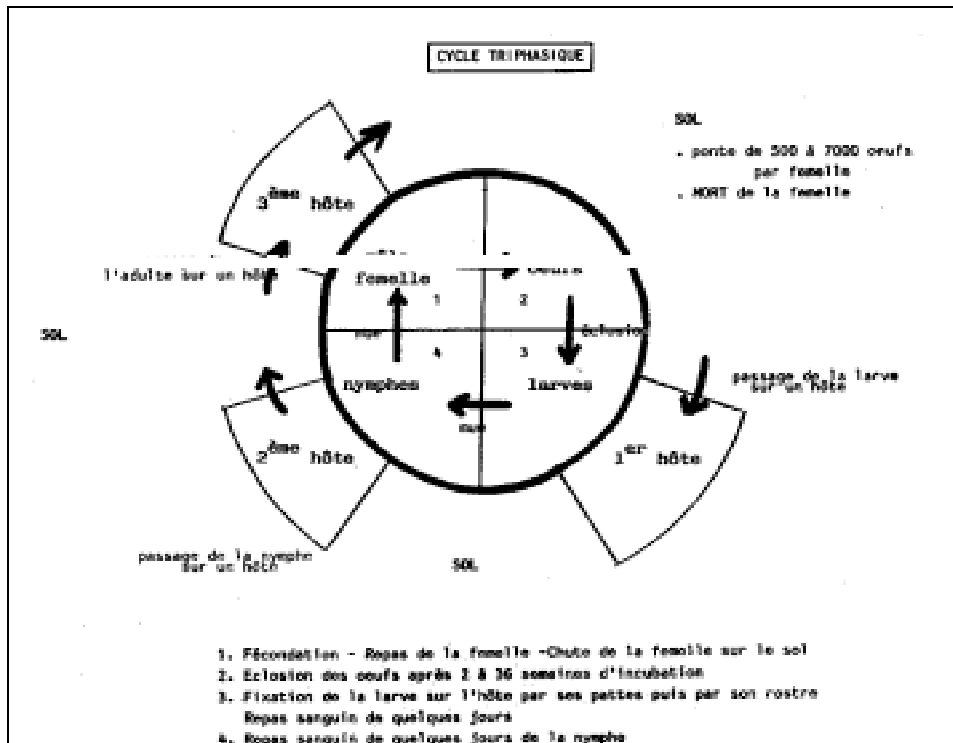


Figure 8 : Cycle de développement de *Rhipicephalus sanguineus* (28)

Le cycle de développement est long d'une durée totale de quelques mois à 4 ans, mais les périodes de vie parasitaire sont relativement brèves.

La tique est strictement hématophage à tous les stades. Son parasitisme est intermittent : elle passe plus de temps dans l'environnement extérieur que sur son hôte. Le cycle s'adapte donc aux facteurs extrinsèques, tels que l'humidité et la température (hygrométrie de 50 à 70 % nécessaire pour la survie des œufs et des larves ; une diapause s'installe si la température est trop basse). En Europe tempérée, l'activité principale se situe au printemps et à l'automne (93).

2.1.4 Hôtes

Aux Etats-Unis, on trouve *R. sanguineus* essentiellement sur les chiens, voire sur d'autres espèces quand elles sont en contact avec ces derniers (chats) (143). Ailleurs, on la trouve sur les moyens et gros mammifères et certains oiseaux (16) : les formes immatures vivent sur les rongeurs, les adultes sur les ongulés et les carnivores. On retrouve tous les stades sur le chien. Cette adaptation de *R. sanguineus* est unique chez les *Ixodidés*. En effet, à l'origine tique des herbivores des régions sub-désertiques, une souche s'est adaptée de nos jours au chien et est devenue monotrope, domestique et cosmopolite.

La forte spécificité d'hôte de cette tique *R. sanguineus* est à opposer à celle, très faible, d'autres espèces de tiques comme *Ixodes ricinus*.

Il s'agit de la deuxième espèce de tique la plus rencontrée chez le chien, après *Dermacentor reticulatus*.

La recherche de l'hôte par *R. sanguineus* est dite « passive » : la tique est « en embuscade » sur certains sites et se fixe sur l'hôte qui « s'accroche » à des récepteurs. Cette « stratégie » est à opposer à celle des tiques du genre *Amblyomma* qui « attaquent » de façon active (110).

La recherche de l'hôte s'effectue par l'utilisation de l'ensemble des organes sensoriels périphériques des tiques et leurs chémo-, mécano-, photo-, ou thermo-récepteurs comme le rappelle PAROLA (110). Les tiques sont très sensibles à des stimuli indiquant la présence d'hôtes potentiels, comme le CO₂, le NH₃, les phénols, les aromates, les vibrations et la température corporelle des animaux à sang chaud, les odeurs mais aussi les sons. En effet, les stimuli sonores émis par les chiens semblent efficaces pour attirer *R. sanguineus*.

2.1.5 Répartition géographique (16)

R. sanguineus est l'espèce de tique la plus répandue dans le monde ; elle est présente entre le 50° de latitude Nord et le 35° de latitude Sud.

Elle vit sur tous les continents : Etats-Unis, Asie du Sud-est, Afrique et Europe, hormis peut-être l'Australie. Secondairement, on la trouve en zones tropicales et tempérées dans les habitations du Bassin Méditerranéen et de l'Europe tempérée (Cf. Figure 9).

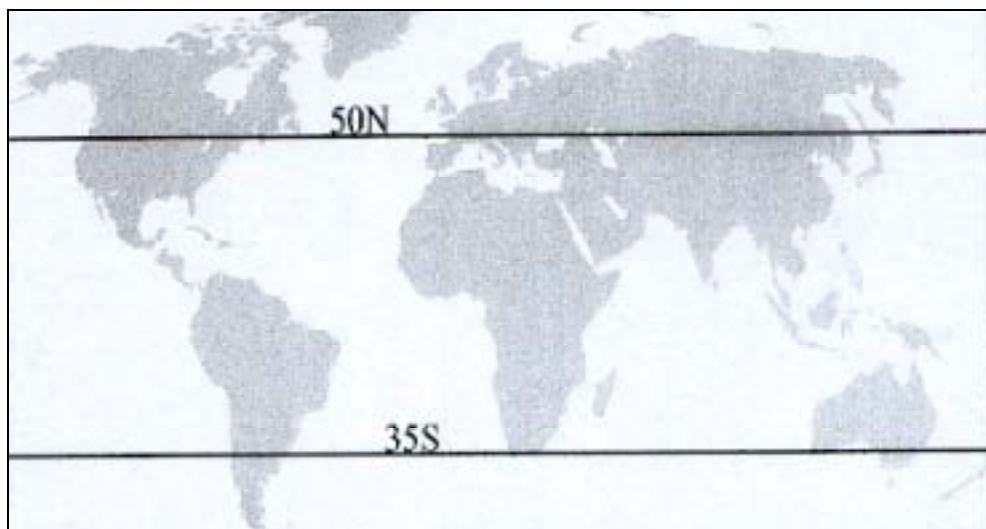


Figure 9 : Répartition géographique de *Rhipicephalus sanguineus*

Endo-exophile, elle parasite en effet chenils et maisons des pays tempérés (aux abords des niches et des zones de forte concentration canine). Les chenils militaires sont donc tout particulièrement exposés à l'infestation par les Rhipicéphales et aux maladies transmises par ces tiques. C'est le cas surtout dans le Sud-Est méditerranéen français et en Afrique, comme nous l'a confirmé l'étude sérologique que nous avons menés en 1999 (Stage personnel) à l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (Marseille) portant sur 28 chiens militaires (13 positifs vis-à-vis d'*E. canis*) provenant de Djibouti, du Sénégal et de la Côte d'Ivoire, ainsi que les enquêtes épidémiologiques menées par DAVOUST *et al.* (14,37,38,42,43).

2.1.6 Contamination de la tique par *E. canis*

Elle se fait au stade larvaire ou nymphal, au cours d'un repas sanguin sur le chien en phase aiguë d'ehrlichiose (71). Il n'y a pas encore de certitude concernant le délai d'implantation nécessaire de la tique pour s'infecter au cours de son repas.

La fixation de la tique a lieu généralement sur une zone à peau fine (oreilles, ars, fanon, mamelle, périnée). Une étude belge récente (2001) sur la distribution des tiques sur l'animal montre une grande majorité de fixation sur la tête, les oreilles et le cou (97). Les espèces brévirostre se retrouvent plus fréquemment sur ou dans le pavillon auriculaire, les marges de l'anus ou sous la queue. La fixation s'effectue en deux temps, un temps mécanique de pénétration et un temps sécrétoire de véritable fixation (28) :

- la tique enfonce ces chélicères,

- puis sécrète une salive qui digère les tissus pour permettre l'introduction de l'hypostome. La fixation est solide car une salive particulière se solidifie sous forme de manchon en lamelles concentriques autour de l'hypostome : le ciment. Le ciment assure aussi une protection contre les réactions inflammatoires de l'hôte. En effet des facteurs anti-inflammatoires et immunomodulateurs sont sécrétés dans le derme de l'hôte, ils empêchent le rejet immunitaire de la tique et crée un milieu favorable au déroulement du repas sanguin et donc de la transmission de l'agent infectieux (63).

En effet BOWMAN *et al.* évoquaient en 1997 la composition de la salive des tiques (17) :

- substances bloquant l'hémostase à plusieurs niveaux par inhibition de l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire, notamment par action d'une apyrase et de prostaglandines, de la coagulation à des stades variables des voies intrinsèque ou extrinsèque selon les espèces de tiques, avec comme effet le plus fréquent une activité anti-facteur X ou anti-thrombine, de la vasoconstriction par l'action notamment de prostaglandines ;
- substances immunosuppressives agissant sur le complément, la production d'anticorps, la production de cytokines et la réponse lymphocytaire T ;
- substances à action spécifique comme un antagoniste de l'histamine chez *R. sanguineus* ;
- nombreuses protéines et enzymes digérant les tissus ;
- substances à effet anesthésique rendant la piqûre des *Ixodidae* indolore.

2.1.7 Transmission d'*E. canis*

2.1.7.1 Transmission naturelle

E. canis se développe dans les cellules des glandes salivaires, des hémocytes, des tubes de Malpighi et de l'intestin moyen de la tique. L'intestin moyen étant conservé au cours des mues successives de *R. sanguineus*, la bactérie persiste. En effet, hormis les mâles, chaque tique ne prenant qu'un seul repas sanguin et la transmission transovarienne, en ce qui concerne *E. canis*, n'existant pas chez *R. sanguineus*, la transmission ne peut être que transtadiale (d'une tique immature aux stades suivants) (39). On ne peut dès lors pas parler de réservoir au sens strict mais bien d'agent vecteur.

Le rôle pathogène indirect de la tique est fondamental dans la transmission : le passage de l'infection d'un chien à un autre est directement tributaire de la présence du vecteur. C'est à la fin

du gorgement rapide que les germes pathogènes sont inoculés lors du repas sanguin : au moment où les régurgitations de sécrétions salivaires sont importantes.

Lors d'infections expérimentales, il a été démontré qu'il était nécessaire à la nymphe infectée de prendre un repas même partiel pour pouvoir transmettre les *Ehrlichia* à un chien sain (123). En effet, l'injection à un chien de tissu de nymphes infectées et à jeûn, ne permet pas de transmettre la maladie, alors que la même manipulation avec une nymphe gorgée de sang aboutit à l'infection du chien.

Il est également certain qu'après la mue de *Rhipicephalus*, le niveau d'infection décline si la tique jeûne, car l'ingestion de sang semble stimuler la multiplication du microorganisme. Les *Ehrlichia* sont sans doute en nombre insuffisant pour entraîner l'infection sans cette stimulation.

2.1.8 Rhipicephalus sanguineus vectrice d'autres maladies

Outre son rôle de vecteur de l'ehrlichiose canine, *R. sanguineus* transmet aussi aux carnivores domestiques la babésiose, l'hépatozoonose (infection d'un nouvel animal par ingestion de la tique), l'hémobartonellose ainsi que l'helminthose à *Dipetalonema grassii* (28).; à l'homme des maladies telles que la Fièvre boutonneuse méditerranéenne à *Rickettsia conorii*, la Fièvre pourprée des montagnes rocheuses à *Rickettsia rickettsii*, le typhus à tique d'Inde « Indian tick typhus *Rickettsia* », la Fièvre boutonneuse d'Israël à *Rickettsia conorii* Israël ou la Fièvre Q à *Coxiella burnetii* (110).

2.2 Espèces sensibles à *Ehrlichia canis*

Les espèces sensibles à *E. canis* sont les Canidés domestiques et sauvages : chiens, chacals (non symptomatiques), loups et coyottes.

Les tentatives d'infection expérimentales de souris, rats, hamsters, lapins, moutons, bovins et chats sont restées vaines.

Il n'existe pas de variation de sensibilité interr raciale à proprement parler. Certaines races pures sont plus souvent citées comme le Berger belge ou le Berger allemand. Mais leur sensibilité supérieure apparente relève plus de la gravité de la forme clinique que du taux d'infection. La prédisposition du Berger allemand aux formes graves (à fort degré d'anémie) serait due à un déficit de l'immunité à médiation cellulaire dans cette race (107).

Les facteurs sexe et âge des individus ne semblent pas influencer de manière significative. Par contre, il existe des facteurs individuels prédisposants tels les infections concomitantes et le stress qui peuvent être immunodéprimants. Les cas chroniques peuvent alors évoluer et des symptômes aigus apparaître. L'infection devient alors maladie.

2.3 Réservoirs

Les réservoirs du parasite sont probablement les canidés sauvages ; un doute persiste sur les chiens porteurs chroniques d'*E. canis* et la tique vectrice elle-même.

- Les canidés sauvages les plus nombreux aux Etats-Unis sont les renards roux et argentés. Le renard roux est omniprésent en Floride et au Texas, deux états des Etats-Unis où *R. sanguineus* est aussi présent et où l'ehrlichiose est endémique.

En 1973, AMYX et HUXSOLL montrent que l'infection expérimentale de ces deux genres est possible, les renards développant une forme atténuée d'ehrlichiose. Il est donc logique de penser que les renards sont des réservoirs (4).

- Le rôle des chiens infectés chroniques est lui discuté. En effet en dehors de la phase aiguë de la maladie, le nombre de bactéries circulant dans le sang périphérique est faible. Le chien serait alors une impasse évolutive (8). Cependant, certains auteurs considèrent les chiens porteurs chroniques asymptomatiques comme des réservoirs et des sources de contagion dans la mesure où ils peuvent présenter des phases de rechute (36,45).

- La tique *R. sanguineus*, malgré l'absence de transmission transovarienne du microorganisme constitue un éventuel réservoir plausible : en effet les adultes à jeûn peuvent survivre 158 à 568 jours, avec un pouvoir contaminant de 150 jours environ ; les répartitions géographiques de la tique et d'*E. canis* se superposent ; de plus *R. sanguineus* présente une certaine résistance aux acaricides qui assure sa persistance (93).

2.4 Répartition géographique

La répartition géographique de l'ehrlichiose canine est mondiale, calquée sur celle de son vecteur entre le 50° de latitude Nord et le 35° de latitude Sud (Cf. Figure 10).



Figure 10 : Répartition géographique de l'ehrlichiose canine (8)

La maladie sévit dans les pays du pourtour méditerranéen, au Moyen-Orient, en Afrique, en Asie et sur le continent américain.

En France, on la décrit surtout autour de la Méditerranée, dans la vallée du Rhône et la région Sud-Ouest, mais aussi dans des zones à climat plus tempéré telles que la région Lyonnaise, le Massif Central et le Bassin Parisien (39).

En Europe, on la rencontre notamment en Espagne, en Italie, en Grèce et en Turquie.

Récemment, une nouvelle souche d'*E. canis* a été isolée en Israël (90) et une étude a permis de prouver la présence de la bactérie en Chine (82).

Sévissant de manière enzootique dans les régions où elle est bien établie, l'ehrlichiose canine peut revêtir un aspect épizootique lorsqu'elle est introduite en milieu indemne.

2.5 Distribution saisonnière

Dans les pays tempérés, le pic des cas cliniques est décrit pendant la saison chaude de la fin du printemps au début de l'automne, période pendant laquelle l'activité du vecteur est maximale (39). Des cas d'ehrlichiose peuvent aussi être décrits en dehors de cette saison, puisque la maladie évolue en trois temps (Cf. ci-après) : la durée de la phase subclinique, tout à fait aléatoire, peut retarder l'expression de la troisième phase clinique à un moment quelconque de l'année.

3. PATHOGENIE et IMMUNITE

3.1 Pathogénie

3.1.1 Phase aiguë

Après une incubation de 8 à 20 jours apparaît une phase aiguë qui dure de 2 à 4 semaines.

Les lésions occasionnées par les *Ehrlichia* sont tout à fait différentes de celles rencontrées lors d'infection par d'autres rickettsies :

On ne retrouve pas chez les individus infectés par *E. canis* les signes caractéristiques, telles la thrombose, la vascularite ou l'hypertrophie des cellules endothéliales, des infections par les rickettsies.

- Les caractéristiques de l'infection par *E. canis* semble plutôt être l'envahissement des tissus pulmonaires, méningiaux, hépatiques, rénaux et spléniques par des plasmocytes (48). En effet, l'agent pathogène se multiplie dans les cellu

immun induit par l'infection. Les anticorps anti-*Ehrlichia* seraient des anticorps bloquants protégeant le microorganisme de sa destruction par le système immunitaire (1).

3.1.2 Phases subclinique et chronique

La phase subclinique est caractérisée par la persistance de l'agent pathogène et par une réponse immunitaire insuffisante pour l'éliminer. En l'absence de signes cliniques, les signes hématologiques persistent, mais ils sont souvent subnormaux (44,46,129). Cette phase dure de 1 à 2 mois dans les conditions expérimentales à plus de 5 ans dans les conditions naturelles (34).

Elle peut ensuite évoluer vers une phase chronique bénigne ou grave, en fonction de l'état immunitaire du chien.

Dans les cas les plus graves, une aplasie médullaire est observée, responsable d'anémies, de leucopénies (à l'origine notamment de surinfection) et de thrombopénie (à l'origine d'une diathèse hémorragique parfois fatale en moins de 24 heures) (26).

Au cours de la phase chronique, on trouve beaucoup moins de morula dans le sang et les autres organes que durant la phase aiguë .

La pathogénie de la phase aiguë est donc fondamentalement différente de celles des phases subclinique et chronique : l'étude de la thrombopénie en est l'exemple, avec des mécanismes essentiellement périphériques (destruction à médiations cellulaire et humorale, inhibition des fonctions plaquettaires) en phase aiguë s'opposant aux mécanismes centraux (hypo ou aplasie médullaire) de la phase chronique grave (87).

Cette dualité de la pathogénie a, bien sûr, des répercussions sur le pronostic et le traitement de l'ehrlichiose.

3.2 Immunité

3.2.1 Immunité à médiation humorale

D'un point de vue de la cinétique chez les chiens infectés expérimentalement, les immunoglobulines A (IgA) et M (IgM) apparaissent dès le 7^{ème} jour après l'infection, suivies par les immunoglobulines G (IgG) à partir du 10^{ème} jour dont la quantité est maximale vers le 80^{ème} jour (38,40,48).

Chez le chien sain, les valeurs usuelles sont les suivantes : IgA = 0,29g/L, IgG = 6,8 g/L et IgM = 0,8 g/L. En cas d'ehrlichiose, on trouve des quantités d'IgG supérieures à la normale (11+/- 3g/L). La quantité d'anticorps chute brutalement juste avant la mort. Les anticorps des chiens traités diminuent et disparaissent 6 à 12 mois après la guérison (25).

Il s'agit d'anticorps témoins de l'infection qui n'assurent pas de fonctions protectrices, comme l'atteste la sensibilité à la réinfection de chiens séropositifs (48 et travaux originaux Deuxième partie 2.4.2). Les anticorps produits ne procurent en effet aucune protection aux cellules non encore infectées. Ils pourraient même favoriser la multiplication de l'agent chez l'hôte en participant à l'inhibition de la fusion phagolysosomiale (77).

C'est pour cette raison que des chiens possédant un titre en anticorps très élevé (1/5120) peuvent mourir subitement.

Toutefois, *in vitro*, il a été démontré qu'un sérum immun inhibe la croissance d'*Ehrlichia canis* dans des macrophages canins (95). De la même façon, des macrophages immuns (issus de chiens infectés) résistent d'avantage à la multiplication du microorganisme (96). Il existe donc à priori une synergie protectrice entre les anticorps spécifiques et les macrophages immuns.

Si l'immunité humorale n'est pas stable, ni efficace, l'on sait par contre que la composante cellulaire du mécanisme de protection vis-à-vis d'*E. canis* est essentielle (77).

3.2.2 Immunité à médiation cellulaire

Une étude de la cytotoxicité d'*E. canis* sur les monocytes infectés révèle que celle-ci est maximale à l'acmé de la maladie (en phase aiguë, lorsque la thrombopénie est maximale), puis elle diminue progressivement (88). Les travaux de KAKOMA en 1977, montrent un changement dans le phénomène de reconnaissance du soi par les lymphocytes ou les monocytes. Il est probable que la présence de la bactérie dans les monocytes les empêche d'être reconnus par les lymphocytes autologues, peut-être en modifiant les antigènes de surface, provoquant ainsi la non-reconnaissance de ces cellules mononucléées comme appartenant au soi et donc permettant leur élimination spécifique.

Il faut remarquer que l'on retrouve pour l'ehrlichiose canine, le même type de réponse immunitaire que pour la leishmaniose (anticorps non ou peu protecteurs, réponse à médiation cellulaire importante, intervention des interférons Gamma et des facteurs activant les macrophages).

4. CLINIQUE

L'infection par *E. canis* est à l'origine d'une large variété d'anomalies cliniques, biochimiques et hématologiques en fonction de la souche bactérienne, de la race du chien, de son état immunitaire et de la coexistence d'infections intercurrentes telles que la babésiose, l'hémobartonellose ou l'hépatozoonose.

Cliniquement, il est souvent difficile de distinguer les différentes phases de la maladie, phases décrites par VAN HEERDEN en 1982 (129).

4.1 Symptômes (39)

4.1.1 Phase aiguë

Cette phase clinique est identique quelle que soit la race du chien. Elle ne dure pas plus d'un mois.

Après une durée moyenne de 14 jours d'incubation (8 à 20 jours), la phase aiguë de l'ehrlichiose canine, souvent bénigne ou inapparente, peut toutefois se caractériser par des symptômes rencontrés de façon régulière :

- l'hyperthermie brutale (39,5° à 41,5° C)
- l'anorexie
- la perte de poids
- l'asthénie.

Il est à noter que ce sont des symptômes peu spécifiques.

La fièvre apparaît en général dès le 10^{ème} jour, elle peut être le seul symptôme apparent et osciller pendant les 60 jours qui suivent entre 38,5 et 40,5°C environ.

D'autres signes apparaissent moins fréquemment : le jetage oculo-nasal, les pétéchies sur les muqueuses, les ecchymoses (abdominales surtout), l'épistaxis et l'hématurie (liés à la thrombopénie). On peut aussi observer des oedèmes des membres et du scrotum (liés à l'hypoalbuminémie), une splénomégalie, une adénopathie, de la diarrhée, des vomissements, une

polyarthrite, des troubles nerveux (ataxie, hyperesthésie), des signes pulmonaires (dyspnée par pneumonie interstitielle), et de l'insuffisance hépato-rénale (syndrome urémique) (33,92,129) (Cf. Figure 11).



épistaxis lors d'une ehrlichiose aiguë



purpura lors d'une ehrlichiose chronique

(clichés B. DAVOUST)



hémorragie sclérale lors d'une ehrlichiose aiguë



hémorragies pétéchiiales de la muqueuse

(clichés S. SHAW (122))

Figure 11 : Quelques manifestations cliniques de l'ehrlichiose monocyttaire canine à *E. canis*

4.1.2 Phase subclinique

Après la phase aiguë et même en l'absence de traitement, les symptômes peuvent s'atténuer, l'animal reprend du poids : c'est le début de la forme subclinique, qui dure de 2 à 3 mois. Celle-ci peut évoluer de deux manières :

- si les défenses immunitaires du chien sont suffisantes, l'affection aboutit à une forme chronique asymptomatique qui peut durer toute la vie du chien. L'animal est alors porteur sain sans signes cliniques, ni modifications biochimiques. En effet, il se crée un équilibre entre la bactérie et l'hôte.
- en revanche, en cas d'immunodépression, le chien s'amaigrit et les signes cliniques de l'ehrlichiose aiguë apparaissent amplifiés : épistaxis, jetage oculo-nasal, perte de poids. Il s'agit d'une évolution de la phase aiguë plus que d'une phase subclinique.

Une atteinte oculaire évoluant vers la cécité peut se manifester par l'apparition d'hémorragies rétiniennes avec décollement de la rétine, d'une uvéite, d'un hyphéma et d'une opacité cornéenne. Les formes les plus sévères sont caractérisées par des hémorragies sur de nombreux organes. Cela se traduit par des pétéchies, des ecchymoses, des hématomes, du méléna, de l'hématémèse. Des complications microbiennes peuvent s'installer et la mort de l'animal survient rapidement .

Cette rupture de l'état d'équilibre entre la bactérie et l'hôte entraîne la mise en place de la dernière phase de la maladie (39).

4.1.3 Phase chronique

Cette phase apparaît 2 à 4 mois après l' inoculation. Elle peut être bénigne ou grave comme chez le Berger allemand chez lequel l'aplasie médullaire permet de parler de pancytopenie tropicale canine (107).

La phase chronique grave du Berger allemand peut se caractériser par un ou plusieurs des symptômes de complication décrits ponctuellement dans les deux phases précédentes : oedèmes, signes d'anémie, hémorragies ... L'épistaxis ne se rencontre que dans 1 cas sur 5 en moyenne et toujours en phase terminale (9) (Cf. Tableau II).

Dans sa phase chronique, l'ehrlichiose présente en fait les caractéristiques d'une maladie auto-immune. On peut déceler des anticorps antinucléaires et antiplaquettes (77). De plus des cas de glomérulo-néphrite ont été décrits.

Certains chiens sont asymptomatiques, mais porteurs d'*E. canis*, pendant plusieurs années. La quantité de bactéries dans le sang circulant est infime, les microorganismes étant quiescents dans les macrophages protégés de toute réaction de l'hôte. Toutefois cette source potentielle d'agents pathogènes n'est pas négligeable, car on la soupçonne encore de constituer un éventuel réservoir.

Tableau II : Symptômes décrits dans l'ehrlichiose canine (8, 9)

TEGUMENT Pétéchies, présence de tiques
ŒIL Conjonctivite avec jetage oculaire ; hémorragies conjonctivales Opacités et/ou œdème de la cornée, uvéite antérieure, hyphéma, photophobie Anomalies du fond d'œil : vaisseaux rétinien tortueux : engorgement vasculaire, taches, hémorragie rétinienne pouvant aller jusqu'au décollement de la rétine, hyperreflexivité
SYSTEME NERVEUX Dos voussé, douleur du rachis, paraparésie uni ou bilatérale, déficit de nerf(s) crânien(s), convulsions, atteinte vestibulaire avec ataxie
APPAREIL CARDIOVASCULAIRE Tachycardie (due au choc anémique), arythmies (dues à des hémorragies dans le myocarde), Souffle cardiaque
APPAREIL RESPIRATOIRE Jetage nasal, épistaxis Difficultés respiratoires, râles, toux, cyanose, dus à une atteinte interstitielle du poumon
APPAREIL DIGESTIF Pâleur des muqueuses buccales, pétéchies Anorexie, vomissements Diarrhée, méléna Ictère et hépatomégalie
APPAREIL URINAIRE Hématurie macroscopique ou microscopique Insuffisance rénale en fin d'évolution avec glomérulo-néphrite : polyuro-polydipsie, anorexie, vomissements, ulcérations buccales
APPAREIL REPRODUCTEUR Pétéchies sur muqueuse génitales, œdème du scrotum Saignements prolongés pendant l'œstrus et après la mise bas, infertilité, avortements, mortinatalité, (Effet tératogène du traitement par la doxycycline)
MUSCLES ET SQUELETTE Boiteries pouvant aller jusqu'à des difficultés à marcher ou à rester debout : dues à des arthrites, des douleurs articulaires ou à des hémorragies intra-articulaires Fonte musculaire, faiblesse musculaire, polymyosite, œdème des membres en phase terminale des formes chroniques Hyperalgies (membre, mâchoire ...)
SYSTEME LYMPHATIQUE Adénomégalie, splénomégalie

4.2 Modifications biochimiques et immunologiques (9,39,92)

Les anomalies biochimiques et immunologiques les plus fréquemment rencontrées sont :

- l'hypoalbuminémie
- l'hyperglobulinémie (le ratio A/G est bas)
- l'hyperprotidémie (80-122g/L)
- l'augmentation des phosphatases alcalines (PAL) et des transaminases (ALAT, ASAT)
- l'augmentation de la bilirubinémie (0,9-5,4 mg/dL), de l'azotémie et de la phosphatémie
- la protéinurie dans 40% des cas et la densité urinaire < 1,020
- le test de Coombs positif dans 30% des cas

4.2.1 Hypoalbuminémie

Les causes d'hypoalbuminémie chez le chien sont multiples : malnutrition protéique, néphropathie, perte sanguine importante, maladie hépatique voire pertes périphériques suite à des oedèmes dues

à la vascularite. L'hypoalbuminémie est mise en évidence par électrophorèse des protéines (8). Dans le cadre de l'ehrlichiose, le rapport Protéines/Créatinine est augmenté (= 8,6) pendant les 3^{ème} et 4^{ème} semaines et chute de 0,5 dès la 6^{ème} semaine de la maladie. De même l'albumine sérique chute (21g/L) vers la 4^{ème} semaine pour remonter vers 30 g/L dès la 11^{ème} semaine. Il existe donc un rapport inversement proportionnel entre Protéines/Créatinine et l'albuminémie : il y a fuite dans les urines. Cette hypoalbuminémie est donc d'origine rénale et non hépatique, due à des lésions de glomérulonéphrite membranaire ou de néphrite interstitielle.

4.2.2 Hyperprotidémie

L'hyperprotidémie s'explique par l'augmentation des globulines. Mais cette hyperglobulinémie suggère une réponse immune exagérée, sans efficacité, car il n'y pas de correspondance entre le taux de globulines sériques et les anticorps spécifiques. A l'élévation des globulines α_2 en pic pendant la phase aiguë succède en effet une hyperglobulinémie (fractions β et surtout γ) qui se développe parallèlement à une baisse de l'albumine, au fur et à mesure de l'évolution de la maladie vers les phases subclinique et chronique (27) (Cf. Figure 12). L'augmentation des globulines β et γ peut aussi apparaître d'emblée pendant la phase aiguë (46). Plusieurs publications font état de gammopathies monoclonales à IgG (18). L'électrophorèse est intéressante dans le suivi d'un chien ehrlichien : après élimination de l'agent causal, l'hypergammaglobulinémie semble disparaître plus rapidement que les anticorps détectés par immunofluorescence indirecte, ces derniers pouvant persister jusqu'à dix-huit mois après guérison (8).

Les valeurs d'hyperprotidémie peuvent être très élevées (comme dans le cas d'une leishmaniose).

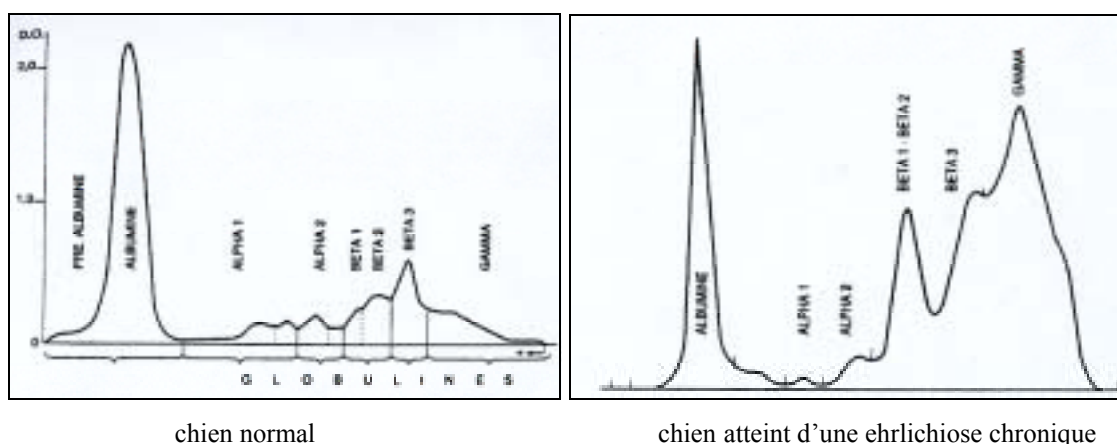


Figure 12 : Electrophorèse des protéines d'un chien ehrlichien par comparaison à un chien sain (8)

4.2.3. Autres modifications biochimiques et immunologiques

La bilirubinémie, elle, se rencontre dans les cas d'hémolyse mais, dans le cadre de l'ehrlichiose, n'est pas toujours associée à une anémie importante ou une augmentation marquée des enzymes hépatiques.

L'élévation des enzymes hépatiques (PAL, ALAT) est transitoire et due à une lésion hépatique de faible gravité : nécrose d'hépatocytes suite à une ischémie relative. Elle indique en fait que l'infection aiguë est à l'origine d'une atteinte hépatique inflammatoire.

Des études montrent une augmentation des taux sériques d'urée, créatinine et phosphore. L'élévation de l'azotémie est classée comme d'origine prérénale (92).

Le test de Coombs est positif dans un tiers des cas d'ehrlichiose environ (70,89). Le test est positif lorsqu'un processus pathologique provoque l'adhésion d'anticorps sur les membranes des globules rouges et provoque ainsi leur destruction. On parle alors d'anémie hémolytique primaire ou secondaire :

- primaire lorsque les anticorps sont spécifiques des hématies : ce sont de véritables anémies hémolytiques autoimmunes ;
- secondaire lorsque ce sont des facteurs infectieux, néoplasiques, inflammatoires, parasitaires ou pharmacologiques qui engendrent cette production exacerbée d'anticorps, non spécifiques des globules rouges.

Dans les cas d'ehrlichiose canine, il s'agit d'une anémie hémolytique secondaire.

4.3 Modifications hématologiques (42,44,46,92)

Les hémogrammes de chiens atteints d'ehrlichiose présentent tous des anomalies :

- la thrombopénie (définie par une thrombocytemie inférieure à 200.10^9 plaquettes/L) est fréquemment observée (moyenne de 50.10^9 plaquettes/L) ;
- une anémie (définie par un taux en hémoglobine inférieur à 12g/L) n'est pas systématique ;
- la numération leucocytaire est très souvent anormale, avec une leucopénie suivie d'une leucocytose.

4.3.1 Thrombopénie

La thrombopénie est le signe hématologique le plus fréquemment rencontré dans l'ehrlichiose. Selon différentes études statistiques, elle est retrouvée dans 70 à 100% des cas d'ehrlichiose aiguë (46,129).

Dans une étude menée par DAVOUST *et al.* en 1989 sur 50 chiens militaires sur lesquels ont été pratiqués un comptage plaquettaire et une électrophorèse des protéines, 85% d'entre eux ont une thrombocytémie $< 200.10^9/L$ et 57% présentent $< 150.10^9$ plaquettes/L, toutes phases cliniques confondues (4').

Lorsque cette thrombopénie est très marquée ($< 10.10^9/L$), on ne trouve pratiquement pas une plaquette sur le frottis sanguin, et les rares que l'on peut observer sont souvent de grande taille (13).

La valeur prédictive positive d'une thrombopénie par rapport à la méthode de référence (immunofluorescence indirecte) est de 75% et sa valeur prédictive négative est de 94%. Ce qui signifie que la numération plaquettaire est une méthode diagnostique de l'ehrlichiose possédant une sensibilité de 85,7% et une spécificité de 88,8%. Elle permet donc d'effectuer un diagnostic d'orientation rapide. Cette perturbation hématologique n'est certes pas pathognomonique de l'ehrlichiose, mais, dans un contexte épidémiologique évocateur, elle reste un critère diagnostique de bonne qualité (46).

- Les plaquettes sont produites par les mégacaryocytes de la moelle osseuse, leur vie moyenne variant de 5 à 7 jours. Le renouvellement physiologique quotidien avoisine 15% du pool. Toute atteinte des mégacaryocytes se répercute donc rapidement sur la quantité circulante. Ce type de thrombopénie d'origine centrale, est décrit lors d'ehrlichiose chronique (25). Dans ce cas, le défaut de production est corrélé à une hypocellularité de la moelle (aplasie mégacaryocytaire marquée entre autre).

- Lors d'ehrlichiose aiguë, l'hypocellularité de la moelle n'est pas notée car le mécanisme de la thrombopénie est d'origine périphérique. Le processus étiologique est alors lié à une séquestration splénique, accroissement de la consommation et de la destruction des plaquettes circulantes (Cf. Première Partie 3.1.1).

4.3.2 Anémie

L'anémie rencontrée dans l'ehrlichiose est qualifiée de normocytaire et normochrome. Le plus souvent, celle-ci est arégénérative, affirmée par le myélogramme qui démontre une aplasie médullaire. Parfois, à la suite d'une hémolyse ou de saignements pendant la phase aiguë, l'anémie est régénérative (régénération marquée dans 20% des cas) : on note alors sur le frottis une polychromatophilie, une anisocytose des hématies, et la présence d'érythroblastes (la moelle osseuse est encore hypercellulaire) (12).

- Pendant la phase aiguë, l'anémie est rencontrée dans le cadre de la pancytopenie, semblable à toutes les infections bactériennes ou virales dont la résultante est une destruction cellulaire. L'anémie régénérative hémolytique de la phase aiguë peut être mise en évidence par l'hémoglobinurie qui signe une hémolyse intravasculaire (46).

Plusieurs étiologies sont avancées pour l'anémie ehrlichienne : l'hémolyse peut en effet être due à une destruction des globules rouges par la bactérie, ou à une réaction immunologique secondaire : la positivité du test de Coombs direct (rapportée dans 30% des cas d'ehrlichiose par plusieurs auteurs) permet de supposer une anémie hémolytique à médiation immune : les anticorps anti-*E. canis* se fixeraient sur les globules rouges et faciliteraient leur destruction par les cellules effectrices de l'immunité (133).

Chez certains chiens, l'anémie apparaît microcytaire et normochrome, suggérant une carence en fer probablement consécutive aux pertes sanguines chroniques (92).

- Dans sa phase chronique, l'absence de régénération s'explique par l'aplasie médullaire rencontrée dans la pancytopenie tropicale canine. La pancytopenie est causée par une déplétion importante des cellules souches hématopoïétiques et par une évolution néfaste du micro-environnement vasculaire de la moelle osseuse. La pathogénie de l'aplasie médullaire est essentiellement d'origine immunitaire (Cf. Première Partie 3.1.2).

Dans certains cas d'ehrlichiose chronique, l'anémie est retrouvée avec une moelle normo ou hypercellulaire ; dans ces cas, la cytopénie pourrait être due à une dysmyélopoïèse consécutive à une carence en folates et vitamine B12 (ce déficit serait lié à une hyperconsommation au niveau médullaire pendant la phase subclinique de la maladie) ; l'anémie est alors macrocytaire (30).

4.3.3 Numération leucocytaire anormale

Le suivi de cas cliniques par DAVOUST *et al.* en 1996, a permis de montrer que lors d'ehrlichiose aiguë, il y a apparition d'une leucopénie suivie parfois d'une leucocytose (44,46).

- L'origine de la leucopénie n'est pas connue. Etant parallèle de la thrombopénie, elle peut être d'origine immunologique ou due à une redistribution des leucocytes dans le système vasculaire (44). La leucopénie de la forme aiguë est transitoire, et moins fréquente que la thrombopénie et l'anémie. Elle est bien plus marquée dans la phase chronique, où elle prend alors une valeur pronostique : il semble que la mortalité soit importante lorsque les leucocytes sont $< 2000/\text{mL}$.

Une leucopénie, surtout si elle s'accompagne d'une mononucléose (monocytose et/ou lymphocytose) absolue ou relative, semble donc constituer un bon signe d'appel.

Le nombre de leucocytes est inférieur à $6.10^9/\text{L}$ dans 30% des cas (moyenne de plusieurs auteurs) (44).

Cette leucopénie est tout de même assez frappante car elle survient en général chez un animal fébrile, chez qui on s'attendrait à trouver, par exemple, une forte neutrophilie (12).

- La leucocytose, quant à elle, constitue un signe d'inflammation. La numération blanche est supérieure à $17.10^9/\text{L}$ dans 15% des cas (moyenne de plusieurs auteurs) (44).

L'ehrlichiose chronique, par sa stimulation prolongée du système lymphoïde, peut engendrer une pathologie lymphoïde sanguine qui n'est pas sans rappeler une maladie lymphoproliférative maligne. On observe alors une lymphocytose modérée à lymphocytes atypiques (à granulations azurophiles cytoplasmiques probablement dues à une cytotoxicité accrue à médiation cellulaire dirigée contre les cellules mononucléées infectées) (138). Les lymphocytes granulaires sont supposés avoir une activité natural killer, killer et lymphocyte T cytotoxique.

Les études anatomo-pathologiques montrent qu'une plasmocytose périvasculaire se développe principalement dans le foie, mais aussi au niveau des reins, de la rate et des poumons (48,64). D'autres signes d'inflammation comme l'augmentation des alpha 2 globulines, et de la protéine C réactive sont rapportés lors d'ehrlichiose aiguë (118).

5. LÉSIONS

Macroscopiquement, les lésions principales sont une splénomégalie avec une rate décolorée, un foie décoloré de consistance friable, des poumons sombres, une adénite marquée (surtout au niveau des nœuds lymphatiques mésentériques), et des lésions hémorragiques généralisées.

Microscopiquement, il faut noter l'infiltration périvasculaire par des lymphocytes et des plasmocytes dans de nombreux organes.

5.1 Lésions hémorragiques

La plupart des organes (cœur, poumons, tractus digestif et urinaire) et le tissu sous-cutané présentent en effet des pétéchies et des lésions hémorragiques, surtout en phase chronique de la maladie (Cf. Figure 13).

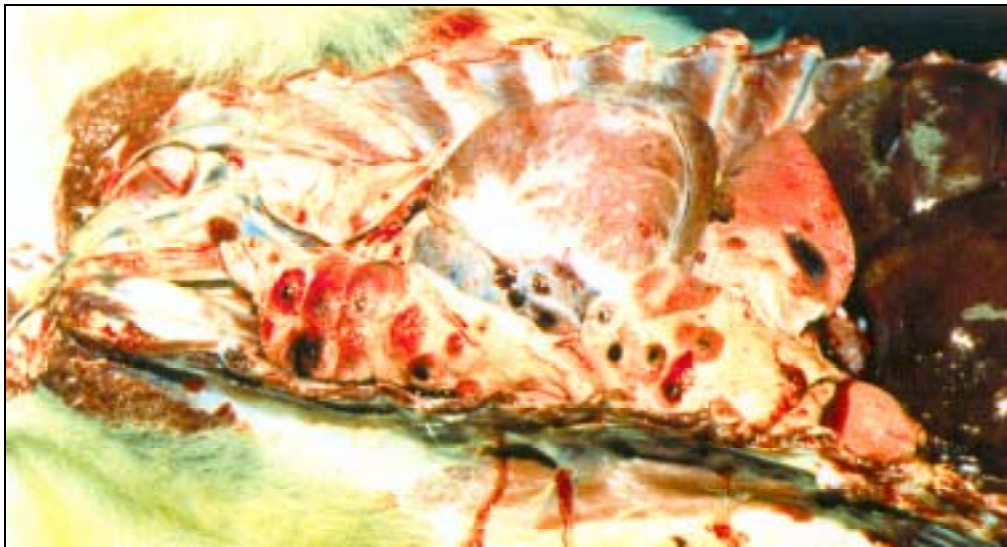


Figure 13 : Lésions hémorragiques d'ehrlichiose canine grave (cliché B. DAVOUST)

5.2 Lésions de plasmocytose (48,116)

Après avoir envahi les cellules mononucléées sanguines et lymphatiques, *E. canis* se localise dans les cellules réticulo-endothéliales du foie, de la rate, des reins et des nœuds lymphatiques. On retrouve également des cellules infectées dans la microvascularisation de nombreux organes, d'où des lésions de vascularite.

5.2.1 Foie

On note une hyperplasie réticulo-endothéliale multifocale : le dépôt de ces cellules dans les sinusoides hépatiques provoque la nécrose ischémique des hépatocytes voisins. La congestion sinusoidale explique l'augmentation brutale du taux sérique de phosphatases alcalines (48). Les analyses anatomo-pathologiques montrent aussi des dépôts d'hemosidérine et l'hyperplasie des cellules de Küpffer.

Ces lésions sont de courte durée (entre 14 et 21 jours) et les modifications biochimiques d'augmentation des enzymes du foie et d'hypoalbuminémie sont donc transitoires.

5.2.2 Rate

On note une prolifération diffuse de cellules réticulo-endothéliales dans la pulpe rouge, avec une augmentation du nombre de phagocytes des follicules lymphoïdes (à J7), et de cellules lymphoréticulaires dans la pulpe blanche, responsable de la splénomégalie rencontrée dans certains cas d'ehrlichiose.

Lors de l'autopsie d'un cas d'ehrlichiose aiguë bénigne étant passé à la chronicité, étudié par DAVOUST *et al.* en 1991, la rate présentait une fibrose majeure périvasculaire et une surcharge pigmentaire très importante en hemosidérine (48). Macroscopiquement, elle apparaît donc hypertrophiée (Cf. travaux originaux Deuxième Partie 2.4)

5.2.3 Reins

Les biopsies rénales révèlent la présence d'un infiltrat lymphoplasmocytaire périveineux et interstitiel, principalement cortical.

Un marquage immunofluorescent met en évidence un dépôt variable d'immunoglobulines G et M dans les glomérules et le mésangiome : il s'agit d'une séquestration passive qui persiste 10 semaines après inoculation.

Durant la phase clinique aiguë, une protéinurie transitoire peut être notée, principalement une albuminurie. La protéinurie coïncide avec la fusion des podocytes glomérulaires. On ne peut pas parler dans ce cas de glomérulonéphrite immunitaire (à complexes immuns), mais de glomérulopathie transitoire.

5.2.4 Vaisseaux

L'infection des cellules endothéliales par les rickettsies provoque généralement une nécrose cellulaire, des phénomènes de thrombose, bien que ceux-ci n'aient pas été démontrés dans le cas de l'ehrlichiose.

5.2.5 Nœuds lymphatiques

L'adénomégalie rencontrée cliniquement, est due à une infiltration par des lymphocytes, des plasmocytes riches en corps de Russel et de corps cristallins plasmatiques, donc à une réponse hypertrophiée du système réticulo-histiocytaire. Dès J12, on observe une activité intense des centres germinaux des follicules avec de nombreuses mitoses et macrophages. Les aires paracorticales sont envahies par de grands lymphocytes.

La lymphadénopathie souvent généralisée affecte préférentiellement les nœuds mésentériques, mais les ganglions palpables tels que les rétropharyngiens et les poplités sont aussi fréquemment touchés (Cf. Deuxième Partie 2.3).

5.2.6 Cerveau

Cette infiltration lymphoplasmocytaire touche également le cerveau, provoquant des cas de méningite.

5.2.7 Poumons

Des lésions pulmonaires peuvent être rapportées à l'origine de radioopacités focales ou diffuses probablement causées par l'hyperplasie septale, la plasmocytose retrouvée aussi dans cet organe, les lésions hémorragiques ou l'agrégation subendothéliale de cellules mononucléées dans les vaisseaux pulmonaires.

→ Bien que non pathognomonique, cette plasmocytose est caractéristique de l'infection à *Ehrlichia*.

5.3 Lésions médullaires

En phase aiguë ou chronique bénigne d'ehrlichiose, la moelle osseuse est normale, voire hypercellulaire avec augmentation des mégacaryocytes et du rapport granulocytes/érythrocytes.

En phase chronique, des aplasies complètes sont possibles, surtout dans la forme grave du Berger allemand avec une anémie, une leucopénie et une thrombopénie franches (26).

L'examen de la moelle osseuse est un bon élément pronostic : une moelle normo ou hypercellulaire signe une ehrlichiose en phase aiguë donc facilement traitable.

5.4 Autres lésions

Des figures d'érythrophagocytose accompagnées d'hémosidérose peuvent être vues dans les coupes de nœuds lymphatiques.

6. DIAGNOSTIC

6.1 Diagnostic épidémiologique

Comme nous l'avons déjà étudié dans le chapitre 2, la maladie peut globalement apparaître en toute saison, dans de nombreux pays du monde, mais particulièrement en Afrique (zone d'endémie) (Cf. Figure 10).

La mise en évidence dans les commémoratifs d'un cas clinique, de facteurs de risques de l'ehrlichiose (géographie, race, statut immunitaire, absence de traitement antiparasitaire externe) permet une orientation diagnostique.

6.2 Diagnostic clinique

Les principaux symptômes, bien que peu spécifiques (Cf. Première Partie chapitre 4.1), peuvent être évocateurs : les signes d'appel sont donc une fièvre isolée d'origine inconnue et d'apparition brutale, avec abattement, anorexie dans la plupart des cas, les manifestations d'une maladie à

complexes immuns quelques fois rapportées (uvéite – polyarthrite – glomérulonéphrite - gammopathie polyclonale).

La vigilance est de rigueur car l'ehrlichiose offre un polymorphisme clinique important, comme le confirme notre étude *in vivo* sur 4 chiens (Cf. travaux originaux Deuxième Partie 2.).

6.3 Diagnostic expérimental

6.3.1 Diagnostic hématologique

6.3.1.1 Bilan sanguin

Il s'agit d'un diagnostic indirect et non spécifique. Un bilan sanguin qui conclut à une pancytopenie, avec leucopénie, anémie normocytaire, normochrome, régénérative et surtout thrombopénie, est un support de suspicion qui doit cependant être complété d'un diagnostic direct (Cf. Première Partie 4.3).

En effet la thrombopénie n'est pas pathognomonique de l'ehrlichiose mais sa mise en évidence dans un contexte épidémiologique évocateur permet de poser un diagnostic de suspicion. Il est renforcé si l'on note une hypoalbuminémie et une hypergammaglobulinémie.

6.3.1.2 Electrophorèse des protéines

L'électrophorèse des protéines constitue donc un examen d'orientation, puisqu'elle met en évidence la chute du taux d'albumine, et l'augmentation de la fraction des gammaglobulines, celle-ci n'étant évidente qu'après plusieurs semaines d'infection avec inversion du rapport albumine/globuline et hyperprotidémie (Cf. Première Partie 4.2.1).

L'électrophorèse est une technique précise et reproductible qui doit être utilisée par le praticien pour affiner son diagnostic. Son principe est simple : un échantillon de sérum est mis en migration électrophorétique pendant 15' à 180 volts et coloré avec un colorant Rouge Ponceau. Après traitement, les bandes sont mesurées par densitométrie. La surface de chaque pic indique le pourcentage d'une fraction protéique déterminée (128).

Toutefois, la seule allure du tracé électrophorétique n'est pas un moyen de diagnostic car des modifications semblables sont rencontrées chez les chiens atteints de leishmaniose, babésiose

chronique, affections dermatologiques, insuffisance rénale chronique. Par contre l'étude de l'électrophorèse des protéines peut-être un bon moyen d'orientation du diagnostic d'une ehrlichiose subclinique (pour des chiens qui présenteraient un taux d'anticorps supérieur à 1/320). Le protidogramme présente aussi un intérêt dans le suivi du chien ehrlichien en traitement, car il se normalise un peu plus rapidement que l'immunofluorescence indirecte (IFI), qui peut mettre des années à se négativer (9).

6.3.2 Diagnostic cytologique

6.3.2.1 Recherche de morula

Cette recherche est intéressante dans les formes aiguës.

En effet, les études de WANER *et al.* en 1996 ont montré que l'antigène n'est retrouvé dans le sang que pendant la phase aiguë de la maladie ; aucun antigène ehrlichien n'est détecté après le 43ème jour post-inoculation, chez les chiens infectés expérimentalement (134).

Les morulas sont présentes durant les 10 premiers jours suivant l'inoculation. C'est donc lors de la première semaine suivant l'apparition des symptômes, alors que la sérologie est généralement encore négative, que la recherche de morulas est fructueuse.

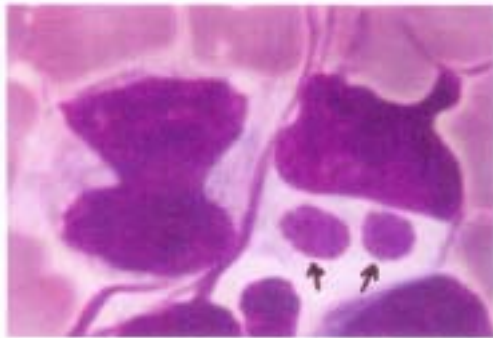
Elles peuvent être mises en évidence sur étalement sanguin, ponction de moelle osseuse ou calque d'organe (poumons notamment) (64).

Une concentration est cependant nécessaire à partir de prélèvement de sang, car sur simple frottis il est rare de pouvoir isoler suffisamment de monocytes pour identifier ces formes. En effet, moins de 1 % des monocytes sont infectés et ces cellules ne représentent à l'état normal que 3 à 10 % des leucocytes.

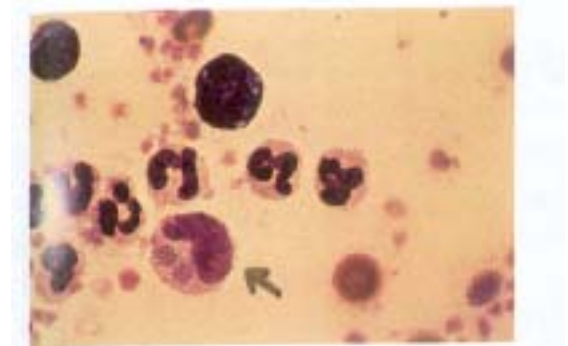
Le sang total d'un chien cliniquement ehrlichien, prélevé sur anticoagulant, peut subir une leucoconcentration (par séparation des cellules mononucléées par Ficoll) (Cf. Deuxième Partie 4.2.2.2).

On utilise préférentiellement la coloration de May Grünwald et Giemsa qui fait apparaître les morula sous formes d'inclusions intracytoplasmiques de couleur rose à pourpre dans les monocytes (de couleur toujours différente de celle du noyau). La coloration rapide de type Diff Quick est aussi utilisable (39) (Cf. Figure 14).

Ces structures sont visibles dans 4 à 6 % des leucocytes d'après une étude d'ELIAS en 1991 sur 250 chiens. Il est observé de grosses morulas sphériques ou ovales de 2,5 à 3µm de diamètre dans seulement 4 % des cas présentant un diagnostic cytologique positif. Ces morula sont basophiles, homogènes et denses (64).



**Morulas d'*E. canis* coloration rapide
Diff Quick X 1000 sur sang de chien
(Cliché J.P. BEAUFILS)**



**Morulas d'*E. canis* coloration MGG X 1000
sur leucoconcentrat de sang de chien
(Cliché D. PARZY)**

Figure 14 : Morula d'*E. canis*

Attention, les *Ehrlichia* peuvent être confondues avec d'autres structures intracellulaires : globules rouges phagocytés par un monocyte notamment dans la babésiose, inclusions de la maladie de Carré, images d'*Hepatozoon canis* (12).

Cette mise en évidence directe est donc assez délicate.

6.3.2.2 Recherche de corps d'inclusion

Le diagnostic cytologique de l'ehrlichiose canine peut être complété par la recherche de corps d'inclusion dans les monocytes, qui semblent plus faciles à mettre en évidence que les morulas (62). Ces corps, probablement constitués de corps élémentaires isolés ou déjà agglutinés en corps initiaux, se présentent sous forme de granules sphériques de 0,2 à 1,5 µm de diamètre en grappes irrégulières ou en motif circulaire ; leur couleur varie du rose au pourpre comme les morulas.

L'intérêt du diagnostic cytologique est donc limité par les erreurs par défaut (recherche souvent longue et décevante), ou par excès (confusion avec une image d'érythrophagocytose).

6.3.2.3 Mise en culture

Les facteurs limitants de la mise en évidence directe auxquels il faut ajouter l'extrême spécificité d'*E. canis* vis-à-vis de ses hôtes qui empêchait toute étude expérimentale sur lignées cellulaires, animaux de laboratoire ou embryons de poulet, devaient être contournés par la mise en culture de la bactérie sur monocytes canins frais prélevés sur chiens en phase aiguë d'ehrlichiose par NYINDO en 1971 (108).

Puis, HELMELT en 1980 affine la technique en permettant la propagation d'*E. canis* sur des cultures de monocytes extraits de chiens sains (79).

Actuellement, d'autres lignées cellulaires sont utilisées : des hybrides de macrophages canins et péritonéaux de souris (MDH-SP), de macrophages canins et fibroblastes humains, de cellules « macrophage-like » provenant d'un chien à histiocytose maligne (DH82), des cellules immortalisées endothéliales humaines (HMEC-1) (52,3) (Cf. Première Partie 1.4).

Cette mise en culture du microorganisme constitue une source d'antigène permettant son exploitation tant pour le test d'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic sérologique que pour le diagnostic génétique par réaction de polymérase en chaîne (PCR) ou encore la caractérisation de souche par amplification génomique et séquençage.

Elle évite ainsi les ponctions itératives de chiens atteints pour isoler la bactérie ou de chiens sains comme source de monocytes, supports de culture. De plus, la culture a apporté au diagnostic cytologique une meilleure connaissance de la morphologie et du développement d' *E. canis* (Cf.Figure 15).

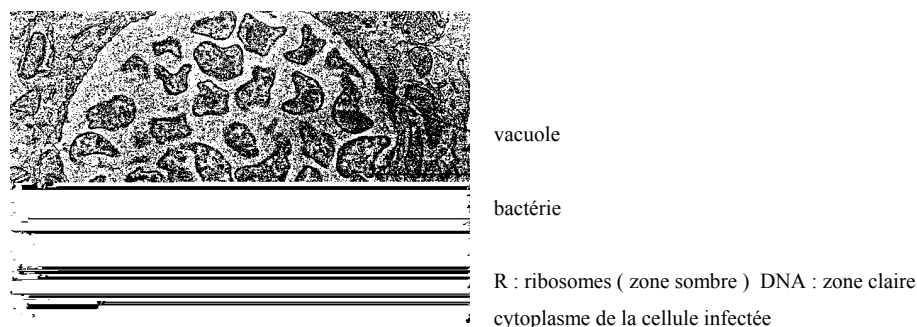


Figure 15 : Morulas d'*E. canis* en microscopie électronique (63)

La culture d'*E. canis* est longue (entre 14 et 34 jours pour voir les premiers microorganismes) (84). Cependant lors de mise en culture de prélèvements de chiens infectés expérimentalement, la culture est positive pour le sang prélevé dès le 2^{ème} jour post-inoculation.

Elle est pour cela la technique la plus sensible, mais n'est pas utilisée en pratique courante à cause de son délai et de son coût.

6.3.3 Diagnostic sérologique

La sérologie est indiquée dans les formes aiguës (au moins deux semaines après le début de l'infection) et chroniques.

La recherche d'anticorps spécifiques (IgG) par immunofluorescence indirecte (IFI) est la technique de référence de la sérologie de l'ehrlichiose canine depuis 1972 (119). Mais, parmi les tests de diagnostic rapide récemment mis au point, un test d'immunomigration rapide (IMR) d'utilisation simple par le vétérinaire praticien, permet aussi de mettre en évidence les anticorps anti-*E. canis* (41).

6.3.3.1 Immunofluorescence indirecte

Le substrat utilisé est une culture de cellules infectées par *E. canis* inactivée au formol. Ces cellules sont issues d'une lignée MDH-SP : lignée continue hybride de monocytes canins et macrophages péritonéaux murins, distribuées par Synbiotics (Lyon) (81) (Cf. Deuxième partie 3.2.1). Elles constituent l'antigène fixé sur la lame.

Le titre seuil de positivité en anticorps dosés dans le sérum à tester est de 40 (dilution à 1/40^{ème}) : toute sérologie supérieure à ce titre est considérée comme positive. Toutefois : l'existence d'un titre significatif ne permet pas d'établir un diagnostic d'ehrlichiose-maladie mais révèle uniquement un contact antérieur avec le microorganisme.

Bien que la séroconversion soit rapide, le diagnostic par sérologie ne peut pas être pratiqué pendant la fenêtre de séroconversion (1 à 2, voire 4 semaines), les anticorps n'étant pas encore détectables.

On doit envisager la réalisation de 2 prélèvements à 3 semaines d'intervalle pour mettre en évidence la séroconversion ou une modification croissante du titre en anticorps de plus de 2 dilutions.

Les variations de l'évolution des titres en anticorps ne semblent pas avoir de valeur pronostique car elles sont fluctuantes (119).

Le principe de l'IFI consiste donc à mettre en évidence les anticorps anti-*E.canis*, éventuellement présents dans le sérum testé, grâce aux complexes immuns qu'ils réalisent avec les anticorps seconds ajoutés (anti-IgG de chien) conjugués à un fluorochrome (isothiocyanate de fluorescéine) (Cf. Figure 16).

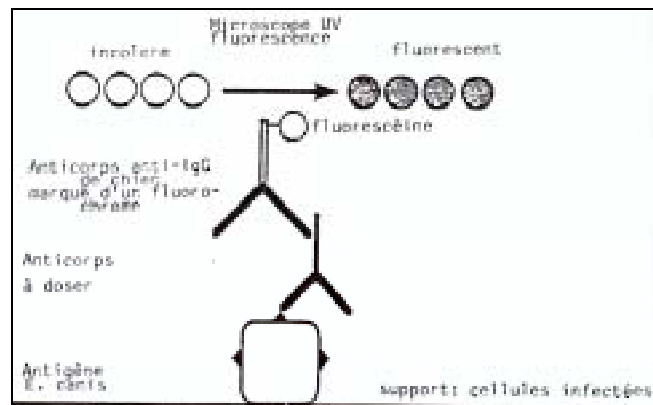


Figure 16 : Principe de l'immunofluorescence indirecte

C'est une réaction sensible et spécifique. La sensibilité est infiniment supérieure à l'observation clinique ; dans certaines études de prévalence, 41% des chiens séropositifs ne présentaient aucun signe clinique (40).

Quelques faux positifs, dus à une contamination bactérienne peuvent être signalés (jusqu'au 1/80), ainsi que des faux négatifs si le prélèvement est réalisé pendant la fenêtre de séroconversion, ou dans les jours qui précèdent le décès d'un chien pancytopénique. Il n'y a pas de réaction croisée avec d'autres agents pathogènes du chien tels que les leptospires ou les brucelles mais quelques interférences avec *Ehrlichia equi*, *E. sennetsu*, *E. risticii*, *E. chaffeensis* (62), *E. platys* ; cependant pour des titres élevés (> 1/640) le diagnostic est quasiment certain (116).

Des études récentes (WANER *et al.* 1998) ont mis en évidence des réactions croisées entre le sous-groupe des *Ehrlichia* granulocytaires comme *E. phagocytophila* et *E. equi* et celui des *Ehrlichia* monocytaires telles qu'*E. canis* (135). L'apparition d'anticorps dirigés contre le génogroupe d'*E. phagocytophila*/*E. equi* chez des chiens expérimentalement infectés par *E. canis* serait un phénomène temps-dépendant : pendant les phases subclinique et chronique de l'ehrlichiose canine, et permettrait ainsi d'avoir une signification diagnostique sur la persistance de l'infection par *E. canis*.

6.3.3.2 ELISA

La technique ELISA en phase solide est basée sur l'utilisation d'un support en plastique qui est sensibilisé avec des antigènes purifiés d'*E. canis* sur lesquels se fixent les anticorps spécifiques. La révélation est obtenue à l'aide de conjugué anti-immunoglobulines de chien couplé à un enzyme agissant sur un substrat chromogène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en anticorps, évaluée par comparaison à un abaque.

Le test (Immunocomb ®, Laboratoire Service International) permet donc de détecter et de titrer les anticorps anti-*E. canis* avec une bonne sensibilité et spécificité (136) .

6.3.3.3 Immunomigration rapide (41)

Le principe de la technique d'immunomigration rapide consiste en une réaction immunologique couplée à un phénomène de migration passive des molécules par mouillabilité d'un support solide (membrane en nitrocellulose). Dans le test utilisé (Witness *Ehrlichia* ®, Synbiotics, Europe), l'échantillon biologique contenant les anticorps spécifiques est dans un premier temps en contact avec la protéine A de *Staphylococcus aureus* couplée à des particules d'or colloïdal. L'apport d'une quantité suffisante de tampon entraîne la migration des complexes immunoglobulines/protéine A sur la membrane.

Les anticorps spécifiques sont capturés au niveau d'une zone réactive, constituée d'antigène *Ehrlichia canis* immobilisé sur la membrane ; sa concentration provoque alors la formation d'une bande de couleur rose, clairement visible. Les anticorps non spécifiques vont poursuivre leur migration ; l'excès de traceur protéine A marquée est capturé par les immunoglobulines de lapin constituant une bande de contrôle, situé à l'extrémité de la membrane (Cf. Figure 17).

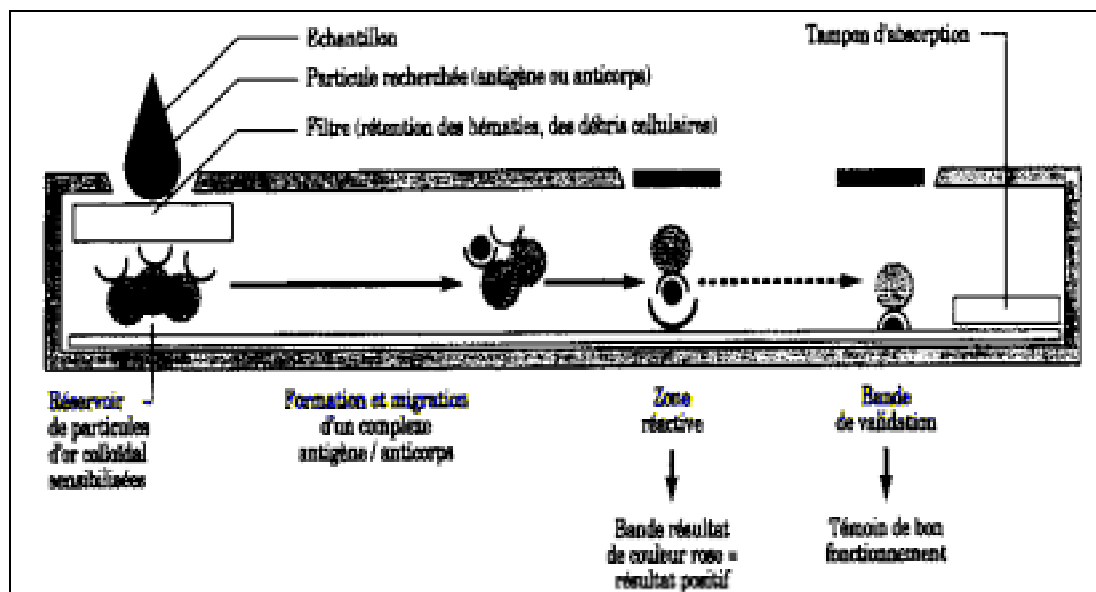


Figure 17 : Principe de l'immunomigration rapide

Le test est utilisable sur sérum, plasma ou sang total (les éléments figurés du sang sont retenus par un filtre). Sa sensibilité est de 95% et sa spécificité de 100% par rapport à l'IFI, technique de référence, d'après l'étude de DAVOUST *et al.* en 2000 (41). Le test IMR donne un résultat positif à partir de J15, pour une séroconversion entre J9 et J12 en IFI (Cf. travaux originaux Deuxième partie 3.3).

En effet, le conjugué fluorescent de l'IFI est, d'après cette même étude, capable d'identifier toutes les classes d'Ig de chien (réactivité contre les chaînes légères), alors que le traceur protéine A du test IMR fixe les IgM et les IgA canines (les premières à apparaître dès le 7^{ème} jour après l'infection) avec une affinité plus faible par rapport aux IgG (41). En cas de suspicion clinique et de résultat négatif du test IMR, il convient de réaliser un second test 10 à 20 jours plus tard.

Dans la pratique, le test d'immunomigration rapide peut être employé par le vétérinaire soit pour le dépistage de l'ehrlichiose asymptomatique, soit pour la confirmation d'un diagnostic clinique. En cas de résultat négatif du test malgré une forte suspicion clinique et des examens complémentaires évocateurs, il convient de mettre en place le traitement et de renouveler le test quelques jours plus tard ou d'envoyer un prélèvement sérologique à un laboratoire spécialisé pour une IFI, technique qui demeure la référence pour le diagnostic de l'ehrlichiose canine.

6.3.3.4 Immunotransfert : Western blot

Pour compléter la sérologie et mieux caractériser la réponse immune vis-à-vis des constituants antigéniques d'*E. canis*, une technique d'immunotransfert a été mise en œuvre.

Des antigènes d'*E. canis* sont purifiés puis séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Un immunotransfert est réalisé avec une dilution 1/100 du sérum de chien à analyser et une dilution 1/1000 d'anti-IgG de chien conjugués à une phosphatase alcaline. Le test est fait à différents jours suivant l'inoculation des chiens prélevés (84).

Le Western blot a ainsi permis de montrer, sur les immunoempreintes, une cinétique d'apparition des anticorps vis-à-vis des différents antigènes d'*E. canis* : 4 ou 5 jours après l'inoculation, les anticorps produits réagissent avec des polypeptides de bas (21 et 30 kDa) et haut poids moléculaire (78 kDa) ; l'intensité des réactions et le nombre de constituants antigéniques augmentent après 10-15 jours ; puis, dans le cas de l'ehrlichiose chronique, des anticorps apparaissent envers des protéines de haut poids moléculaire (113).

Cette méthode de diagnostic n'est pas utilisée en routine en raison de sa lourdeur technique (84).

6.3.4 Diagnostic moléculaire

6.3.4.1 Objectif

L'objectif du diagnostic moléculaire est la mise en évidence sur les gènes de séquences spécifiques d'espèces.

Le gène ARN 16S ribosomique, commun à toutes les espèces bactériennes est le plus utilisé.

Après amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), séquençage de l'amplicon et alignement avec les séquences déjà répertoriées, une classification est possible (61).

La mise en évidence par séquençage de régions très variables du gène permet la détermination d'amorces spécifiques de genre, d'espèce ou de souche. Ces amorces servent alors à la détection précise du microorganisme dans le prélèvement (67).

L'ARNr 16S constitue donc un outil pour l'étude de la phylogénie et de la taxonomie bactérienne, tout particulièrement pour les bactéries intracellulaires comme les rickettsies et les *Ehrlichia* qui expriment de nombreux phénotypes différents (121,137).

D'autres gènes sont en cours d'étude pour la détection des espèces d'*Ehrlichia*, comme ceux codant pour une protéine immunodominante de la membrane externe d'*E. canis* d'un poids moléculaire de 28 kilodaltons (p28) (105) ou encore le gène codant pour une protéine de 120 kilodaltons (p120) (145). L'opéron *groEL* est également étudié (127).

6.3.4.2 Principe de la PCR

Le concept technologique découvert par K. MULLIS, est né en 1983. Cette technique mise au point pour la première fois par un groupe de chercheurs de la société Cetus Corporation en 1985, permet l'amplification enzymatique de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Elle est fondée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermorésistante, extraite de *Thermus aquaticus* (Taq), bactérie vivant dans les eaux très chaudes. La polymérase a donc la propriété de ne pas être dénaturée à haute température. Ramenée à une température compatible avec son activité biologique, elle assure la polymérisation de nombreux brins d'ADN (86)

Un cycle d'amplification comporte : - une phase de dénaturation de l'ADN (à 94-95°C)
- une phase d'hybridation des amorces (température variable selon la nature de l'amorce utilisée : de 37 à 65°C)
- une phase d'extension-synthèse de brins d'ADN par la Taq polymérase à 72°C.

A chaque cycle le nombre d'amplicons est théoriquement doublé (Cf. Figures 18 et 19).

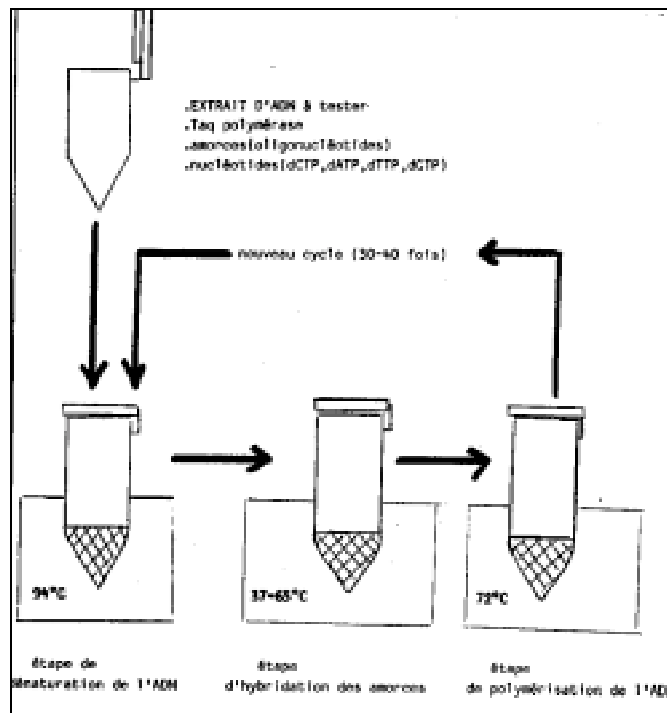


Figure 18 : Cycle d'amplification de l'ADN par PCR

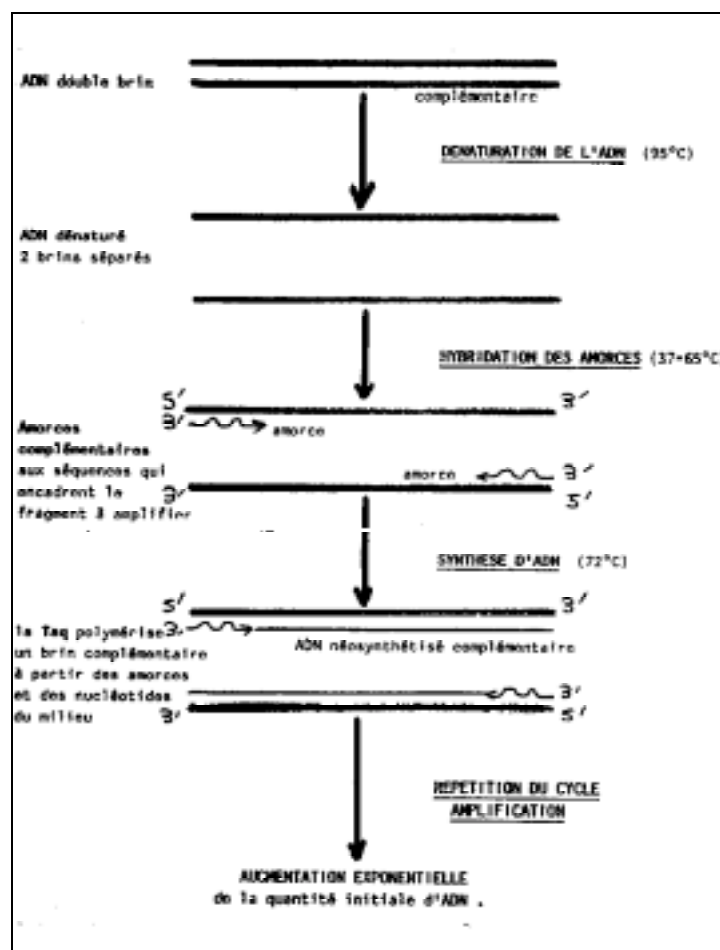


Figure 19 : Principe de la réaction de polymérisation en chaîne

La recherche de la présence d'ADN d'*E. canis* peut s'effectuer sur différents tissus du chien : reins, nœuds lymphatiques, foie, rate, poumons et surtout sur la fraction de cellules mononucléées du sang (84). Plusieurs études PCR ont également été menées sur les tiques pour détecter la bactérie chez son vecteur (83,110,111).

L'avantage de la PCR est d'être utilisable directement sur prélèvements cliniques et d'être excessivement sensible. Il existe en revanche des limites de spécificité, par contamination avec de l'amplifiat d'une réaction préalable ou par hybridation non spécifique des amorces, ce qui nécessite la mise en œuvre de règles strictes de manipulation et l'introduction systématique de témoins négatifs dans les réactions.

Le diagnostic génétique par PCR permet tout de même une mise en évidence précoce (détECTION du gène ARNr 16S d'*E. canis* dans les cellules mononucléées sanguines 4 à 10 jours après inoculation) de très faibles quantités d'antigène (84).

Le protocole expérimental et le choix des amorces pour l'amplification d'*E. canis* sera détaillé dans la deuxième partie de notre travail (Cf. Deuxième Partie 5.2).

La PCR et le séquençage permettent l'étude des polymorphismes de souche d'*E. canis* : l'étude du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a permis de distinguer 3 souches : Israël, Oklahoma et Florida, fortement homologues entre elles, et très proches d'*E. chaffeensis* responsable de l'ehrlichiose monocyttaire humaine (98,2% d'homologie) (90,5,6).

6.3.5 Diagnostic nécropsique

Les lésions déjà citées ne sont pas pathognomoniques. Pourtant certaines, lorsqu'elles sont rencontrées lors des autopsies, sont en faveur de l'ehrlichiose comme l'infiltration des méninges, du rein et de l'œil par des cellules plasmatiques considérées comme caractéristiques de la pancytopenie tropicale canine (80).

6.4 Diagnostic différentiel

Le diagnostic de l'ehrlichiose reste difficile du fait du manque de spécificité clinique.

En phase aiguë, il ne faut pas confondre l'ehrlichiose avec des parasitoses transmises par les tiques telles que la babésiose, l'hépatozoonose, des rickettsioses (affections qui peuvent d'ailleurs être intercurrentes) ainsi qu'avec la leishmaniose (dont l'électrophorèse des protéines et les symptômes peuvent se rapprocher de ceux de l'ehrlichiose) (10,11).

En phase chronique, il faudra la différencier de toutes les autres maladies responsables d'épistaxis ou de troubles de l'hémostase en général.

7. PRONOSTIC

7.1 Phase aiguë

Le pronostic est généralement bon en phase aiguë : la plupart des chiens évoluent spontanément vers la forme subclinique ; toutefois en l'absence de traitement, l'ehrlichiose aiguë peut aussi provoquer la mort d'un animal âgé (47) .

Le traitement donne d'excellents résultats durant cette phase : les signes cliniques disparaissent souvent en quarante huit heures (144). Ainsi, lors de l'étude expérimentale de DAVOUST *et al.* de 1991, tous les chiens traités ont guéri en 24 heures et la thrombopénie ne s'est pas maintenue (48). Nous avons réalisé la même constatation sur le chien n°1 infecté expérimentalement (Cf. Deuxième partie 2.3.1.2).

Toutefois, rien ne permet d'affirmer que les chiens traités en phase aiguë, n'hébergent plus la bactérie. Il existe des chiens traités, qui deviennent des porteurs chroniques asymptomatiques, réservoirs et sources de contagion (36,45).

Classiquement, après traitement, une diminution des titres sérologiques est observée (de l'ordre d'une dilution toutes les 3 semaines) pouvant conduire à la séronégativité (25,45,48,115). On ne sait pas si un chien séropositif est toujours porteur asymptomatique. Seule la recherche de l'antigène lui-même, notamment par biologie moléculaire (PCR, Cf. Première Partie 6.3.4 et Deuxième Partie 5.2) permet d'affirmer avec certitude sa persistance.

7.2 Phase chronique

Le pronostic est beaucoup plus réservé en phase chronique du fait de la gravité des signes observés et de l'inefficacité du traitement.

L'évolution dépendra alors de la forme (bénigne ou grave) et de la race du chien (forme grave du Berger allemand) (107). La mortalité est très forte chez les chiens atteints de pancytopenie tropicale canine.

Les chiens qui guérissent d'une ehrlichiose chronique peuvent mettre six à douze mois à retrouver l'état clinique et biologique qui était le leur avant la maladie (25,36).

De plus, une rechute clinique peut se produire à la faveur d'un stress ou d'une réinfection de porteurs chroniques d'*E. canis* (36).

La distinction entre les formes aiguë et chronique est difficile à établir dans les conditions naturelles (129). Afin de préciser le pronostic en fonction du stade de la maladie, les signes évocateurs d'une ehrlichiose chronique peuvent être recherchés : anamnèse ou tableau clinique de maladie ancienne, amaigrissement progressif, hyperthermie intermittente chronique, leucopénie (avec un taux de leucocytes $< 6.10^9/L$), hypergammaglobulinémie (129).

Une correspondance a été établie entre l'importance de l'anémie et de la leucopénie et le taux de mortalité (131).

8. TRAITEMENT

8.1 Traitement étiologique

8.1.1 Sensibilité d'*Ehrlichia canis* aux antibiotiques *in vitro*

Des tests *in vitro* de mise en présence de cellules infectées (taux d'infection connus, révélés par immunofluorescence indirecte) avec divers antibiotiques ont montré que seule la doxycycline stérilise la culture, pour un taux d'infection de 30% des cellules. La rifampicine abaisse le taux d'infection d'1 à 2 %, après 6 jours de traitement. Les autres antibiotiques testés (pénicilline, gentamicine, chloramphénicol et érythromycine) ne sont pas efficaces (24).

8.1.2 Traitement anti-infectieux des formes cliniques

Le traitement doit agir de façon spécifique sur les moyens de survie de la bactérie dans les monocytes.

E. canis se trouve à l'intérieur de vacuoles dans les phagosomes. Ceux-ci fusionnent avec des lysosomes pour former des phagolysosomes, dans lesquels la bactérie est dégradée (destruction des protéines, de l'ADN et des membranes). La fusion phagolysosomiale est donc responsable de la mort du micro-organisme. La bactérie a les moyens métaboliques d'empêcher cette fusion par synthèse de protéines. C'est à ce niveau qu'interviennent les antibiotiques : ils bloquent cette synthèse et permettent la fusion phagolysosomiale entraînant la destruction (23).

Les principaux anti-infectieux efficaces sont donc les cyclines : elles possèdent une activité bactériostatique en se fixant sur les ribosomes de la bactérie, ce qui inhibe l'ARN de transfert et bloque la réplication protéique. Les cyclines de deuxième génération sont les plus utilisées.

8.1.2.1 Doxycycline

C'est une cycline obtenue par hémisynthèse, liposoluble, qui atteint rapidement des pics plasmatique (en 3 heures) et tissulaire élevés. Sa concentration cellulaire est plus importante que celle de l'oxytétracycline hydrosoluble. Elle se fixe au niveau des unités 50S des ribosomes 70S.

La posologie classique a longtemps été de 10mg/kg/jour *per os* pendant 10 jours (26,36,131). Cependant de tels protocoles ne suffisent pas toujours à éliminer *E. canis* de l'organisme des chiens, notamment en cas d'infection chronique. En effet pour obtenir un effet stérilisant, la durée du traitement doit être d'au moins un mois (3 à 8 semaines selon les publications). Elle ne doit pas être administrée aux femelles gestantes ou allaitantes (risque d'anomalie du bourgeon dentaire ou dysplasie dentaire chez le chiot par passage dans le placenta et le lait maternel), ni aux chiots (risque de coloration des dents et hypoplasie de l'émail dentaire) ;

- DAVOUST *et al.* ont montré en 1991 l'efficacité clinique du traitement de 21 jours à la doxycycline à 10mg/kg/j sur 3 chiens en phase aiguë (48). Ses effets sont rapides en raison d'une bonne absorption (en moins d'une heure) à cette posologie et de sa faible toxicité aiguë ; les symptômes régressent en 24 heures, la thrombopénie disparaît (47 et Travaux originaux Deuxième partie 2.3.1.2).

Toutefois, ce traitement même entrepris tôt lors de la phase aiguë de la maladie n'est pas toujours stérilisant.

- De plus, ce protocole thérapeutique appliqué en phase chronique, asymptomatique, de la maladie n'a pas non plus les mêmes résultats : les chiens restent porteurs de la bactérie (45).

8.1.2.2 Tétracycline

Le protocole le plus rapporté est basé sur la dose de 66 mg/kg/j en 2-3 prises quotidiennes *per os*, pendant 14 jours à 18 jours (141).

L'oxytétracycline doit être administrée à l'écart des repas (3 heures avant ou après) pour obtenir une absorption maximale, et ne peut être utilisée sur les chiots ou les femelles gestantes (25,69).

8.1.2.3 Dipropionate d'imidocarbe

Il s'agit d'un puissant inhibiteur de la cholinestérase, recommandé dans le traitement de l'ehrlichiose canine à la posologie de 5-7 mg/kg en 2 injections sous-cutanées ou intramusculaires, à 15 jours d'intervalle (2,100,141).

Les effets secondaires sont l'hyperthermie, des diarrhées et une douleur au point d'injection. Dix minutes après l'injection, peuvent apparaître sialorrhée, épiphora et diarrhée en raison de l'activité anticholinestérase (2,100). Une toxicité rénale est aussi rapportée : nécrose tubulaire en cas d'injection intraveineuse, et hépatique en cas d'injection de plus de 60 mg/kg en sous-cutanée (100).

Pourtant ce protocole a été démontré comme très efficace et intéressant par opposition à la longueur et aux effets sur les chiots du traitement par doxycycline (114,100). Il permet de plus d'agir simultanément sur *Babesia spp.*, souvent intercurrente d'*E. canis*, en Afrique notamment (100).

→ Le traitement de l'ehrlichiose canine repose donc sur l'usage de deux molécules : la doxycycline et l'imidocarbe.

8.2 Traitements adjuvants

Pour les chiens atteints d'hémorragies, la transfusion sanguine est conseillée après vérification de compatibilité, à base de sang frais (20 mL/kg) ou de plasma enrichi en plaquettes (10 mL/kg), particulièrement lors d'infection chronique avec aplasie médullaire (120,131).

Les stéroïdes androgéniques (nandrolone) peuvent être employés pour stimuler la production des cellules par la moelle osseuse en cas de pancytopenie (150 mg/j intramusculaire pendant 9 jours). D'autres agents médullostimulants sont parfois cités, comme le gluconate de lithium associé aux cyclines à la dose de 10 mg/kg.

Une corticothérapie à doses immunosuppressives (méthylprednisolone 2mg/kg/j pendant 2 à 7 jours) peut être entamée pendant la phase aiguë, en cas de thrombopénie périphérique ou d'autres troubles à médiation immunitaire secondaires à l'ehrlichiose tels que polyarthrite, vascularite, méningite (8).

Il a également été conseillé d'utiliser le lévamisole sur les chiens gravement pancytopéniques à la dose de 3 à 10 mg/kg/j *per os* pendant 70 jours pour restaurer les fonctions de migration cellulaire, de phagocytose et de cytotoxicité des cellules de l'immunité (129).

9. **PROPHYLAXIE**

9.1 Prophylaxie sanitaire

Il s'agit de protéger les chiens indemnes des sources de contamination que constituent les chiens malades ou porteurs qui peuvent être à l'origine de nouveaux foyers d'enzootie et surtout de l'unique vecteur actuellement connu : *Rhipicephalus sanguineus*.

9.1.1 Mesures concernant les chiens porteurs ou suspects

Les mesures suivantes sont celles préconisées pour la protection des chiens des armées et de la gendarmerie par le Bureau Vétérinaire de la Direction Centrale du Service de Santé des Armées, mais peuvent être appliquées dans le milieu civil sur le conseil du vétérinaire traitant (49) :

- En zone d'enzootie, la limitation des mouvements de chiens entre chenils est impérative pour éviter la création de foyers secondaires.
 - A leur arrivée sur le territoire métropolitain tous les chiens ayant séjourné dans des zones à risque doivent faire l'objet d'un examen clinique et d'un déparasitage externe afin d'éviter l'introduction de tiques infestées. Pour les chiens militaires, des mesures d'isolement doivent être prises et un test de dépistage sérologique doit être systématiquement réalisé à compter du 21^{ème} jour après le retour. Dans le milieu civil, une sérologie sera entreprise en cas de suspicion. Dans l'attente du résultat des analyses, les mouvements de ces chiens doivent être aussi limités que possible :
 - si la sérologie est négative, le chien est considéré comme indemne ;
 - si la sérologie est positive ou si le chien présente des signes de suspicion clinique, le traitement à base de doxycycline à 10 mg/kg/j pendant 1 mois doit être mis en œuvre ;
 - si la sérologie est douteuse (titre faible en anticorps anti-*E.canis* : 1/20), il faut effectuer un deuxième prélèvement à 15 jours d'intervalle pour confirmer l'évolution des titres.
- Remarque : les deux prélèvements doivent alors être traités en parallèle.

Il est recommandé d'effectuer une surveillance clinique et hématologique de ces chiens séropositifs. A l'issue du traitement pour les chiens militaires, la quarantaine peut être levée, mais un contrôle sérologique doit être effectué au bout de 6 mois. Si le traitement a été efficace, la production d'anticorps s'interrompt. Les anticorps ayant une durée de vie d'environ 21 jours, le titre sérologique diminue logiquement d'une dilution toutes les 3 semaines (45).

9.1.2 Mesures concernant le vecteur

9.1.2.1 Transmission directe : *Rhipicephalus sanguineus*

La lutte contre les tiques peut se faire pendant leur vie parasitaire ou leur vie libre (28) :

- destruction des tiques des carnivores pendant la vie parasitaire :
 - pour des infestations faibles : on peut procéder à une extraction manuelle en s'aidant d'une petite pince et en évitant la rupture du rostre (pour *R. sanguineus* qui est brévirostre, le risque est moins important). On peut éventuellement déposer une goutte d'éther ou d'essence de térébenthine sur les tiques quelques minutes avant l'arrachage (bien que ces méthodes soient contestées par les spécialistes car elles seraient inefficaces et susceptibles de faire saliver ou

régurgiter les tiques en augmentant donc le risque de transmission de pathogènes), ou utiliser des crayons feutres imprégnés de cyperméthrine (Feutratic ®) (110).

- pour des infestations fortes : des bains sont possibles au moyen de substances acaricides en suspension aqueuse : lindane (action sur les ions K^+ des parois nerveuses), pyréthrinoïdes (perméthrine à action sur la perméabilité des membranes nerveuses aux ions Na^+ et K^+ , action rapide « effet choc » ; existe également sous forme de colliers : Scalibor ® (Hoechst Roussel Vet) à base de deltaméthrine), carbamates et organophosphorés (action anticholinestérasique), et amitraz (existe également sous forme de colliers acaricides : Preventic ® [Virbac, France]). Une injection sous-cutanée mensuelle d'ivermectine (Ivomec Bovins ® [Merial, France] 0,4 mg/kg) peut être administrée.

• destruction des tiques pendant la vie libre :

- Pour éradiquer *R. sanguineus* dans les chenils, il faut cimenter le sol, crépir les murs, pulvériser un acaricide rémanent , faciliter le nettoyage et la désinfection des locaux.

- Suite à la ponte d'une tique femelle fixée sur un chien, l'infestation d'un appartement est possible. La pulvérisation d'acaricide peut alors s'avérer nécessaire (28).

- Des méthodes de contrôle biologique (prédateurs, parasites, pathogènes, stérilisation des mâles) ont été proposées, mais rarement mises en pratique (110).

9.1.2.2 Transmission indirecte

En zone d'enzootie, tous les chiens utilisés comme donneurs de sang doivent être préalablement soumis à un test de dépistage.

9.2 Prophylaxie médicale

Dans les zones où la pression de l'infection peut être très importante (par exemple dans les chenils militaires d'Afrique), il y a lieu de mettre en œuvre une chimioprophylaxie. L'administration quotidienne de 100 mg de doxycycline pour un chien de 30 kg (soit environ 3 mg/kg) *per os* est conseillée pendant tout le séjour.

D'autres protocoles ont été testés : l'utilisation de la tétracycline (6,6 mg/kg/j *per os* tous les jours) a été mise en œuvre en 1972 en Malaisie dans un chenil militaire ; l'administration d'un comprimé de 250 mg de tétracycline tous les jours (soit environ 8 mg/kg) a été largement mise en œuvre

dans les chenils militaires français d'Afrique ; un protocole à base d'imidocarbe (5 mg/kg) a également été testé avec de bons résultats (141,39,109).

Les chiens ayant déjà subi une infection à *E. canis* sont sensibles à une réinfection ultérieure (48 et Travaux originaux Deuxième partie 2.4.2). Il n'y a donc pas d'immunité de réinfection.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX ORIGINAUX

ETUDE EXPERIMENTALE D'UNE SOUCHE **D'*Ehrlichia canis***

1. INTRODUCTION

1.1 Objectifs généraux

Notre travail réside en l'étude expérimentale d'une souche d'*Ehrlichia canis* isolée en Corse en 1989 sur un chien atteint d'une ehrlichiose chronique. Nous avons étudié le pouvoir pathogène de cette souche, la réponse immune qu'elle suscite, sa mise en culture et sa caractérisation génétique pour la comparer aux souches connues de la bactérie.

1.2 Collaborations

- L'Unité de Parasitologie de l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (IMTSSA) (Médecin en Chef PARZY) pour les travaux de biologie cellulaire et moléculaire.
- Le Conseiller Vétérinaire Interarmées en Région SUD-Est (Vétérinaire Biologiste en Chef DAVOUST) chargé d'assurer le suivi épidémiologique, clinique, thérapeutique et expérimental dans le domaine de l'ehrlichiose canine pour le Corps des Vétérinaires Biologistes des Armées ;
- L'Unité de Chirurgie et Physiologie Expérimentales de l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (Infirmier Major BARTHARES) pour le soutien technique ;
- Le Secteur Vétérinaire Interarmées de Marseille (Vétérinaire Biologiste PORTELLI) pour le soutien technique ;
- Les Laboratoires de Biologie Clinique et de Biochimie de l'Hôpital d'Instruction des Armées LAVERAN (Médecin en Chef MORILLON, Pharmacien Chimiste en Chef CHEVRIER) à Marseille pour les bilans sanguins ;
- Les Laboratoires d'Anatomo-Pathologie de l'Hôpital d'Instruction des Armées DESGENETTES (Médecin en Chef SACCHARIN) à Lyon pour les analyses anatomo-pathologiques des biopsies d'organes.

1.3 Matériel et méthodes communs aux quatre études

1.3.1 Souche Borgo d'*E. canis*

1.3.1.1 Cas princeps (48)

Cette souche d'*E. canis* a été isolée en octobre 1989 par DAVOUST et PARZY chez un chien Berger belge malinois (ROBY), mâle, âgé de 5 ans, atteint d'une ehrlichiose chronique, dans le chenil militaire du camp de Borgo , au Sud de la ville de Bastia, sur les bords de l'étang de Biguglia, en Haute-Corse.

Ce chenil a connu durant l'été 1988, un épisode d'épizootie, enrayé sur le moment grâce à la mise en œuvre rapide du traitement, mais réurgent l'année d'après. Ainsi, en mai 1989, des chiens de ce chenil ont présenté un tableau clinique d'ehrlichiose aiguë (37).

Le chien princeps a présenté en juin 1989 un épisode clinique d'abattement, d'anorexie et d'hyperthermie à 40°5 C, associé à une uvéite bilatérale. Il reçoit un traitement à base de doxycycline (Ronaxan ® [Merial]) (10 mg/kg/j pendant 10 jours). Son état général s'améliore rapidement sauf l'atteinte oculaire.

En septembre, un bilan sanguin est réalisé : on note une pancytopenie avec leucopénie ($1,5 \cdot 10^9$), une anémie non régénérative (hémoglobine : 10,2 g/dL, hématocrite : 31%), une thrombopénie ($6 \cdot 10^9$ /L), une hyperglobulinémie (pic γ 32%, un taux de protéines sériques de 101 g/L et un rapport albumines/globulines de 0,41). L'examen de l'urine met en évidence une protéinurie (++) et des traces d'hémoglobine. La sérologie de l'ehrlichiose est positive au 1/1600 en IFI.

1.3.1.2 Prélèvement

Sur ce chien présentant les signes biologiques de l'ehrlichiose chronique, l'isolement de l'agent infectieux a été réalisé à partir de 20 mL de sang recueillis par ponction de la veine radiale.

1.3.1.3 Conservation

Les leucoconcentrats de la souche est conservée depuis par cryoconservation dans l'azote liquide à l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (IMTSSA) à Marseille. Des études d'inoculations expérimentales ont été réalisées depuis : en 1989,1990, 1993, 1995 (Cf. Deuxième Partie 2.2.1) et notre étude de 2001.

Il s'agit dans notre étude de la souche Borgo 5^{ème} passage sur chien (Cf. Figure 20) pour le chien n°1 et n°2.

1.3.2 Les Animaux

Deux chiens de race Beagle (chien n°1 et chien n°2) femelles, âgés de 6 mois, de 10 kg, sont utilisés. Ils proviennent d'un élevage autorisé.

Ils sont tatoués, vaccinés (maladie de Carré, maladie de Rubarth, parvovirose, toux de chenil), vermifugés par l'association praziquantel-pyrantel-febantel (DRONTAL®, Bayer Pharma) et reçoivent à leur arrivée à l'Unité de Chirurgie et Physiologie Expérimentale de l'IMTSSA un traitement antiparasitaire externe à base de fipronil (FRONTLINE Spot on®, MERIAL) renouvelé tous les 28 jours.

Ils sont hébergés dans des courettes individuelles de 10 m² comportant une partie extérieure grillagée.

Ils reçoivent un aliment sec industriel complet (25% de protéines) fabriqué par la Société Royal Canin. Deux abreuvoirs remplis quotidiennement sont à disposition *ad libitum*.

La propreté du chenil est assurée quotidiennement.

Deux autres chiens de race Beagle (chien n°3 et chien n°4) femelles, âgés de 4 ans, de 15 kg, traités à la doxycycline à 10 mg/kg/j pendant 28 jours, et guéris cliniquement après une inoculation expérimentale en 1998 de la souche Borgo, sont entretenus dans les mêmes conditions que les chiens n°1 et n°2.

Les quatre chiens arrivent une semaine avant le début du protocole pour acclimatation.

Le statut sérologique des quatre chiens vis-à-vis d'*E. canis* est vérifié à leur arrivée par IFI : les chiens n°1 et 2 sont négatifs, les chiens n°3 et 4 sont positifs au 1/160.

Ces chiens sont utilisés dans le strict respect des règlements en vigueur. Notre protocole a été présenté au comité d'éthique de l'expérimentation animale de l'IMTSSA qui a émis un avis favorable à sa mise en œuvre.

2. ETUDE CLINIQUE

2.1 Objectifs

Le pouvoir infectant des *inocula* conservés à -180°C dans l'azote liquide à l'IMTSSA a déjà été vérifié après inoculation de chiens naïfs. Des études de réaction à l'inoculation et de suivi clinique ont en effet déjà été menées à partir des prélèvements issus du cas princeps ou de chiens inoculés expérimentalement par la suite (48). Tous les chiens sont donc infectés par une souche commune d'*Ehrlichia canis*, isolée en 1989 en Corse, nommée souche Borgo (Cf. Deuxième partie 2. 2.).

Cependant de nombreuses questions restaient en suspens concernant :

- la sensibilité à la réinfection de chiens séropositifs et l'accentuation éventuelle des symptômes par rapport à une primo-inoculation,
- l'existence de forme fruste sans signes cliniques, ni perturbations hématologiques et donc l'existence éventuelle d'une immunité individuelle chez certains chiens naïfs,
- la pathogénicité expérimentale éventuelle de la souche par d'autres voies d'inoculation que la voie intra-veineuse stricte.

L'étude *in vivo* réalisée sur quatre chiens permet aussi de confirmer ou d'infirmer les connaissances actuelles sur la clinique de l'ehrlichiose monocyttaire canine, d'apporter des compléments en fonction de répercussions cliniques originales ou peu fréquentes, et de discuter sur leur cohérence pathogénique (8,15,25,33,39,46,48,72,80,144). Il ne s'agit pas de réaliser une étude statistique (évidemment non significative sur quatre cas).

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Protocole expérimental d'inoculation

Les *inocula* sont constitués de cellules mononucléées, récupérées à partir de sang total de chiens infectés par la souche Borgo d'*E. canis* (Cf. Figure 44), et d'un milieu conservateur à base de milieu de culture cellulaire (95%) et de DMSO (Diméthyl Sulfoxide) (5%). Ils sont dilués dans 5 mL de sérum physiologique pour faciliter l'injection.

- le chien n°2 est inoculé par injection intraveineuse à la veine radiale de deux ampoules de leucoconcentrats de sang total (soit environ 2 mL), provenant des chiens n°3 et n°4 du 18/05/98 (lors d'une étude *in vivo* précédente, prélevés à J13 post-inoculation à l'acmé des signes cliniques dont l'hyperthermie).
- le chien n°1 reçoit de la même façon deux ampoules (soit environ 2 mL) du chien EXTASE du 21/02/95 (à J15 post-inoculation). Il s'agit du 5^{ème} passage *in vivo* de la souche Borgo (Cf. Figure 20).

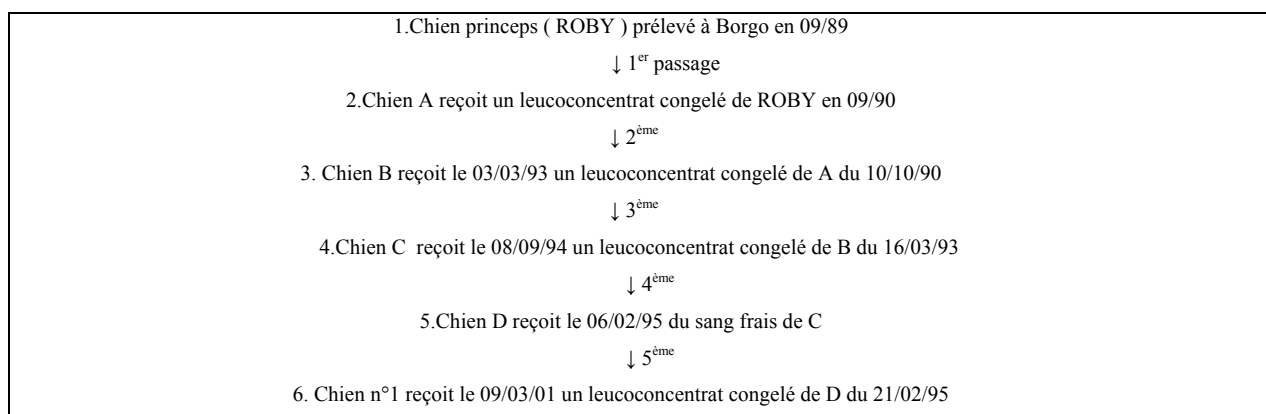


Figure 20 : Chronologie des passages *in vivo* de la souche Borgo

2.2.2 Protocole expérimental de réinoculation

- Le chien n°4 est inoculé par voie intraveineuse avec 12 mL de sang hépariné frais prélevé à la veine jugulaire du chien n°1 à J19 post-inoculation (hyperthermie à 39°9 C, abattement). Les groupes sanguins des chiens n°1 et 4 sont identiques (A+).

- Le chien n°3 est inoculé par voie sous-cutanée en 4 sites (en position médiane du dos) avec pour chaque site une dose de 3 mL, soit 12 mL au total de sang hépariné prélevé sur le chien n°1 à J19 post-inoculation.
- Le chien n°2 est réinoculé à J23 du protocole 2.2.1 par voie intraveineuse avec 8 mL de sang hépariné frais prélevé à la veine jugulaire du chien n°1 à J21 post-inoculation (hyperthermie à 39,9° C, avant mise en œuvre du traitement du chien n°1).

2.2.3 Protocole thérapeutique

Le chien n°1 a présenté les signes de l'ehrlichiose aiguë à partir J13 post-inoculation : hyperthermie à 39°7 C, anorexie, asthénie, adénomégalie poplitée et rétropharyngienne, jetage nasal et toux.

Il a reçu à partir du 7^{ème} jour de la maladie (J21) le traitement suivant : doxycycline (RONAXAN®, Merial-Lyon) 10mg/kg/j, *per os*, en une seule prise quotidienne pendant 28 jours.

2.2.4 Suivi clinique et biologique

Les quatre chiens de notre étude font l'objet d'un examen clinique quotidien avec enregistrement de l'appétit, du poids avec une attention particulière à la croissance des chiens n°1 et n°2 non terminée qui peut biaiser la courbe pondérale, de la température rectale, et de toute modification de l'état général.

Des prélèvements sanguins sont réalisés à la veine jugulaire au moins une fois par semaine entre J0 et J68 pour les chiens n°1 et n°2, entre J0 et J44 pour les chiens n°3 et n°4, et quotidiennement entre J10 et J21 pour les quatre chiens.

Les examens demandés sont les suivants : ALAT, ASAT, PAL, urée, créatinine, ainsi qu'une électrophorèse des protéines. Un bilan hématologique (numération et formule sanguine) est réalisé tous les deux jours. En phase aiguë, il est effectué quotidiennement pour suivre la thrombopénie, qui peut être brutale et importante et qui précède généralement l'apparition d'éventuels symptômes. Cette surveillance journalière permet aussi de décider de la mise en place du traitement en fonction de la gravité de la thrombopénie.

Des prélèvements sanguins sont effectués sur tubes secs pour la sérologie (centrifugés 10 min à 3000 tr/min) et conservés à -40° C sur place avant transfert pour le stockage à -80° C à

l'IMTSSA ; sur tube EDTA en prévision des études génomiques par PCR ; ils sont conservés également à -40°C.

Après leur euthanasie (injection intraveineuse de pentobarbital, DOLETHAL ® [Vétquinol], après prémédication par injection intraveineuse d'Acépromazine, CALMIVET ® [Vétquinol] à la dose de 0,05 mg/kg , en association avec la Kétamine, IMALGENE ® [Merial] à la dose de 5 mg/kg), les chiens ont été autopsiés et des examens anatomo-pathologiques ont pu être effectués notamment sur des biopsies de foie, rate, poumons, reins, noeuds lymphatiques mésentériques.

2.3 Résultats

2.3.1 Ehrlichiose aiguë symptomatique traitée

2.3.1.1 Phase aiguë

Le chien n°1 a présenté les premiers signes de la maladie, 13 jours après l'inoculation expérimentale : anorexie, hyperthermie brutale à 39°9C, adénomégalie des nœuds lymphatiques palpables : poplités et rétropharyngiens. A partir de J13, la fièvre s'est maintenue au-dessus de 39°2 C jusqu'au deuxième jour de traitement (J22) (Cf. Figure 21).

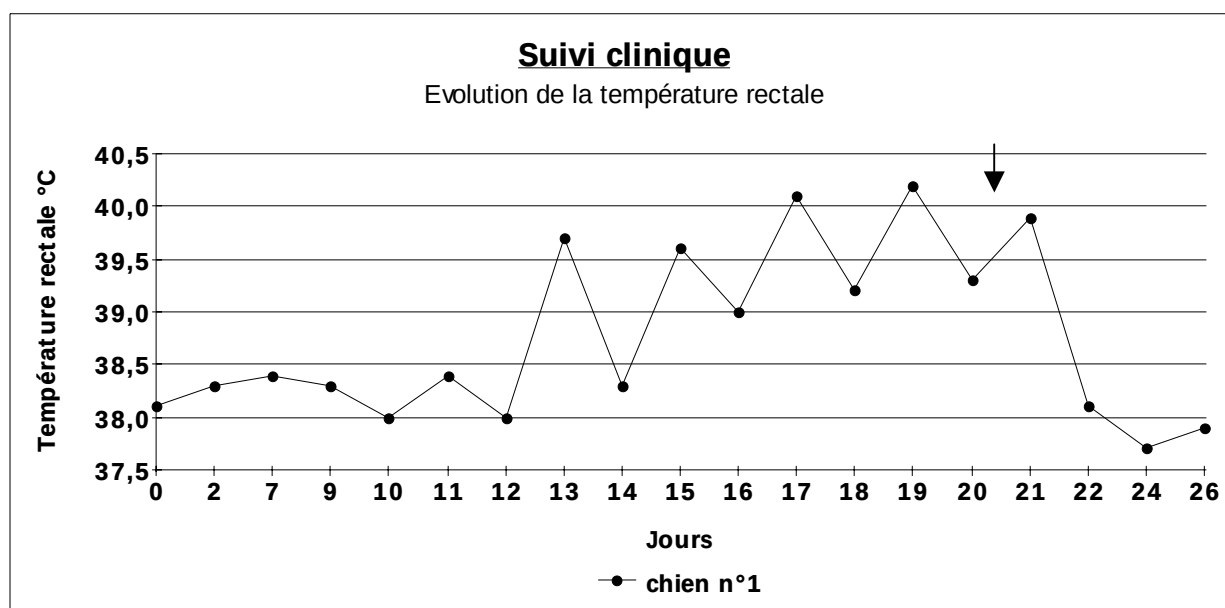


Figure 21 : Evolution de la température rectale du chien n°1 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë (flèche : début du traitement)

Pendant cette phase aiguë un amaigrissement important est noté (perte de poids de 20% : moins 2 kg en 8 jours) avec une déshydratation.

A partir de J15, un jetage nasal séreux et une toux quinteuse accompagnée de crépitements bilatéraux dans les lobes pulmonaires caudaux sont apparus. A J21, l'animal présente des difficultés locomotrices et des muqueuses ictériques, ce qui motive la mise en place du traitement.

La thrombopénie est maximale à J17 (43.10^9 plaquettes/L) puis elle se stabilise avec la prise du traitement à J21(remontée à partir du 2^{ème} jour d'administration de doxycycline) (Cf. Figure 22).

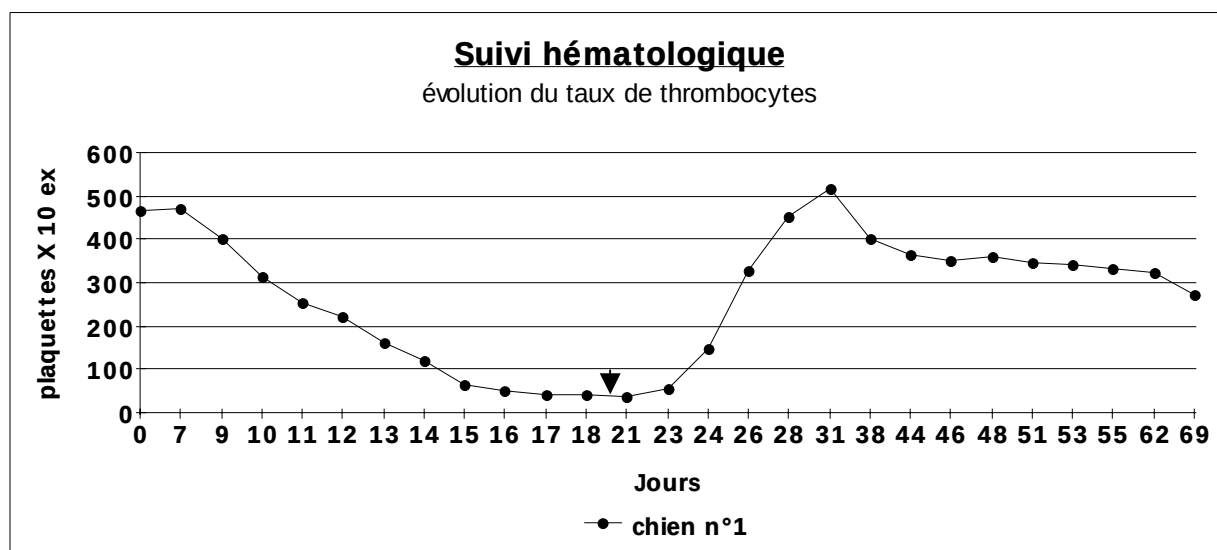


Figure 22 : Evolution de la thrombocytemie du chien n°1 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë (flèche : début du traitement)

La numération leucocytaire varie dans les limites normales entre 6 et 15.10^9 leucocytes /L (Cf. Figure 23).

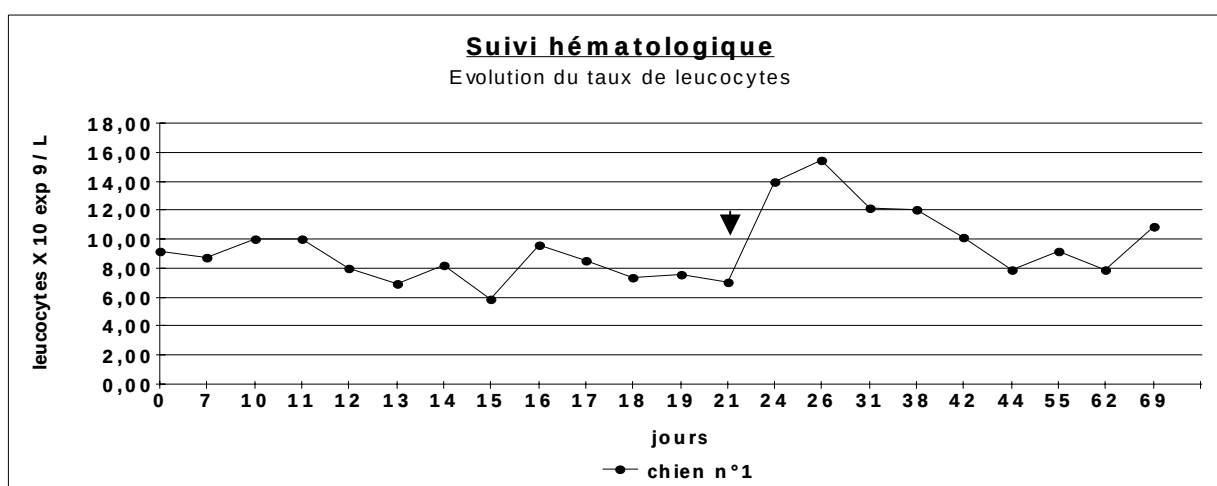


Figure 23 : Evolution de la numération leucocytaire du chien n°1 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë (flèche : début du traitement)

L'hémoglobininémie chute progressivement à partir de J10 ; l'**anémie** est maximale à J21 avec 9,3 g d'hémoglobine /dL (Cf. Figure 24).

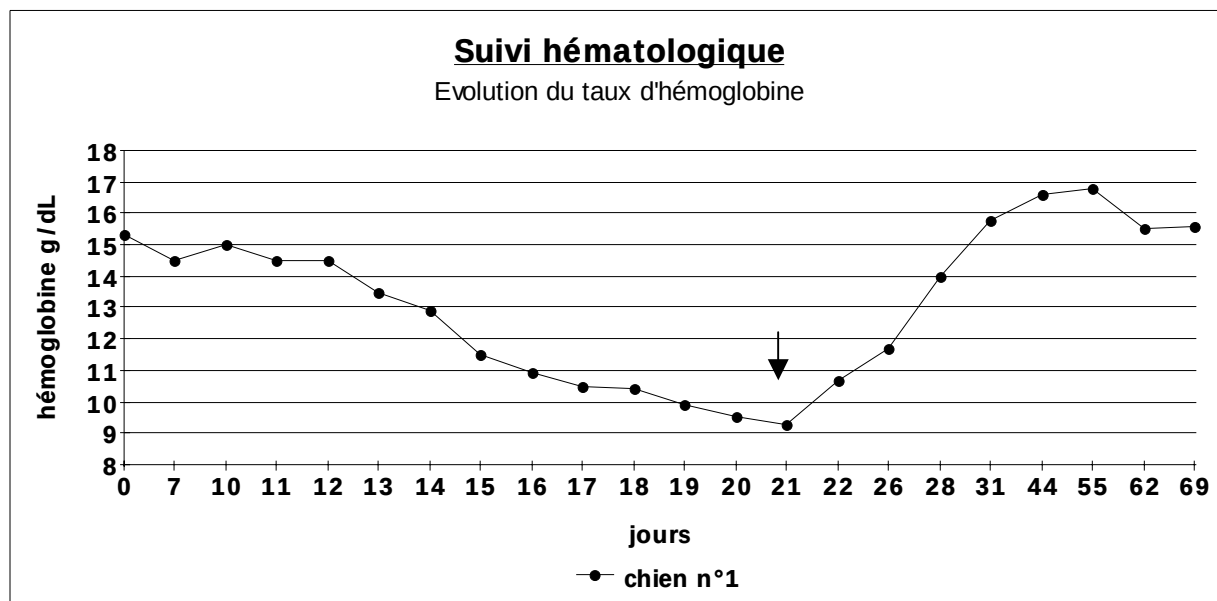


Figure 24 : Evolution de l'hémoglobininémie du chien n°1 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë (flèche : début du traitement)

Les transaminases ASAT s'élèvent passant de 20 UI/L à J0 à 90 UI/L à J7 puis de nouveau à 55 UI/L à J20. Les ALAT ne subissent pas de forte élévation (maximum à 62 UI/L dans les normes à J24) (Cf. Figure 25).

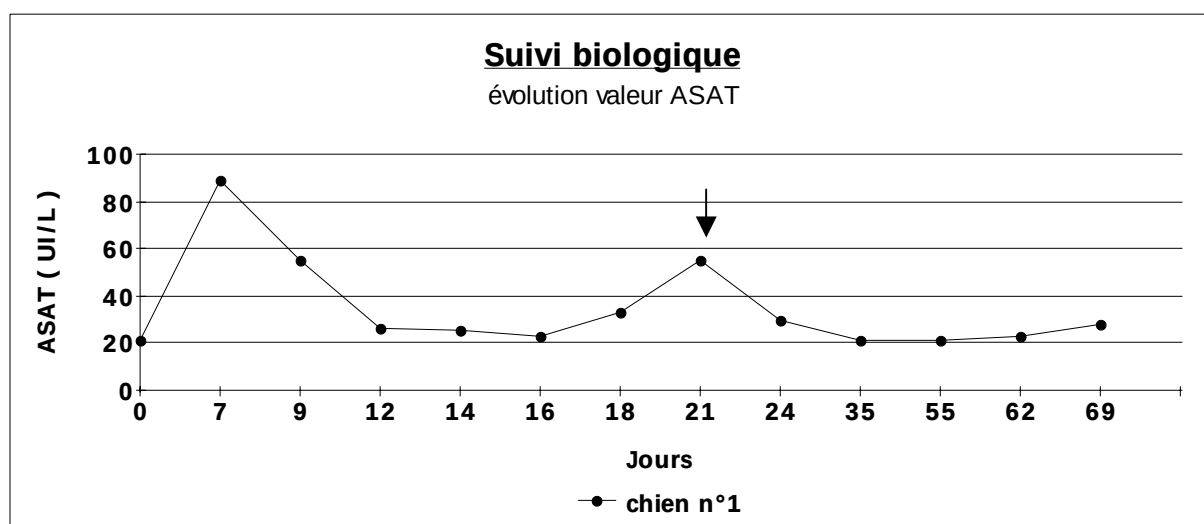
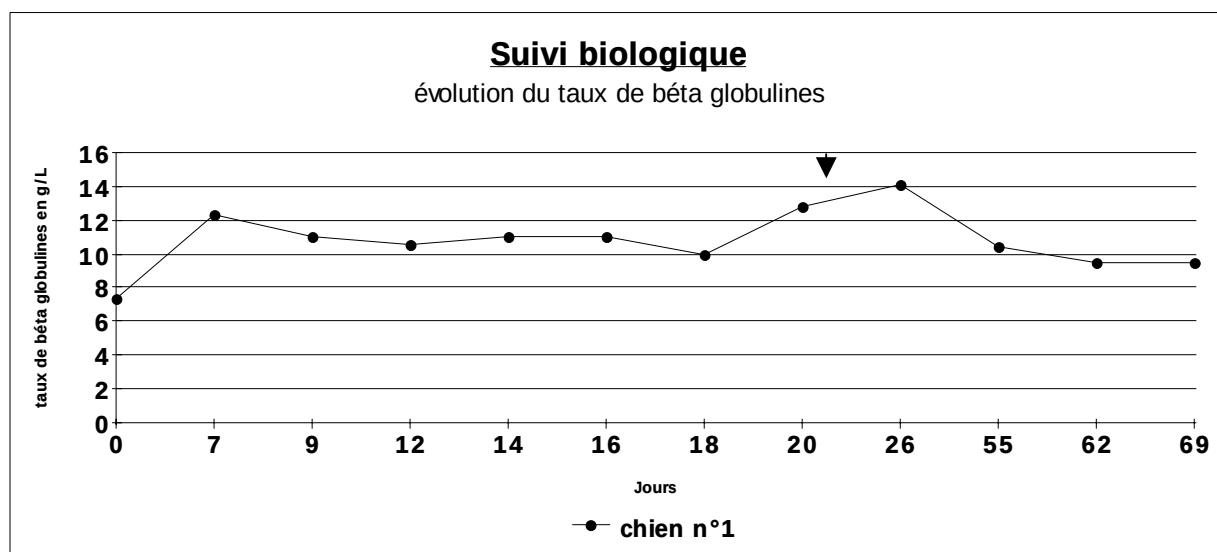


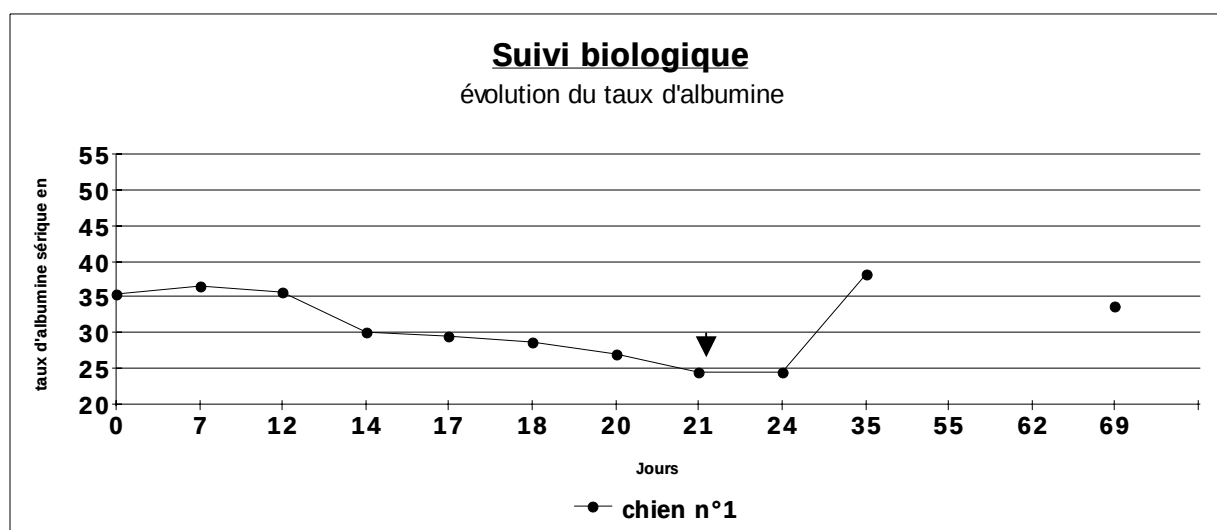
Figure 25 : Evolution des valeurs des enzymes hépatiques ASAT du chien n°1 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë (flèche : début du traitement)

De J0 à J24 , la quantité de protéines sériques totales diminue de 63 g/L à 53 g/L.

L'évolution du protidogramme se caractérise par l'apparition d'un léger pic de β globulines à J26 (14 g/L soit 27% des protéines totales contre 12% à J0 (Cf. Figure 26)) avec une hypoalbuminémie relative (45% à J21 contre 59% à J0 – Cf. Figure 27) et une diminution du rapport albumine/globuline (0,86 à J21 contre 1,4 à J0). Le taux de γ globulines reste lui dans les normes.



**Figure 26 : Evolution de la b taglobulin mie du chien n 1 atteint d'ehrlichiose
expérimentale aiguë (flèche : début du traitement)**



**Figure 27: Evolution de l'albuminémie sérique du chien n 1 atteint d'ehrlichiose
expérimentale aiguë (flèche : début du traitement)**

L'autopsie réalisée à J70 (22 jours après la fin du traitement) ne montre aucune modification macroscopique des organes, ni histologique des tissus, mise à part un phénomène congestif de la rate.

2.3.1.2 Guérison clinique par traitement

Le chien n°1 présente des symptômes à partir de J13, il est traité à partir de J21 avec de la doxycycline (10mg/kg/j, *per os*, 28 jours). Dès le lendemain, la température rectale est redevenue normale (38°C contre 39°C la veille), et la thrombocythémie se normalise également dès le deuxième jour du traitement (Cf. Figures 21 et 22).

L'hémoglobulinémie remonte dès le lendemain du début du traitement pour se normaliser à partir de J27 (6 jours après le début du traitement – Cf. Figure 24).

Le suivi biochimique met en évidence une légère élévation des valeurs des enzymes hépatiques : ASAT à J21 et ALAT à J24 avec stabilisation rapide dans les valeurs normales (Cf. Figure 25).

L'évolution du protidogramme montre une montée légère des β globulines (sans pour autant dépasser largement les normes) dans les 25 premiers jours suivant l'inoculation. Quelques jours après l'instauration du traitement, leur valeur redescend en dessous de 10g/L.

A J30, l'examen clinique du chiens conclut à la guérison sans séquelles.

On ne doit pas en conclure pour autant à la stérilisation du chien qui est alors un sujet asymptomatique contaminé. Il sera d'ailleurs prouvé que la bactériémie est cependant persistante au-delà du mois suivant l'arrêt du traitement (Cf. Deuxième Partie 5. 4.).

2.3.2 Ehrlichiose fruste

Le chien n°2 n'a présenté aucune modification clinique notable mise à part une adénomégalie discrète des ganglions poplités, ni aucune perturbation hématologique ou biochimique à la suite de l'inoculation (Cf. Figure 28). Devant l'échec probable du protocole d'inoculation, une deuxième inoculation est décidée 23 jours après la première : sans modification clinique elle non plus.

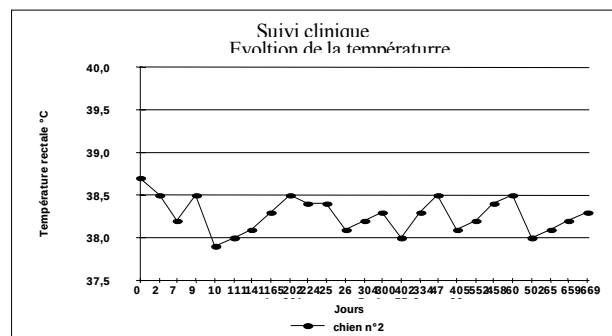
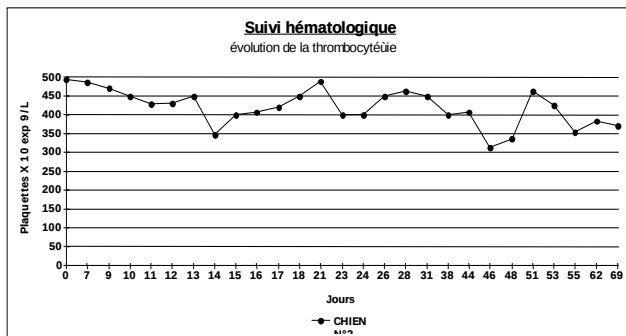


Figure 28 : Evolution de la thrombocytémie et de la température rectale du chien n°2 atteint d'ehrlichiose expérimentale asymptomatique

Pourtant, l'étude sérologique (Cf Deuxième Partie 3.3) et l'étude de la bactériémie par biologie moléculaire (Cf Deuxième Partie 5.3) prouvent la présence d'*Ehrlichia canis* : séroconversion du chien n°2 à J14 suivant la première inoculation, relance de l'activité immunitaire après la deuxième inoculation jusqu'au titre en anticorps de 1/640^e ; ainsi que positivité de la PCR dès J7 avec amorces spécifiques de l'espèce *E. canis*. Il s'agit donc d'une réaction asymptomatique de l'organisme vis-à-vis de la bactérie. Aucun traitement n'a donc été entrepris sur le chien n°2.

L'autopsie montre une splénomégalie d'origine congestive.

Les analyses anatomo-pathologiques ne concluent qu'à une adénopathie encapsulée sans remaniements inflammatoires.

2.3.3 Ehrlichioses aiguës passant à la chronicité et absence de résistance à la réinfection

Le chien n°4, déjà atteint par l'ehrlichiose et traité lors d'une étude précédente (1998), a présenté une hyperthermie dès J7 post-inoculation (39°4C par rapport au 38°2C des jours précédents), celle-ci s'est maintenue au-dessus de 39°3C pendant 15 jours, puis la température s'est normalisée sans traitement (Cf Figure 29).

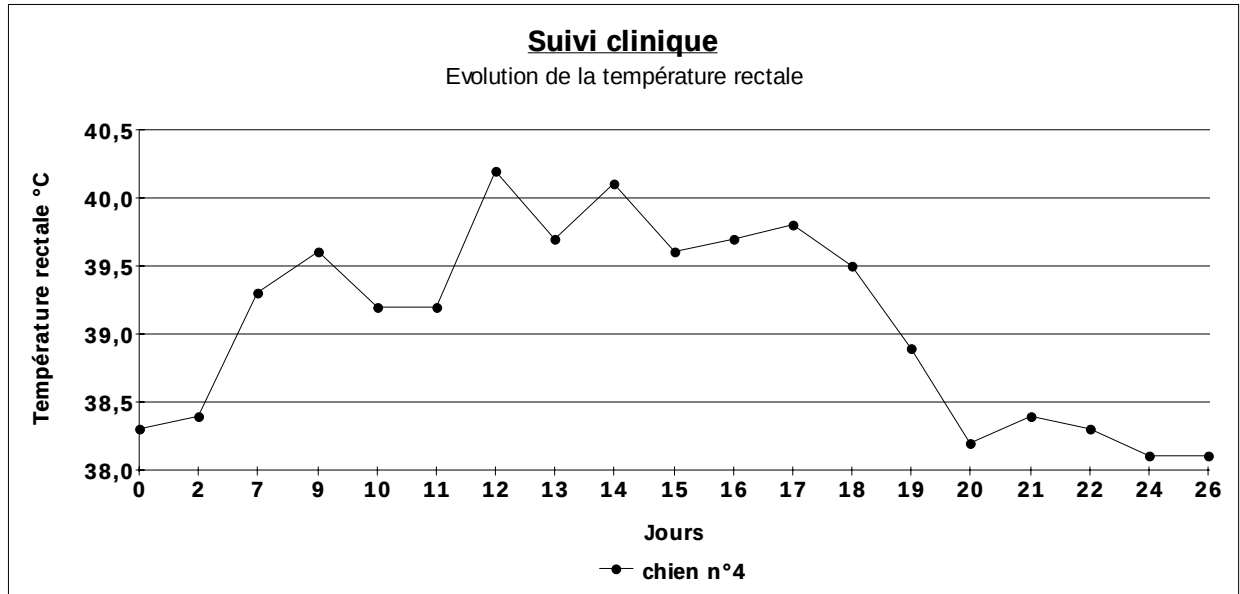


Figure 29 : Evolution de la température rectale du chien n°4 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë

A partir de J13 le chien était asthénique par période. Une hypertrophie ganglionnaire est notée à partir de J14-J15 ainsi qu'un léger jetage oculo-nasal.

A J22, le chien n°4 présentait à l'examen clinique un abdomen pendulaire tendu restant non douloureux à la palpation : aucun signe du flot n'est décelé, une hépatomégalie et/ou une splénomégalie sont suspectées. Elles sont toutes deux objectivées lors de l'autopsie (Cf Figures 30 et 31).



Figure 30 : Rate du chien n°4 (20 cm de longueur) (cliché S. JOURET)

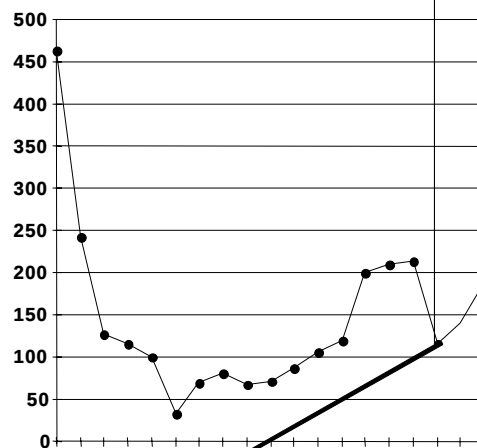


Figure 31 : Foie du chien n°4 (bombé, occupant tout l'abdomen crânial en repoussant les autres organes) (cliché S. JOURET)

Il n'a pas été noté d'anorexie durant cette phase initiale d'ehrlichiose aiguë .

En revanche, la thrombopénie a persisté durant toute cette période (Cf. Figure 32).

Suivi hématologique thrombocytémie



La leucopénie était importante et durable passant de $9,2 \cdot 10^9/L$ à J0 à $4 \cdot 10^9/L$ à J7 pour descendre jusqu'à $3,1 \cdot 10^9/L$ à J31 (Cf. Figure 33).

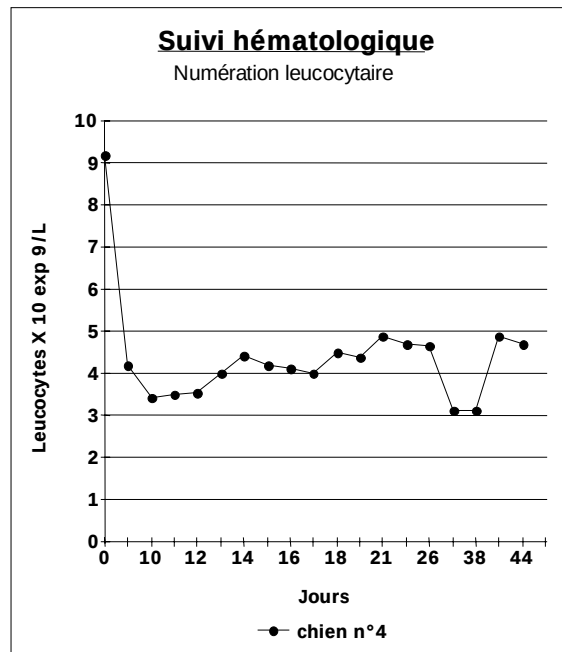


Figure 33 : Evolution de la numération leucocytaire du chien n°4 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë passant à la chronicité

L'anémie était elle aussi importante et durable : l'hémoglobinéme est descendue jusqu'à 8,9 g/dL à J21 (Cf. Figure 34).

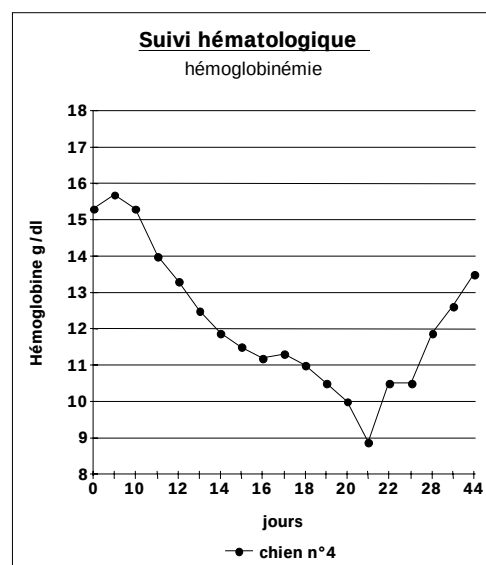


Figure 34 : Evolution de l'hémoglobinéme du chien n°4 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë passant à la chronicité

L'élévation des valeurs des enzymes hépatiques a concerné essentiellement les transaminases ALAT avec des valeurs au-dessus de 90 UI/L pendant 30 jours (passant de 60 UI/L à J0 à 126 UI/L à J7). L'augmentation des ASAT était plus faible. (58 UI/L à J14).

L'évolution du protidogramme a mis en évidence une augmentation des β globulines (16g/L à J18) et une hypoalbuminémie à 23 g/L à J17(Cf. Figure 35) Les γ globulines sont restées constantes avec une moyenne de 15%, ce qui n'est point caractéristique ; seule une légère élévation à J35 (avec 14,6 g/L – 22%) est notée.

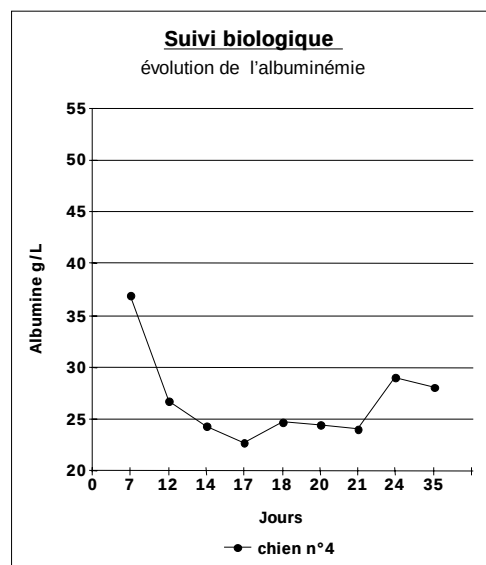


Figure 35 : Evolution de l'albuminémie du chien n°4 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë passant à la chronicité

Un mois après l'inoculation, le chien était apparemment en bonne santé malgré la pancytopénie persistante. L'ehrlichiose était passée à la chronicité.

A l'autopsie (J44), le foie, la rate étaient congestionnés (Cf. Figures 30 et 31). Les reins étaient macroscopiquement normaux. Les examens anatomopathologiques ont montré au niveau du foie, une hépatite lobulaire marquée (avec plasmocytose et hyperplasie des cellules de Küpffer) ; au niveau de la rate, un infiltrat plasmocytaire interstitiel ; au niveau des reins, une néphropathie interstitielle à infiltrat plasmocytaire ; au niveau des poumons, un infiltrat inflammatoire plasmocytaire. Les calques d'organes (foie, rate, poumons, reins) étaient eux négatifs en ce qui concerne la recherche de morulas d'*E. canis*.

Sur le nœud lymphatique mésentérique congestionné, une histiocytose a été notée (Cf. Figure 36).



Figure 36 : Coupe d'un ganglion mésentérique congestionné du chien n°4 (cliché S. JOURET)

2.3.4 Ehrlichiose aiguë suite à une inoculation sous-cutanée

Le chien n°3 a présenté une légère asthénie, s'accompagnant d'une anorexie et d'une hyperthermie, à J13 post-inoculation sous-cutanée dorsale. Il faut remarquer qu'aucune réaction n'a jamais été notée aux quatre sites d'injection dorsaux.

Le suivi clinique et hématologique du chien a permis de démontrer, comme chez le chien n°4, le passage à une ehrlichiose aiguë bénigne passant à la chronicité.

La pancytopénie était présente. La thrombopénie était plus tardive que chez le chien n°4 (thrombocytemie à $250.10^9/L$ à J12 pour J7 chez le chien n°4) ; le seuil inférieur est par contre à la même valeur. La leucopénie durable était comparable. L'anémie fut moins marquée chez le chien n°3 avec une chute de l'hémoglobininémie à 11 g/dL contre 8,8 g/dL chez le chien n°4.

L'élévation des ALAT a aussi été notée, ainsi que celle des β globulines.

L'autopsie à J44 révélait des lésions de plasmocytose généralisée semblables à celles observées chez le chien n°4.

2.4. Discussion

2.4.1 Aspects cliniques

Dans notre étude, l'ehrlichiose aiguë a été provoquée expérimentalement trois fois avec la souche Borgo (sur les chiens n°1,3 et 4). Nos observations corroborent les résultats des études précédentes sur cette souche qui concluaient aussi à une concordance de pathogénicité entre la souche Borgo et les premières souches étudiées par les auteurs américains (25,48,116).

- Les signes cliniques sont observés dans notre étude, en moyenne au 11^{ème} jour suivant l'inoculation sauf pour le chien n°4 ayant présenté des signes dès J7, plus précocement que l'écart généralement décrit dans les publications de 8 à 20 jours d'incubation (39).

Il est à noter que lors d'une inoculation expérimentale précédente, en 1998, sur le chien n°4, la durée d'incubation avait alors été de 13 jours. La souche Borgo provenait alors d'un chien infecté expérimentalement (3^{ème} passage à partir du chien princeps). On peut dès lors émettre trois hypothèses : soit celle d'un renforcement de la virulence de la bactérie après passages *in vivo* successifs soit celle d'une susceptibilité individuelle supérieure du donneur vis-à-vis de la souche ou encore celle d'une plus forte virulence du sang transfusé provenant du chien n°1, transmettant alors plus d'*Ehrlichia* au chien n°4, que celle du sang du donneur de 1998.

L'anorexie et l'asthénie ne sont pas constantes, ainsi que les signes hémorragiques même lors de chute importante des plaquettes (jusqu'à 38.10^9 plaquettes/L chez le chien n°1 à J21). Nous avons par contre noté une adénopathie des nœuds lymphatiques palpables chez les quatre chiens. Un jetage oculo-nasal est rencontré dans la moitié des cas de notre étude.

- L'hyperthermie est rencontrée dans les trois cas d'ehrlichiose aiguë mais n'est pas relevée chez le chien n°2 au cours des deux inoculations.

Il s'agit en effet d'un signe précoce qui peut être le seul symptôme apparent ; mais il est rare qu'il ne soit pas décrit lors de l'infection même si celle-ci n'est pas maladie, au sens symptomatique du terme.

- L'absence de modifications hématologiques, encore jamais décrite lorsqu'il y a séroconversion avérée, est encore plus intéressante à noter. En effet des formes aiguës frustes ont été décrites, des formes subcliniques (chroniques asymptomatiques et sans perturbations biochimiques) faisant suite à la phase aiguë en l'absence de traitement sur des chiens à défenses immunitaires suffisantes, mais jamais de forme , détectable uniquement par PCR et sérologie, d'infection sans maladie lors de la phase initiale de l'ehrlichiose (39).

Le cas du chien n°2, indemne de toute maladie infectieuse à son arrivée (notamment, statut immunitaire vis-à-vis de l'ehrlichiose connu), démontrerait alors l'existence de facteurs individuels de résistance qui permettrait un équilibre entre l'hôte et la bactérie : une résistance immunitaire naturelle.

Une autre hypothèse pourrait être avancée si la quantité de bactéries inoculées était infime ; dans ce cas, la plupart des microorganismes serait protégée des réactions de l'hôte dans les macrophages. Cependant le chien n°2 a été inoculé deux fois à 23 jours d'intervalle dont une

transfusion de sang du chien n°1 à J21 lorsque celui-ci présentait une hyperthermie de 39°9 C. Le potentiel infectieux de l'inocula ne fait donc pas de doute car la transfusion de sang du chien n°1 à J19 sur les chiens n°3 et 4 a été suivie de formes aiguës.

- Du point de vue hématologique dans les autres cas, la pancytopénie n'est pas constante mais la thrombopénie est présente chez les trois chiens symptomatiques. Selon différentes études statistiques, elle est retrouvée dans 70 à 100% des cas d'ehrlichiose aiguë (46,129). Elle constitue donc le témoin biologique le plus constant du développement de l'infection initiale à *Ehrlichia canis*. L'anémie est aussi retrouvée dans notre étude. La leucopénie, rencontrée lors de phase chronique de la maladie, est retrouvée chez les chiens n°1 et 2 (46). Aucune leucocytose n'est notée car notre étude porte sur une durée de 50 jours en moyenne post-inoculation et qu'il s'agit d'après la littérature d'un signe d'inflammation chronique lente et inconstante à se manifester, en cas de stimulation prolongée du système lymphoïde (44,138).

- Les résultats des examens biochimiques (augmentation des bêtaglobulines et des transaminases ALAT et ASAT) et anatomopathologiques (plasmocytose, hyperplasie des cellules de Küpffer) indiquent que l'infection aiguë est à l'origine d'une atteinte hépatique inflammatoire. L'élévation transitoire des transaminases traduit une nécrose des hépatocytes.

Notons l'absence d'augmentation des gammaglobulines alors qu'il y a plasmocytose avérée (les résultats anatomopathologiques signalent en effet une plasmocytose généralisée : au niveau du foie, des reins, de la rate, et des poumons sur deux chiens). La plasmocytose correspond pourtant fonctionnellement à une phase de sécrétion intense d'IgA et d'IgG.

L'hypergammaglobulinémie progressive, décrite comme assez caractéristique après un mois post-inoculation, n'est pas significative sur les cas que nous avons étudiés (27). Le chien n°4, le seul à présenter une légère élévation des gammaglobulines, n'avait déjà pas, lors du protocole d'inoculation expérimentale précédent en 1998, montré d'hypergammaglobulinémie interprétable (pic à 14g/L à J23). Notre étude ne portant que sur la phase aiguë et début de la phase chronique sur deux chiens (44 jours) ne permet pas de mettre en évidence l'hypergammaglobulinémie. Celle-ci n'est donc pas systématique ; la plasmocytose n'est pas toujours associée à une hypergammaglobulinémie.

L'hypoalbuminémie est en revanche décrite chez trois chiens. Elle est d'origine rénale, par fuite due à des lésions de néphrite interstitielle comme chez le chien n°3 (d'après

l'anatomopathologie) ou de glomérulonéphrite membranaire comme chez le chien n°4 (l'électrophorèse des protéines urinaires à J44 signe une protéinurie glomérulaire sélective) .

L'absence de morula sur les calques d'organes réalisés lors des autopsies à J44 peut s'expliquer par le manque de sensibilité de la technique de recherche (faible volume relatif à l'organe = faible probabilité de mise en évidence d'une morula).

2.4.2 Sensibilité à la réinfection

Les chiens n°3 et 4 séropositifs à J0 (titre en anticorps de $1/40^e$) sont sensibles à la réinfection. une51ieul

3. ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE

3.1 Objectifs

- L'analyse cinétique de la production d'anticorps spécifiques anti-*E. canis* sera réalisée sur les quatre chiens de notre étude par la méthode d'immunofluorescence indirecte (étude de la séroconversion, de la chute du taux sérique en anticorps après traitement, de l'évolution du titre en phase chronique).
- La comparaison, pour le dépistage sérologique de l'ehrlichiose, de l'immunofluorescence indirecte et du nouveau test d'immunomigration rapide (Witness *Ehrlichia* ®, Synbiotics, Europe) sera menée, dans le but de compléter les études françaises récemment publiées sur la sensibilité et la spécificité de ce test.
- Nous réaliserons la mise en parallèle des résultats sérologiques et des manifestations cliniques afin d'étudier l'influence de la réponse immune sur la pathogénicité de la bactérie et l'existence éventuelle de résistance immunitaire naturelle sur certains sujets.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Protocole de l'immunofluorescence indirecte (IFI)

Le principe de cette méthode de référence pour le diagnostic de l'ehrlichiose canine a été exposé dans la première partie (Cf. Première Partie 6.3.3.1).

3.2.1.1 Préparation des lames d' antigène

La préparation des lames à plots (Polylabo) est faite avec une solution de culture de 2.10^6 cellules MDH-SP/ mL, infectées *in vitro* (distribuées par Synbiotics Europe) (Cf. Première Partie 6.3.3.1) qui constitue l'antigène.

Confection des lames d'antigène

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- peser 250 mg d'albumine (BSA : albumine sérique d'origine bovine) dans un tube stérile- dissoudre dans 50 mL de Phosphate Buffered Saline (PBS, tampon 7,4 sans calcium ni magnésium : 1 sachet lyophilisé de PBS 10 mM dans 1 L d'eau ultra pure)- filtrer sur 0,22 μ- faire 2 lavages de la suspension cellulaire pour éliminer le formol de conservation avec le mélange PBS-BSA- reprendre 3 mL (soit 3 ampoules) de suspension cellulaire dans 10 mL de PBS-BSA- centrifuger 1500 rpm 10 min |
|---|

- ôter le surnageant
- dissocier très consciencieusement le culot à la pointe pour éviter les agrégats cellulaires
- ajuster la suspension cellulaire à 10^6 cellules/mL, par dilution au $\frac{1}{2}$ en PBS-BSA (cette numération suffit à des plots interprétables, elle provient de constatations empiriques)
- déposer 10 μ L par plot en remettant souvent en suspension, sur les lames préalablement préchauffées sur le bain marie sec à 40°C
- sécher à 40°C (étuve ventilée)
- placer les lames toute une nuit dans l'acétone à -20°C pour fixation
- les lames sont ensuite conservées à -20°C dans des boîtes de rangement en bois.

3.2.1.2 Etape qualitative du dépistage

La première étape du dépistage est purement qualitative. Elle permet de mettre en évidence les sérums positifs. Par plot, le pourcentage de cellules infectées par *E. canis* est d'environ 70%.

Dépistage qualitatif par IFI

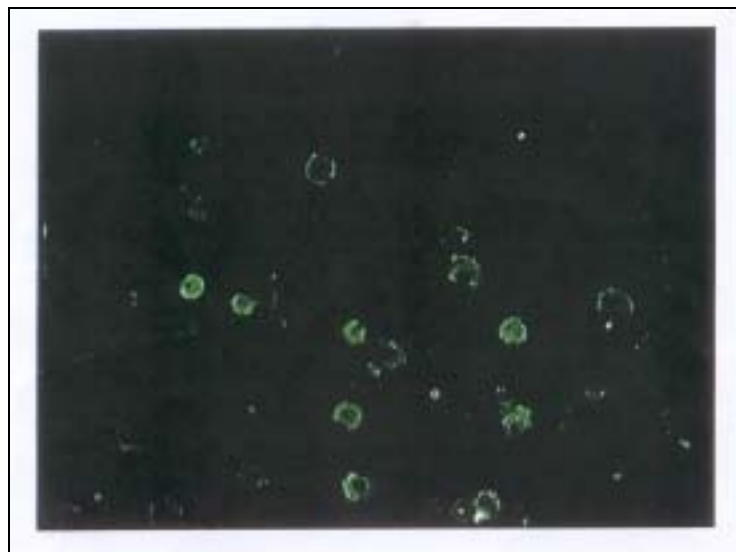
- sortir les lames du congélateur à -20°C, les sécher dans l'étuve ventilée
- numéroter les sérums à tester et les tubes Eppendorf® de 5mL stériles, sans oublier les témoins + et -
- mettre dans chaque tube stérile 450 μ L de PBS et 50 μ L de sérum à tester
- mettre à 56°C pendant 30' (phase de décomplémentation)
- peser 3 g de lait en poudre pour 50 mL de PBS et mélanger, afin de limiter les réactions aspécifiques
- mettre 500 μ L de PBS-lait dans chaque tube : la dilution initiale du sérum est donc 1/20 (50/1000)
- mettre à 37°C pendant 30'
- numéroter les lames à plots sèches
- mettre 10 μ L de chaque tube par plot
- disposer les lames dans une boîte à fond humide (dont le fond sera recouvert de papier essuie-tout imbibé d'eau)
- mettre à 37°C pendant 30'
- mettre les lames dans un bain de PBS Tween (500 μ L de Tween 20 dans 1L de PBS) pendant 5'

- changer de bain, remettre les lames dans un bain de PBS Tween pendant 5'
- mettre les lames dans un dernier bain de PBS pendant 5'
- sécher les lames à l'étuve ventilée
- préparer la solution de conjugué (anticorps seconds -fluorescéine) (distribué par Jackson ImmunoResearch Laboratories INC USA) au 150° (aliquote de 10,5 μ L dilué au $\frac{1}{2}$ dans 789,5 μ L de PBS pour 80 plots)
- à partir de la solution obtenue , déposer 10 μ L par plot
- mettre à 37°C pendant 30' dans la boîte à fond humide
- mettre les lames dans 2 bains successifs de PBS Tween de 5' chacun, puis de PBS 5'
- sécher les lames à l'étuve ventilée
- mettre quelques gouttes de Fluoprep® (milieu de montage fixateur pour immunofluorescence, composé de glycérine, d'alcool polyvinylique et de tampon tris) sur les lames et recouvrir d'une lamelle chaque lame
- faire la lecture au microscope à épifluorescence dès que possible, au grossissement 400. La préparation peut être conservée sans baisse de d'intensité de fluorescence pendant 72h à 2-8°C.

La lecture préalable des deux témoins (positif et négatif) est nécessaire. Si leur réponse est conforme, les résultats de la réaction sont interprétables.

Les cellules fluorescentes signifient une fixation d'anticorps sur les antigènes et donc la formation de complexes immuns Ac anti *E.canis* – Ac anti IgG marqués. La fluorescence en lumière ultraviolette (UV) de morulas dans le cytoplasme des cellules, sur plusieurs champs de vision à l'objectif 25 au microscope, témoigne d'un sérum considéré comme positif (Cf. Figure 37).

Toutefois, il faut faire attention aux artéfacts : des points fluorescents peuvent être visualisés mais ceux-ci ne sont pas dans le même plan que les cellules. On l'observe en faisant varier la mise au point.



**Figure 37 : Fluorescence de morulas intracytoplasmiques du chien n°1
Titre en anticorps 1/1280 microscope UV objectif 40 (cliché S. JOURET)**

Un sérum négatif ne présente aucune fluorescence ou une fluorescence discrète de l'ensemble du cytoplasme cellulaire.

Certains plots sont cependant douteux. Par souci de reproductibilité, le même observateur réalise l'ensemble de la lecture et se réfère toujours aux témoins.

Les sérums séropositifs subissent une quantification.

Les sérums séronégatifs sont déclarés comme provenant d'un animal indemne.

Les sérums douteux sont recontrôlés : en procédant à une vérification du sérum déjà testé (l'étape qualitative du dépistage est alors répétée), les animaux devant ensuite être reprélevés 15 jours plus tard pour surveiller l'évolution.

3.2.1.3 Etape quantitative de titrage

Cette deuxième étape ne concerne que les sérums positifs. Elle permet de connaître leur niveau de positivité : jusqu'à quelle dilution et donc jusqu'à quel titre en anticorps le sérum est positif.

Titration des sérums positifs par IFI

- sortir les lames du congélateur à -20°C et les tubes contenant les sérums dilués au 1/20 (PBS-lait) du réfrigérateur. Ne pas oublier les témoins.
- réaliser les dilutions 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 & 1/5120 sur des plaques de microtitration ELISA à 96 puits (principe des dilutions : 100 μL de PBS et 100 μL de sérum dilué au 1/20 permettent d'obtenir une nouvelle dilution au demi : 1/40. 50 μL de cette dilution sont prélevés et transférés dans 150 μL de PBS permettant ainsi une dilution au quart du premier puits, soit 1/160 et ainsi de suite ...)
- déposer sur une lame séchée et numérotée au préalable 10 μL de 6 plots dilués (pour les faibles positifs, les dilutions 1/20, 1/40 & 1/80 suffisent)
- mettre à 37°C pendant 30' dans la boîte à fond humide
- mettre les lames dans 3 bains successifs (PBS Tween 5' - 5' puis PBS 5')
- sécher les lames à l'étuve ventilée
- préparer la solution de conjugué (même formule que lors de l'étape facultative)
- déposer 10 μL de solution par plot
- mettre à 37°C pendant 30' dans la boîte à fond humide
- mettre les lames dans 3 bains successifs (PBS Tween 5' - 5' puis PBS 5')
- sécher les lames à l'étuve ventilée
- fixer les lamelles au Fluoprep

L'étape quantitative constitue la lecture définitive. Après vérification des deux témoins, dont le témoin positif dilué 6 fois, la lecture s'effectue par ligne pour chaque sérum. Tous les plots sont observés pour éviter les erreurs, notamment si une dilution plus faible redevient positive après un plot négatif, la validité du plot est alors douteuse.

La dilution du dernier plot positif correspondait au titre du sérum en anticorps spécifiques anti - *E. canis*.

3.2.2 Test d'immunomigration rapide

Le principe de cette méthode a été décrit dans la première partie (Cf. 6.3.3.3)

Protocole d'utilisation de l'IMR

- prélever du sang du chien à tester
- déposer 1 goutte de l'échantillon (sang total, sérum ou plasma) dans le puits
- déposer à la suite 3 gouttes de tampon fourni dans le kit du test
- attendre 10 minutes
- lecture : 1 bande rose au niveau de la fenêtre visuelle : témoin : chien à sérologie négative
2 bandes roses : témoin + sérum : chien à sérologie positive

3.3 Résultats

3.3.1 Analyse cinétique de la production d'anticorps

3.3.1.1 Cinétique des anticorps chez un sujet naïf avant et après traitement

Les anticorps spécifiques d'*E. canis* sont apparus chez le chien n°1 à J13 (1/320). La séropositivité s'est maintenue à un taux élevé ($\geq 1/1280$) jusqu'à J45 (Cf. Figure 38).

Le titre a chuté de deux dilutions (1/320) 17 jours après la fin du traitement d'un mois à la doxycycline.

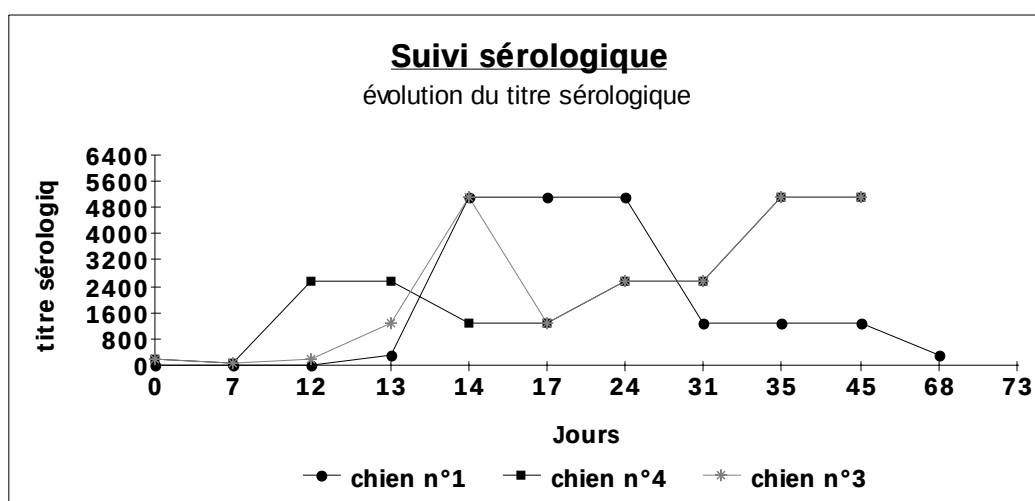


Figure 38 : Evolution du taux en anticorps des chiens n°1, 3 et 4

3.3.1.2 Cinétique des anticorps chez des sujets séropositifs

Chez les chiens n°3 inoculé en sous-cutanée et n°4 inoculé en intra-veineuse (atteints d'ehrlichiose et traités en 1998), l'augmentation du titre en anticorps faisant suite à l'inoculation de 2001 a été constatée entre J7 et J12. L'élévation du taux en anticorps était plus brutale chez le chien n°4 : passage de 1/40 à J0 à 1/2560 à J12 (pour une progression de 1/40 à J0 à 1/160 à J12 chez le chien n°3). Elle a été durable dans les deux cas (titre ≥ 1280 jusqu'à J44) (Cf. Figure 38).

3.3.1.3 Séroconversion chez un sujet naïf à forme fruste

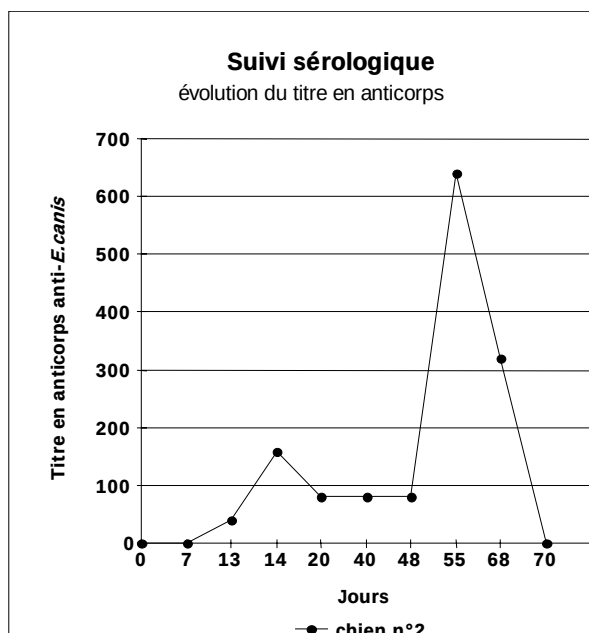


Figure 39 : Evolution du taux en anticorps chez le chien n°2 atteint d'ehrlichiose expérimentale asymptomatique

La séroconversion a eu lieu chez le chien n°2 entre J13 et J14 suivant la première inoculation intraveineuse. Les titres sont restés faiblement positifs jusqu'à J48 ($\leq 1/160$). Neuf jours après la seconde inoculation intraveineuse (effectuée à J46), le titre s'est élevé à 1/640 et 24 jours après (J70), on ne détectait plus d'anticorps (Cf. Figure 39).

3.3.2 Analyse du taux de lymphocytes

Le chien n°2 a présenté des taux de lymphocytes supérieurs aux normes (12-30 %) durant toute la durée de notre étude. Un pic du taux lymphocytaire a été noté après la deuxième inoculation à J43 (Cf. Figure 40). En revanche, les trois autres chiens n'ont pas présenté de lymphocytose. Les numérations formules sanguines des chiens n° 3 et 4 étaient semblables à celle du chien n°1.

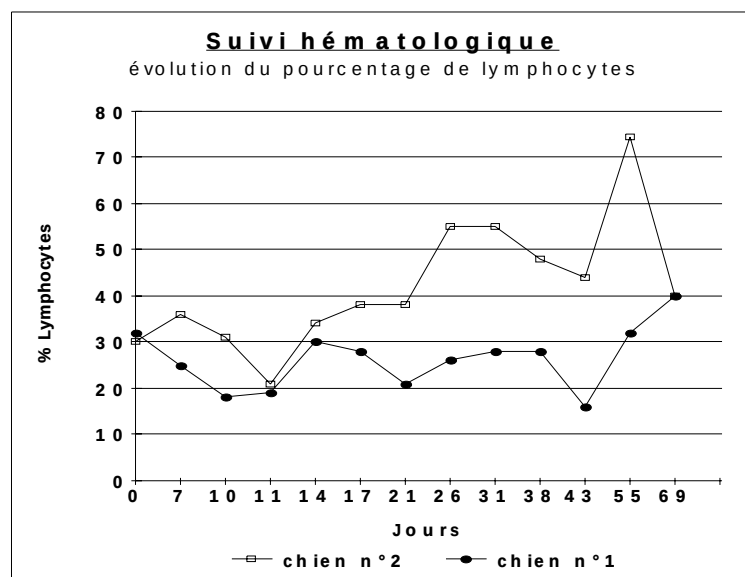


Figure 40 : Evolution du pourcentage de lymphocytes chez les chiens n°2 et n°1

3.3.3 Comparaison de l'IFI et du test d'immunomigration rapide

Dans le cadre de l'inoculation sur des sujets naïfs, le test d'immunomigration rapide (IMR) donnait un résultat positif à J17 pour un titre de 1/5120 chez le chien n°1 (IFI positive à J13) et à J24 pour un titre de 1/80 pour le chien n°2 (IFI positive à J13) (Cf Tableau III).

Tableau III : Comparaison des résultats de l'IFI et de l'IMR concernant les chiens n°1 et 2

Jours après inoculation	Chien n°1		Chien n°2	
	IFI	IMR	IFI	IMR
0	-	-	-	-
7	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	+1/320e	-	+ 1/40e	-
14	+1/5120e	-	+1/160e	-
17	+1/5120e	+	+1/80e	-
19	+1/1280 ^e	+	+1/80e	-
24	+1/5120e	+	+1/80e	+

3.3.4 Corrélation entre résultats sérologiques et manifestations cliniques

3.3.4.1 Cas d'ehrlichiose aiguë traitée

Chez le chien n°1, la séroconversion a eu lieu en même temps que l'apparition de l'hyperthermie et de la thrombopénie à J13 (Cf Figures 41 et 42). La température et la thrombopénie ont rétrocedé immédiatement après la prise du traitement, alors que les anticorps se maintenaient à des titres élevés ($\geq 1/1280$) jusqu'au 24^{ème} jour de traitement.

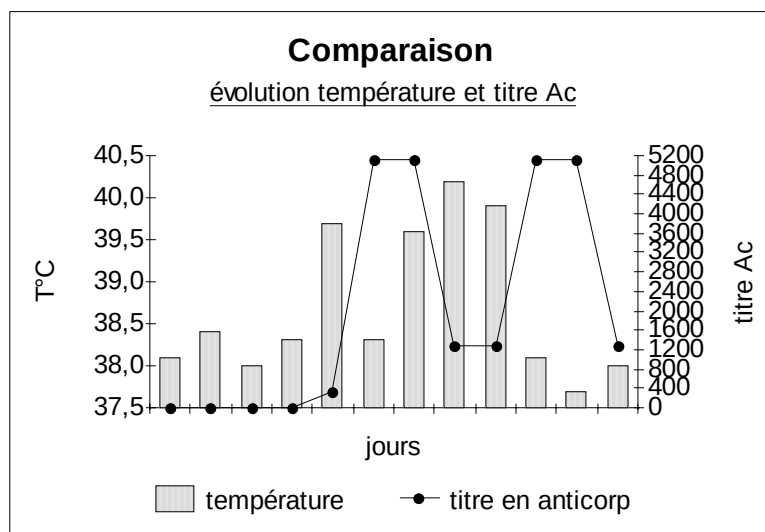


Figure 41 : Comparaison de l'évolution de la température rectale et du titre en anticorps du chien n°1 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë

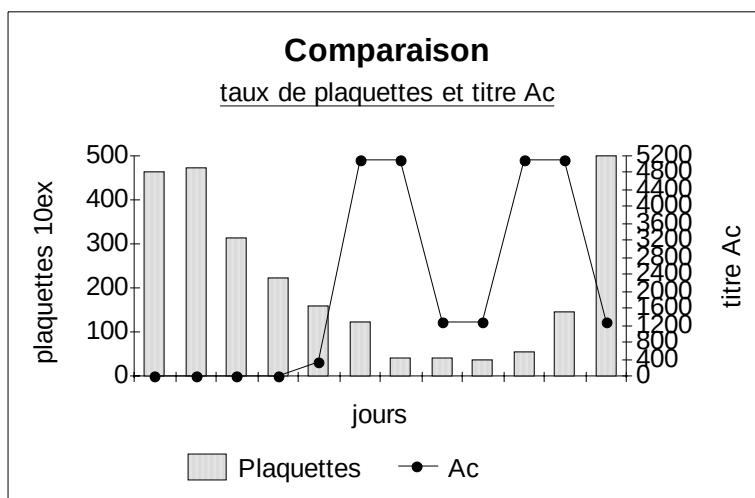


Figure 42 : Comparaison de l'évolution de la thrombocyttémie et du titre en anticorps du chien n°1 atteint d'ehrlichiose expérimentale aiguë

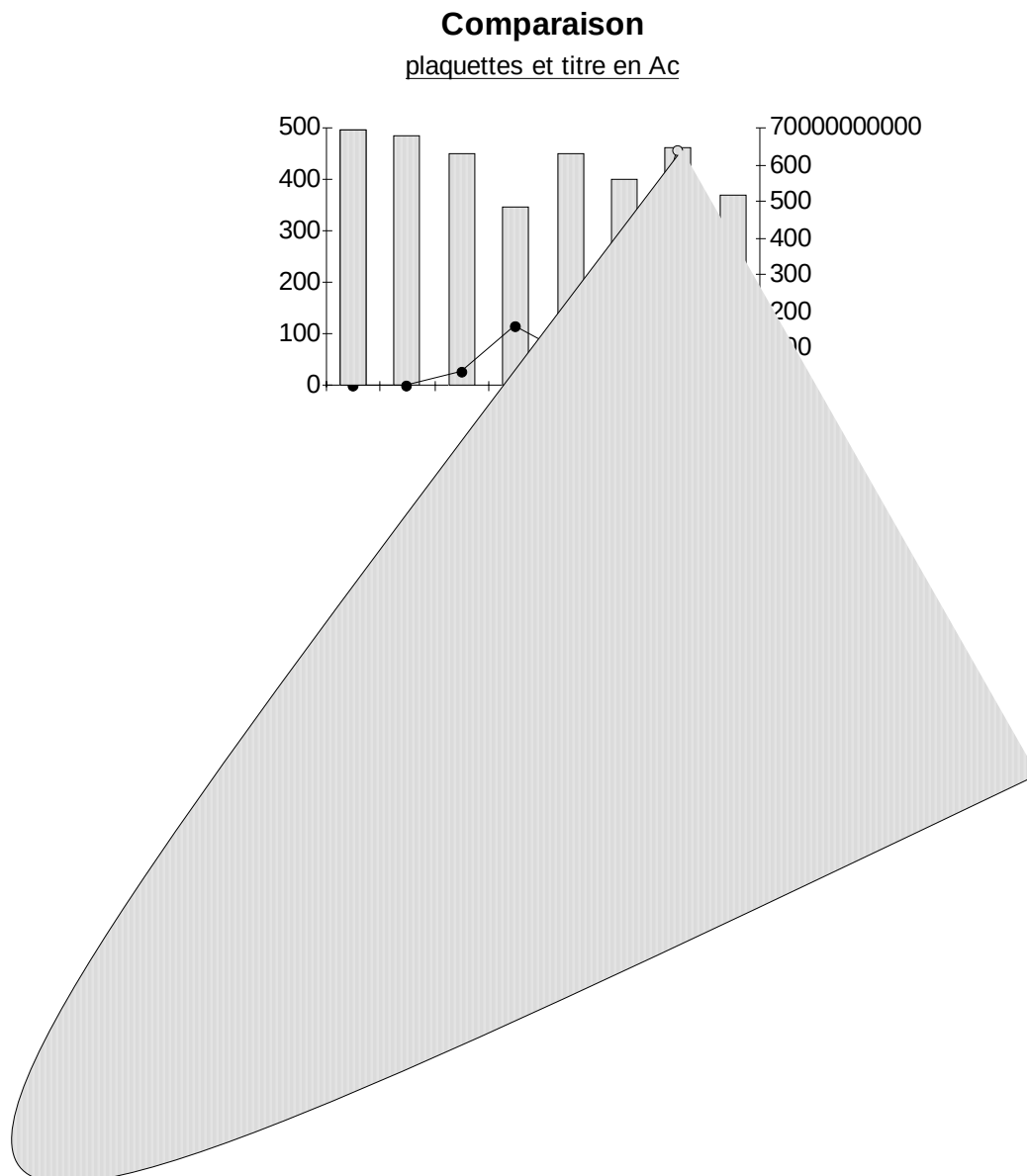
3.3.4.2 Cas d'ehrlichiose aiguë de sujets séropositifs

Chez le chien n°4, l'hyperthermie et la thrombopénie se sont manifestées au moment de l'augmentation du titre sérologique respectivement à J7 et J9.

Chez le chien n°3, l'hyperthermie et la thrombopénie ont été effectives après l'augmentation du titre sérologique, respectivement à J15 et J13.

3.3.4.3 Cas d'ehrlichiose fruste

Chez le chien n°2, la séroconversion ne s'est pas accompagnée de thrombopénie, (Cf. Figure 43) ni de modification clinique (pas d'hyperthermie).



et al. en 1994, lorsqu'un traitement est totalement efficace, la production d'anticorps s'interrompt (45). Les anticorps ayant une demi-vie d'environ 21 jours, le titre sérologique diminue logiquement, en moyenne, d'une dilution toutes les trois semaines. Cependant une séropositivité résiduelle peut persister plusieurs années après le traitement, comme c'est le cas pour les chiens n°3 et n°4 (traités en 1998 et séropositifs au 1/40 avant notre inoculation, de 2001).

- Dans notre étude, la voie d'inoculation ne semble pas avoir d'influence sur le délai de séroconversion, alors que nous avons rapporté des différences dans l'apparition des modifications hématologiques (Cf. Deuxième Partie 2.4.3.).

Le délai de séroconversion est en effet identique chez les chiens n°3 inoculé par voie sous-cutanée et n°4 inoculé par voie intra-veineuse, contrairement à ce que décrivait GAUNT *et al.* en 1996 (68). Cet auteur rapportait alors un délai de 14 à 18 jours post-inoculation pour la voie sous-cutanée contre 7 à 14 pour la voie intra-veineuse. Il faut cependant être prudent sur notre interprétation :

- d'une part car il s'agit de chiens séropositifs. Une réinoculation provoque alors une relance de l'activité imm Tc8 Tm(m)Tj12.e(cu0,provbablm)Tj12.0031 0 0 12.0031 3493.9

celui de la population témoin (46). Par contre, lors d'ehrlichiose chronique, la lymphocytose est parfois décrite. Elle proviendrait d'une stimulation prolongée du système lymphoïde. Il s'agit alors d'une lymphocytose modérée à lymphocytes atypiques à granulations (138).

La lymphocytose du chien n°2 de notre étude apparaît donc précoce. La relance de l'activité immunitaire suite à la deuxième inoculation (J23 après la première) pourrait être à l'origine d'une cytotoxicité accrue à médiation cellulaire dirigée contre les cellules mononucléées infectées.

Les autres chiens n'ont pas développé de lymphocytose réactionnelle, contrairement au chien n°2, n'ayant lui pas présenté de forme clinique ni biologique en s'étant pourtant séroconverti.

L'hypothèse de l'existence de facteurs individuels de sensibilité en fonction du statut immunitaire est donc à évoquer. Les chiens n°1 et n°2, tous deux naïfs et provenant de la même portée, n'ont en effet pas réagi à l'inoculation de la même façon. Toutefois, les *inocula*, de souche certes identique, provenaient de chiens différents. Une disparité de pathogénicité entre les passages successifs *in vivo* de la souche pourrait aussi influencer sur le développement de la maladie. Une étude précise des caractéristiques de la réponse immunitaire chez le chien n°2 par phénotypage des lymphocytes aurait été instructive.

- On ne peut d'après nos résultats, établir de corrélation entre la quantité d'anticorps spécifiques anti-*E. canis* produits et les manifestations cliniques. L'apparition des symptômes cliniques par rapport à la séroconversion est différente chez les trois types de réponse de nos chiens (chien n°1 : naïf réagissant par une ehrlichiose aiguë, chien n°2 : naïf présentant une forme fruste, chiens n°3 et 4 : séropositifs ne résistant pas à une réinfection). Cette différence ne paraît pas significative contrairement aux conclusions de l'étude de DAVOUST *et al.* 1991, portant sur huit inoculations, qui montraient une thrombopénie précédant systématiquement la séroconversion (48). WANER *et al.* en 1996 démontraient aussi que la chute des plaquettes puis les signes cliniques précédaient la séroconversion, elle-même antérieure à la détection de l'antigène dans le plasma par ELISA (134).

3.4.2 Evaluation du test d'immunomigration rapide (IMR)

- Le test IMR donne un résultat positif plus tardivement que l'immunofluorescence indirecte (IFI) (Cf. Deuxième Partie 3.3.3), ce qui confirme les conclusions de l'étude de DAVOUST *et al.* en 2000 pour lesquelles l'IMR était positif à partir de J15 pour une IFI efficace entre J9 et J12 (41).
- Cette même étude donnait une valeur prédictive négative sur sérum de 90,5% (41). Les faux négatifs provenaient des sérums à titres faibles entre 1/40 et 1/160. Il a effectivement été noté dans notre étude un faux négatif en IMR sur le sérum du chien n°2 à J20 positif en IFI au 1/80 (41).

Aucun faux négatif sur sérum à titre élevé n'avait été décrit lors de l'essai en 2000. En revanche, un sérum positif au 1/5120^e du chien n°1 à J17, testé immédiatement après collecte du sang et centrifugation, s'est révélé négatif dans notre suivi sérologique (confirmation par deux test Witness® sur ce sérum). Après dilution du sérum initial au tiers avec de l'eau distillée, le test était positif.

Nous avons réitéré le test au laboratoire plusieurs jours après la collecte, après stockage du sérum initial à -20°C. L'IMR donnait alors un résultat positif sans nécessiter de dilution. Il s'agirait d'un phénomène d'interférence, qui serait donc apparemment labile à la congélation. Suite à cette observation, il est dès lors possible d'exclure une interférence de nature immunologique endogène et ainsi d'éliminer l'hypothèse du « phénomène de zone », défini comme une diminution de la réponse spécifique pour les fortes concentrations d'analyte, sans perte de détectabilité à faible concentration (58). Pour expliquer cette variation de résultats dans le temps, l'instabilité des composants du complément et de la chaîne de coagulation peut être avancée. En effet ces composés sériques sont instables dans le temps et vis-à-vis de la température. Ils peuvent alors interférer dans les étapes immunologiques du test, surtout sur des échantillons de sérum testés peu de temps après collecte. Cette interférence peut être prévenue par la dilution de l'échantillon (31). Ces observations décrites par CECCHINI *et al.* en 1992, semblent correspondre au phénomène observé dans notre étude.

4. ETUDE IN VITRO

4.1 Objectifs

La culture d'*Ehrlichia canis* permettra :

- d'étudier cette bactérie in vitro pour compléter les connaissances actuelles sur sa multiplication, sa morphologie ;
- de recueillir l'antigène pour réaliser le sérodiagnostic de manière autonome (confection de lames à antigène pour l'immunofluorescence) ;
- de produire la bactérie de la souche Borgo en quantité, pour envisager sa caractérisation génétique après purification. La culture permettrait d'éviter les prélèvements sanguins itératifs de chiens infectés et les leucoconcentrations successives.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Culture cellulaire

4.2.1.1 Equipement du laboratoire

Les manipulations de culture cellulaire sont effectuées dans un laboratoire à environnement contrôlé. Il s'agit d'un poste de sécurité microbiologique de type P2 avec air conditionné (filtration au soufflage et à l'extraction) maintien du local en dépression ; accès réglementé par l'intermédiaire d'un sas à double compartiment ; tenue de travail spéciale : chaussons, blouse, gants (si manipulation de sang) ; manipulation stérile sous hotte à flux laminaire et circuit de décontamination des déchets.

4.2.1.2 Lignées cellulaires support de culture d'*Ehrlichia canis*

De nombreuses études *in vitro* ont été menées sur les *Ehrlichia*, germes intracellulaires obligatoires, spécifiques d'espèce pour la plupart. Leur culture reste délicate (Cf. Première Partie 1.4). *Ehrlichia canis* n'infecte pour sa part que les cellules de chien. Les cultures monocytaires primaires, d'un coût trop élevé, ont été ici remplacées par des cellules « macrophage-like » permettant une propagation massive.

Nous avons choisi deux lignées cellulaires continues, décrites dans la littérature depuis 10 ans et reconnues efficaces comme support de culture d'*E. canis* :

• **la lignée MDH-SP, lignée cellulaire immortelle hybride, de macrophages péritonéaux de souris et de monocytes canins sanguins (81) :**

- provenance : Synbiotics Europe (référence Master C. Bank 26/07/99 4^{ème} passage),
- milieu de culture : Milieu à sels de Hank's supplémenté (Cf. Deuxième Partie 4.2.1.3),
- conditions de culture : incubateur à 37°C sous atmosphère contrôlée, 5 % CO₂, 95 % d'air atmosphérique, 90 % d'hygrométrie,
- morphologie : type monocytes (cellules rondes), cellules adhérentes,
- caryotype de type hétéropleïde.

• **la lignée DH82, lignée cellulaire immortelle « macrophage-like » issue d'un chien à histiocytose maligne (50,139) :**

- provenance : ATCC USA (référence CRL-10389),
- milieu de culture : DMEM supplémenté (Cf. Deuxième Partie 4.2.1.3),
- conditions de culture : 37°C, 5 % CO₂, 95 % air atmosphérique, 90 % d'hygrométrie,
- morphologie : type monocytes, cellules adhérentes de morphologie et de taille très hétérogènes, à cytoplasme basophile abondant avec des granulations éosinophiles irrégulières et des vacuoles,
- caryotype de type hétéropleïde.

Des tests de stérilité ont été effectués sur ces cellules avant livraison : elles sont indemnes de contamination bactérienne, fongique et mycoplasmaïque.

4.2.1.3 Milieus de culture

Les cellules sont cultivées dans un milieu de base contenant une solution saline équilibrée : tampon et sels minéraux (Hank's ou Earle pour tamponner le milieu à pH 7,2-7,4 afin d'éviter une rupture de la membrane plasmique sous l'effet de la pression osmotique), acides aminés, vitamines, sucres, glutamine, hormones, indicateur de pH.

Les milieux sont ensuite enrichis par des suppléments nécessaires à la croissance et à la multiplication cellulaire, le plus souvent du sérum de veau fœtal qui permet aussi une meilleure

adhésion des cellules au support lors de cultures adhérentes. Nous avons choisi d'ajouter également des antibiotiques pour éviter les contaminations.

• **pour les cellules MDH-SP :**

Le milieu de base est le 199 à sels de Hank's, auquel on ajoute, pour 1L, 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté 30 minutes à 56°C, 2mM de L-Glutamine, 1M de tampon Hepes

(Acide N-2-Hydroxy-Ethyl-Piperazine N-r-éthane sulfonique), 22 mL de bicarbonate de sodium à 7,5% et 50 mg d'érythromycine.

• **pour les cellules DH82 :**

Le milieu de base est le DMEM à sels d'Earle's (Dulbecco's Modified Eagle Medium), auquel on ajoute, pour 1 litre, 15% de SVF décomplémenté, 1 mL de 2-mercaptoéthanol, 1mM de Pyruvate de sodium, 1,2g de bicarbonate de sodium et un mélange antibiotique pénicilline-streptomycine.

Protocole de préparation des milieux de culture

- verser les différents réactifs dans le volume d'eau bidistillée Aqueuant stérile correspondant à 1L moins le volume de SVF ajouté à l'emploi (soit 100 mL pour les MDH-SP et 150 mL pour les DH82)
- dissoudre soigneusement sous agitation magnétique les différents réactifs dans les 900 ou 850 mL d'eau stérile
- contrôler le pH (celui-ci doit s'équilibrer autour de 7,2-7,4)
- filtrer stérilement sous hotte à flux laminaire sur filtre Millipore de 0,22 µ en répartissant en flacons stériles (aliquotes de 100-200 mL)
- étiqueter les flacons (nom du milieu avec précision des additifs, date de préparation, ajout ou non du SVF, nom du manipulateur)
- stocker à +4°C le flacon à usage immédiat, à -20°C les aliquotes à conserver
- au moment de l'emploi, le milieu est supplémenté en SVF décomplémenté
- remarques : * des précautions doivent être prises pour la filtration : nettoyage de la pompe avant et après usage à l'eau stérile
 - * un flacon de bicarbonate de sodium ouvert à +4°C doit être utilisé dans les 7 jours (noter la date d'ouverture)
 - * la L-glutamine doit se conserver aliquotée à -20°C. Elle est détruite à +4°C au bout de 21 jours, et à +37°C en quelques jours. Ses produits de dégradation sont inactifs et peuvent être toxiques (dater et si besoin supplémenter le milieu en glutamine).
 - * les milieux ne doivent être sortis que pour le temps nécessaire au travail : certains de leurs composants sont sensibles à l'effet de la lumière.
 - * les milieux doivent être éliminés si leur couleur devient pourpre (alcalinisation) ou jaune (contamination bactérienne)

• **Choix des antibiotiques :** De nombreuses publications sur l'ehrlichiose monocyttaire canine relatent la mise en culture de la bactérie sans antibiotique (52,68), d'autres témoignent de la réussite de l'étude *in vitro* en présence de streptomycine (84) ou d'érythromycine (Synbiotics Europe fournisseur des cellules MDH-SP). La pénicilline a également été décrite de part son large spectre et sa diffusion extracellulaire, qui n'atteint donc pas les *Ehrlichia* intramonocytaires. Une récente étude *in vitro* (2001), a par ailleurs démontré une résistance naturelle d'*E. canis* vis-à-vis des fluoroquinolones (102).

Nous avons choisi d'employer l'érythromycine à l'inactivité prouvée vis-à-vis d'*E.canis* (65). Ce macrolide est conseillé et testé par le fournisseur de nos cellules support. .

4.2.1.4 Techniques de base en culture cellulaire

• Les techniques de culture sont contraignantes et demandent beaucoup de rigueur. La conservation par congélation permet de limiter les manipulations. En effet le repiquage de culture (qui correspond au transfert des cellules dans de nouvelles flasques) présente le triple inconvénient de prendre beaucoup de temps, d'augmenter les risques de prolifération de cellules non souhaitées (telles que les fibroblastes ou pire de contamination bactérienne), et de pouvoir engendrer des déviations génétiques au sein des cellules.

Protocole de congélation

- préparer la solution de congélation à l'avance, l'aliquoter et la conserver à -20°C : 5% de Diméthyl Sulfoxyde (DMSO) filtré à la seringue sur 0,22 μ , et 95% de SVF
- décongélation de la solution dans la glace fondante
- remettre en suspension les cellules, faire une numération à la cellule de Malassez pour décider du nombre de flasques nécessaires à la congélation d'une ampoule : un congelat doit contenir au moins 5.10^4 cellules/mL (pour les MDH-SP, les ampoules ont été faites à partir de 1.10^6 cellules/mL ; pour les DH82, à partir de 3.10^6 cellules/mL)
- centrifuger 10 min à $+4^{\circ}\text{C}$ à 400g et éliminer le surnageant
- reprendre le culot cellulaire dans la solution de congélation
- répartir la suspension cellulaire dans des cryotubes à raison de 1 mL par tube
- réaliser la congélation des cellules de façon très progressive car le refroidissement des cellules est l'étape clé de la cryoconservation. Un refroidissement uniforme à une vitesse de 0,5 à $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ est optimal.
- stocker les cryotubes à -80°C pendant 24h au moins avant de les transférer à -180°C dans l'azote liquide où ils peuvent alors être conservés plusieurs années.

La mise en culture de nos lignées a été effectuée suivant un protocole, qui lui aussi est standardisé. La décongélation doit être effectuée très rapidement pour respecter la viabilité des cellules.

Protocole de décongélation-remise en culture

- faire chauffer le bain-marie à 37°C
- préparer la hotte et le matériel nécessaire de façon à ne pas perdre de temps
- décongeler rapidement l'ampoule à sa sortie du cryoconservateur en la plongeant dans le bain-marie à 37°C (attention que le bouchon ne soit pas en contact avec le liquide) ne pas la laisser plus d'une minute
- verser lentement 10 mL de milieu complet (SVF ajouté) dans un tube de culture cellulaire (il permet d'éliminer les agents conservateurs contenus dans l'ampoule : DMSO, qui est toxique pour les cellules à 37°C)
- transférer soigneusement la suspension cellulaire liquéfiée dans le tube (faire des va et viens avec la pipette pour ne perdre aucune des cellules accolées au paroi de l'ampoule)
- homogénéiser
- centrifuger 10 min à $+4^{\circ}\text{C}$ à 400g
- ôter délicatement le surnageant
- reprendre le culot dans du milieu de culture complet et ensemercer à une densité cellulaire connue (pour les MDH-SP : 1.10^5)

cellules/mL, pour les DH82 : 1.10^6 cellules/mL) dans une flasque de 25 cm²

- mettre en culture à 37°C en étuve à 5% de CO₂ (ne pas oublier « d'ouvrir » partiellement le bouchon de la flasque pour permettre les échanges gazeux

- Les deux lignées cellulaires ont présenté des croissances de vitesse différente : atteinte de la confluence en 72h pour les MDH-SP, en 48h pour les DH82. A confluence la division a été effectuée soit par trypsination sur cultures saines, soit par grattage sur cultures supposées infectées par *E. canis*.

La trypsine est l'enzyme protéolytique qui détruit entre autre les lésions intercellulaires permettant ainsi l'individualisation des cellules. L'activité optimale de la trypsine est observée à 37°C, dans une zone de pH comprise entre 7,6 et 7,8. Pour que la trypsination soit rapide, tous les produits ont été thermostatés à 37°C avant leur utilisation.

Protocole de trypsination

- retirer le milieu de culture
- remettre rapidement 10 mL de PBS de lavage (sans calcium, ni magnésium, ni bicarbonate de sodium), agiter délicatement la flasque par mouvements horizontaux, et aspirer le liquide
- mettre 2 ou 4 mL (flasque de 25 ou 75 cm²) de Trypsine -EDTA, agiter délicatement
- laisser incuber 3 min à 37°C dans l'étuve (bouchon « ouvert ») jusqu'à décolllement des cellules
- ajouter 10 mL de PBS d'arrêt (avec calcium et magnésium : qui neutralise plus rapidement la trypsine) et agiter
- transférer la suspension cellulaire dans un tube de 15 mL
- centrifuger 5 min à +4°C à 400g
- aspirer le surnageant et reprendre le culot cellulaire dans 2 mL de milieu complet
- faire une numération à la cellule de Malassez et réensemencer dans 2, voire 3 flasques selon la densité désirée

4.2.2 Isolement des *Ehrlichia*

4.2.2.1 Prélèvements de sang infecté

Ils ont été effectués sur les quatre chiens de notre étude. Après tonte et désinfection à la Bétadine N.D. diluée, le sang prélevé, par ponction veineuse jugulaire est recueilli sur des tubes vacutainer à EDTA (dont la partie externe du bouchon a préalablement été désinfectée à l'alcool). Environ 15 mL sont prélevés par jour pendant les phases aiguës des chiens n°1, 3 et 4 (soit respectivement entre J13 et J20, J15 et J23, J7 et J20).

4.2.2.2 Séparation des monocytes

Le but est d'isoler les cellules mononucléées dans lesquelles se trouvent les *Ehrlichia*. Le sang prélevé est traité dans les 2h suivant la ponction ou congelé à -20°C pendant 24h.

Nous avons choisi d'utiliser l'Histopaque-1077 ® (Sigma, France) comme produit de séparation : il est composé de polysucrose à 5,7g/L et de diatrizoate de sodium à 9,0g/L.

Nous avons essayé aussi les tubes Leucosep[®] (Polylabo, France) de 50 mL à fond conique spécialement conçus pour la séparation des cellules mononucléées et constitués d'une barrière poreuse qui facilite le partage.

Protocole de leucoconcentration

- mettre 7,5 mL d'Histopaque[®] dans le Leucosep[®] de 50 mL
- centrifuger 1 min à 3000tr/min (= 1600 g) pour faire passer le produit de séparation sous la barrière poreuse
- ajouter les 15 mL de sang prélevés
- centrifuger 10 min à 3000tr/min (Cf. Figure 44)
- récupérer la couche de cellules mononucléées (légèrement plus opaque, sous le plasma) délicatement, la transférer dans un tube conique de 15 mL
- faire un lavage : ajouter 10 mL PBS (sans Calcium, ni Magnésium) , centrifuger 10 min à 1300 tr/min, éliminer le surnageant
- reprendre le culot cellulaire dans 10 mL de PBS pour un 2^{ème} lavage, centrifuger 10 min à 1300tr/min, éliminer le surnageant
- reprendre le culot dans 2 mL de milieu de culture et déposer la suspension dans les flasques après numération à la cellule de Malassez

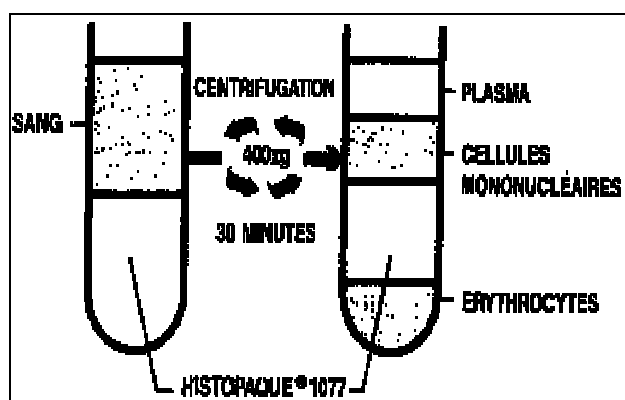


Figure 44 : Isolement de l'anneau de cellules mononucléées

(« barrière poreuse » entre cellules mononucléaires et Histopaque[®])

4.2.3 Infection des flasques supports

Les conditions de culture maîtrisées pour les cellules support MDH-SP et DH82, nous avons infecté le tapis cellulaire par transfert de monocytes canins primaires, récupérés par leucoconcentration sur les sangs des chiens infectés. Deux mL de leucoconcentrat repris dans le milieu de culture adéquat en fonction de la lignée cellulaire support, ont été transférés dans une flasque de 75 cm² de cellules MDH-SP ou DH82 semi-confluentes. Les cultures ont été replacées à 37°C dans l'étuve à 5% de CO₂.

4.2.4 Mise en évidence de la phagocytose d'*E. canis* par les cellules

L'infection des flasques a été vérifiée par IFI. La confection des lames à antigène a donc été réalisée à partir des cultures cellulaires supposées infectées. Ces lames étaient ensuite testées par

un sérum positif connu. La fluorescence signifiait alors la présence d'*E. canis* dans les cellules fixées sur la lame.

Protocole de confection des lames à antigène à partir de culture cellulaire

- gratter une flasque de 75 confluente, récupérer le milieu et centrifuger à 1600 tr/min 5 min
- reprendre le culot avec 1mL de Formol à 0,1 % (à partir de formaldéhyde à 37 % dilué au PBS et filtré pour optimiser la propreté du dépôt), laisser reposer pendant 5 min puis centrifuger 1600 tr/min 5 min
- reprendre le culot avec 1mL de solution stérile de PBS-BSA 0,5% (peser 250 mg de BSA, dissoudre dans 50 mL de PBS filtré sur 0,22µ) puis centrifuger à 1600 tr/min
- faire un 2ème lavage en reprenant encore le culot avec 1 mL de PBS-BSA stérile, faire une numération et ajuster le volume de PBS-BSA pour une concentration de 2.10^5 cellules/mL
- déposer sur lames sèches 10 µL de la dilution ainsi obtenue par plot
- mettre les lames à l'étuve à 40° C pour séchage
- fixer les lames à l'acétone à -40° C pendant une nuit
- sécher les lames le lendemain matin, conserver à -20°C
- lors d'utilisation des lames pour IFI : sécher les lames à la sortie du congélateur, puis appliquer le protocole d'IFI.

4.3 Résultats

- Les cultures de MDH-SP ayant reçu les leucoconcentrats du chien n°1 de J13 à J18, du chien n°3 de J15 à J18 et du chien n°4 de J7 à J15 ont subi deux contaminations successives.

La coloration de Gram sur l'étalement d'une goutte de suspension cellulaire des flasques infectées a d'abord conclu à la présence de coques Gram + immobiles identifiés comme étant des Staphylocoques, provenant très probablement de la peau des chiens au moment du prélèvement. Après renforcement de l'asepsie au moment de la ponction, les leucoconcentrats n'apparaissaient plus contaminés.

Une contamination générale de l'étuve utilisée dans le P2, par une bactérie de type *Bacillus*, a motivé l'élimination des flasques restantes et le changement d'antibiotique dans le milieu : pénicilline-streptomycine à spectre d'activité antibactérienne plus large que l'érythromycine.

Notre étude *in vitro* n'a donc pu être menée que sur des prélèvements tardifs par rapport au début de la phase aiguë de la maladie.

Il s'est avéré lors des contrôles répétés par IFI (J28, J35, J45, J60 de culture) qu'il n'y avait pas d'*Ehrlichia* dans les cultures. Les tests PCR que nous avons réalisés à J45 et J60, négatifs, ont confirmé l'échec de la multiplication *in vitro* dans nos conditions.

4.4 Discussion

Il convient de discuter des causes possibles de cet échec.

• Concernant les prélèvements

* la prise de sang

Le protocole de prise de sang habituel (tonte, alcool) d'abord utilisé n'a pas permis la stérilité du prélèvement. L'asepsie rigoureuse mise en œuvre ensuite (tonte, nettoyage de la zone à la Bétadine solution ® diluée, désinfection de l'aiguille et du bouchon du vacutainer à l'alcool, port de gants, ponction rapide) a semblé correcte pour éviter la contamination par la flore cutanée canine.

* date des prélèvements exploités

Les leucoconcentrats mis en culture n'ont pas permis d'optimiser nos chances de voir la bactérie proliférer : en effet, à cause des contaminations expliquées ci-avant, nous avons travaillé sur des prélèvements tardifs à partir de J19 pour les chiens n°1 et n°3 et J16 pour le chien n°4. WANER *et al.* ont montré par une étude ELISA sur six chiens en 1996, que l'antigénémie se manifestait à J15 en moyenne, et ne persistait qu'un à dix jours (134). Il est donc possible que nos leucoconcentrats aient été insuffisamment riches en *Ehrlichia* pour que celles-ci puissent se développer ensuite *in vitro*. A cette faible antigénémie supposée du prélèvement sanguin, il faut associer trois réflexions :

- les bactéries ne sont présentes qu'en petit nombre dans le sang des sujets infectés (64),
- le rendement de récupération des cellules mononucléées par leucoconcentration n'est pas de 100%,
- le nombre de monocytes infectés est très faible ($\leq 1\%$) (64).

• Concernant les conditions de culture

* choix des lignées cellulaires

Le choix des lignées est conforme à la littérature. Il existe peu de lignée « monocytaires » supports de culture. L'absence de mycoplasmes et de contamination bactérienne dans les ampoules initiales a été vérifiée.

* choix des antibiotiques

L'érythromycine est un macrolide à spectre d'action essentiellement dirigé vers les germes à Gram+, normalement actif contre *Staphylococcus* et *Bacillus* et inefficace sur les *Ehrlichia* (24).

Mais il n'a pas permis d'enrayer la contamination de nos cultures de MDH-SP par ces bactéries, la dose utilisée était peut-être insuffisante.

Les cultures de DH82 avec pénicilline-streptomycine ayant reçu des leucoconcentrats non contaminés (au-delà de J19 pour les chiens n°1 et n°3 et J16 pour le chien n°4) n'ont, elles non plus, pas permis la prolifération d'*E. canis*. La pénicilline n'est pas active contre *E. canis* (24). Il nous faut cependant être prudent sur l'action de la streptomycine : des études pharmacodynamiques démontrent une concentration progressive de l'antibiotique dans le milieu intracellulaire par pinocytose à partir de 48-72h de culture (102). Il est probable que cette pénétration puisse entraîner des perturbations du milieu intracellulaire. Cette perturbation peut gêner le cycle d'*E. canis*.

*** manipulation**

La mise en culture des *Ehrlichia* est longue. Il faut entre 14 et 34 jours pour voir apparaître les premiers microorganismes (84). De nombreuses subcultures ont donc été nécessaires pour assurer la survie des cellules. Lors des divisions (Cf. Deuxième Partie 4.2.1.4), la méthode de grattage qui avait été choisie pour éviter l'action enzymatique répétée de la trypsine, agressive, s'est révélée correcte. Aucune dégénérescence des monocytes n'a été constatée.

5. ETUDE MOLECULAIRE

5.1 Objectifs

- Un diagnostic précoce de la maladie est possible par amplification spécifique de gènes d'*Ehrlichia canis* par PCR. Nous discuterons à partir de nos essais sur la sensibilité et la spécificité du dépistage génétique.
- L'étude de la cinétique de la bactériémie chez le chien avant, pendant et après traitement sera réalisée, par PCR, sur le chien n°1 ayant développé des symptômes aigus d'ehrlichiose et ayant reçu un traitement à la doxycycline. Nous discuterons alors de l'efficacité curative du protocole thérapeutique.
- Le séquençage du gène codant l'acide ribonucléique 16S (ARNr 16S) permettra de caractériser la souche d'*E. canis* utilisée dans notre étude, et de la comparer ainsi aux souches actuellement connues.
- Nous étudierons par PCR la présence d' *E. canis* dans les différents organes des quatre chiens étudiés.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Prélèvements

• **prélèvements sanguins**

Des prélèvements sur tubes EDTA plastiques ont été réalisés à la veine jugulaire, sur les quatre chiens de notre étude entre J0 et J30 post-inoculation, trois fois par semaine environ, et pour les chiens n°1 et n°2 jusqu'à J45. Les tubes ont été conservés à -20°C dans un congélateur près du chenil, puis à -80°C au laboratoire.

• **biopsies d'organes**

Des biopsies de petite taille ont été réalisées au cours des autopsies des quatre chiens (à J69 pour les chiens n°1 et 2, à J44 pour les chiens n°3 et 4) sur le foie, la rate, les poumons, les reins et les nœuds lymphatiques mésentériques. Les cryotubes ont été conservés à -80°C au laboratoire avant leur traitement.

• **suspension de culture cellulaire**

Nos cultures cellulaires supposées infectées par *E. canis* ont été testées en PCR à J45 et J60 après mise en culture des leucoconcentrats des chiens n°3 et 4 malades.

Protocole de récupération des cellules

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- récupérer le contenu d'une flasque confluente au grattoir à cellules et garder environ 5.10^6 cellules- transférer ce volume dans un microtube à centrifuger de 1,5 mL et centrifuger 5 min à 300g- éliminer le surnageant, remettre le culot en suspension dans un volume final de 200 μL de PBS (sans calcium, ni magnésium) |
|---|

5.2.2 Extraction du matériel génétique

Nous avons utilisé des kits d'extraction d'ADN génomique sur sang total, suspension de culture cellulaire et sur tissus. Les trois protocoles utilisent une Protéinase K, sans activité Dnase ni RNase.

Protocole d'extraction sur sang total (Kit E.Z.N.A. OMEGA)

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">- porter les échantillons et la protéinase K à température ambiante, préparer un bain-marie à 70°C- prélever 250 μL de sang total dans un tube de 1,5 mL stérile- ajouter 25 μL de protéinase K et vortexer. Ajouter 250 μL de tampon de lyse « Buffer BL ». Vortexer pour bien mélanger.- incuber l'échantillon à 70°C 30 min au moins (avec couvercle de protection), vortexer toutes les 10 min pendant l'incubation- ajouter 260 μL d'isopropanol au lysat et vortexer- assembler une colonne Hibind dans son tube de collection de 2 mL (fournis dans le kit), transférer le mélange- centrifuger à température ambiante à 8000g 1 min pour fixer l'ADN sur la membrane de la colonne |
|--|

- jeter le tube de collection et l'éluat qu'il contient
- placer la colonne dans un second tube de collection de 2 mL, ajouter 750 µL de tampon de lavage « DNA Wash Buffer » préalablement dilué avec de l'éthanol absolu
- centrifuger 1 min à 8000g, jeter le tube de collection et l'éluat qu'il contient
- placer la colonne dans un nouveau tube de collection de 2 mL et ajouter à nouveau 750 µL de tampon de lavage
- centrifuger 1 min à 8000g, jeter l'éluat et conserver le tube de collection
- replacer la colonne dans le tube de collection et centrifuger à vitesse maximale (10000g) 2min à sec, pour bien sécher la colonne
- placer la colonne dans un tube stérile de 1,5 mL (non fourni) à paroi anti-adhésion pour récupérer le maximum d'ADN
- ajouter 50 µL d'eau ultra pure (préchauffée à 70°C), laisser incubé 2 min à température ambiante
- centrifuger 1 min à 8000g pour décrocher l'ADN de la colonne
- répéter l'étape de l'élution avec 50 µL d'eau ultra pure supplémentaires dans la même colonne, laisser incubé 2 min
- centrifuger 1 min à 8000g, jeter la colonne, fermer le tube stérile de 1,5 mL qui contient l'ADN extrait (volume de 100 µL).

Protocole d'extraction sur tissus (Kit Forensic DNA E.Z.N.A. OMEGA)

- ajuster les biopsies à un poids de 30 à 60 mg de tissu
- placer l'échantillon dans un tube stérile de 1,5 mL et ajouter 200 µL à 400 µL de tampon de lyse « Buffer TL »
- ajouter 25 à 50 µL de Protéase, vortexer et incubé à 55°C pendant 3 heures en vortexant plusieurs fois
- ajouter 220 µL de tampon de lyse « Buffer BL », vortexer et incubé à 70°C 10 min
- ajouter 220 µL d'éthanol absolu et vortexer
- les étapes suivantes jusqu'à élution de l'ADN sont identiques à celles du protocole sur sang total (ci-dessus)

Protocole d'extraction sur culture cellulaire (Kit QIAamp DNA Mini)

- ajouter aux 200 µL de suspension cellulaire 20 µL de Protéase Qiagen ou Protéinase K
- ajouter 200 µL de tampon de lyse « Buffer AL », vortexer
- laisser incubé 30 min à 56°C en vortexant plusieurs fois
- ajouter 200 µL d'éthanol absolu, vortexer
- transférer le mélange dans une colonne montée sur tube de collection de 2 mL, centrifuger 1 min à 6000g
- jeter l'éluat et placer la colonne dans un nouveau tube de collection
- ajouter 500 µL de tampon de lavage « Buffer AW1 », centrifuger 1 min à 6000g
- jeter l'éluat et placer la colonne dans un nouveau tube de collection
- ajouter 500 µL de tampon de lavage « Buffer AW2 », centrifuger 3 min à 20000g
- jeter l'éluat, placer la colonne dans un tube stérile de 1,5 mL
- ajouter 50 µL d'eau ultra pure, laisser incubé 2 min à température ambiante, et centrifuger 1 min à 6000g
- refaire l'étape d'élution avec 50 µL d'eau ultra pure supplémentaires, centrifuger 1 min à 6000g
- fermer le tube contenant l'ADN extrait.

5.2.3 Amplification de l'ADN

Le principe de la réaction de polymérisation en chaîne a été exposé dans la partie générale (Cf. Première Partie 6.3.4.2).

5.2.3.1 Choix des amorces oligonucléotidiques

Le choix des amorces a été basé sur les critères fondamentaux suivants :

- Le site d'hybridation des amorces sur la matrice doit être unique. Cette unicité dépend de la longueur choisie des amorces et de la complexité de la matrice :
 - * une amorce doit faire environ 20 nucléotides (16 à 18 pour un amplicon < 500 paires de base (pb), 24 pour un amplicon > 5000 pb)
 - * le pourcentage de G+C doit être compris entre 40 et 60% ; si le pourcentage est supérieur, l'hybridation sera plus difficile ; le ratio GC/AT des amorces doit de plus être proche ou supérieur à celui de la matrice amplifiée.
 - * l'amorce ne doit pas comporter de palindromes, ne doit pas former d'hybridation intramoléculaire, ne doit pas avoir d'hybridation entre l'amorce située en amont de la séquence à amplifier et l'amorce en aval.
 - * l'amorce doit présenter une bonne stabilité interne : de préférence, elle doit être plus stable en 5' qu'en 3' pour limiter les faux appariements ; ne doit pas comporter de T en 3' car c'est la base la moins discriminante, qui génère donc le plus de mésappariement.
- La température d'hybridation (T_h) doit être compatible entre les deux amorces de couple pour pouvoir travailler dans les mêmes conditions et optimiser la spécificité de l'amplification :
 - * calcul de la T_h à partir de la température de fusion (T_m) : T_m est la température pour laquelle la moitié de l'ADN est sous forme de double brin, l'autre moitié sous forme de simple brin. Elle se calcule ainsi jusqu'à 25 nucléotides : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ en °C. $T_h = T_m - 4$ °C. La température d'hybridation doit être classiquement comprise, de façon optimale, entre 55 et 65°C.

Plusieurs couples d'amorces d'amplification du gène ARNr 16S pour la reconnaissance spécifique de l'espèce *Ehrlichia canis*, ont été proposés dans les comptes rendus expérimentaux depuis le séquençage de ce gène bactérien universel en 1991 (5) (Cf. Tableau IV). Les amorces soulignées correspondent à des régions spécifiques de l'espèce *E. canis*, situées dans régions extrêmement variables de l'extrémité 5' du gène ARNr 16S. Les autres sont leurs complémentaires, situées dans des régions conservées du gène. Les séquences grisées claires sont celles que nous avons utilisées sur sang total, tissus et culture cellulaire.

Tableau IV : Couples d'amorces du gène ARN16S d'amplification spécifique d'*E. canis*

Amorces (références bibliographiques)	Séquence nucléotidique (5'-3')	Position sur le gène ARNr 16S (séquence partielle Florida M73226 1433 bp	Th	Fragment amplifié
<u>HE1C</u> (101,136)	CAATTATTTATAGC CTCTGGCTATAGG	64-90 (27 nucléotides)	70°C	HE1C+HE3S : 385 pb
HE3S (101)	GCTACCGTCATTAT CTTCCC	448-429 (20 nucléotides) complémentaire	56°C	
HE3R (73,126,140)	CTTCTATAGGTACC GTCATTATCTTCCC TAT	456-426 (31 nucléotides) complémentaire	80°C	HE1C+HE3R : 302 pb
<u>ECP1</u> (104)	GGTAATACTGTAT AATCCCC	151-170 (20 nucléotides)	52°C	HE3R+ECP1 : 287 pb
HE2C (104)	CAC TT TTA ACTTAC TAGTCC	550-530 (21 nucléotides) complémentaire	50°C	HE2C+HE1C : 485 pb

D'autres amorces spécifiques du genre *Ehrlichia* peuvent être utilisées sur ADN purifié d'*Ehrlichia canis* (Cf. Tableau V). Eventuellement, des amorces universelles amplifiant l'ADN 16S de toutes les bactéries peuvent aussi être envisagées sur un culot bactérien purifié (Cf. Tableau VI).

**Tableau V : Couples d'amorces du gène ARN16S d'amplification spécifiques du genre
*Ehrlichia***

Amorces	Séquences nucléotidiques (5'-3')	Position sur le gène	Th	Fragment amplifié
<u>H1</u> (101)	TAACACATGCAAG TCGAACG (spécifique de genre)	42-61 (20 nucléotides)	54°C	HE3S+H1 : 350 pb
HE2 (101)	GTGGCAGACGGGT GAGTAATGC	100-121 (22 nucléotides)	66°C	HE3S+HE2 : 427 pb
PER1 (82)	TTTATCGCTATTAG ATGAGCCTATG	198-222 (25 nucléotides)	64°C	PER1+PER2 : 452 pb (spécifiques du genre <i>Ehrlichia</i> sauf l'espèce <i>E. sennetsu</i>)
PER2 (82)	CTCTACACTAGGA ATTCCGCTAT	(23 nucléotides) complémentaire	62°C	
AR1 (84,85)	GTTTGATCCTGGCT CAG (bactérienne universelle)	4-20 (17 nucléotides)	48°C	AR2+AR1 : 500 pb
<u>AR2</u> (utilisée au laboratoire en 1996)	CGCTTGCCCCCTCC GTATT (spécifique de genre)	509-491 (19 nucléotides) complémentaire	58°C	

EC3 (84,85)	TTAAAAGCCGCTC CAAA (spécifique de genre)	(17 nucléotides) complémentaire	44°C	EC3+AR1 : 600 pb
GE2F (20,55)	GTTAGTGGCATAC GGGTGAAT	(21 nucléotides)	58°C	GE2F+EHRL3 : 152 pb
EHRL3-IP2 (20)	TCATCTAATAGCG ATAAATC	(20 nucléotides)	48°C	

Tableau VI : Couples d'amorces du gène ARN16S d'amplification universelle des bactéries

Amorces	Séquence nucléotidique (5'-3')	Position sur le gène	Th	Fragment amplifié
P0mod (126,142)	AGAGTTTGATCMT GG (M : A ou C)	(15 nucléotides)	39°C	P0mod+PC3mod : 789 pb
PC3mod (126,142)	GGACTAHAGGGTA TCTAAT (H : C, T ou A)	(19 nucléotides) complémentaire	48,7°C	
PC5 (126,142)	TACCTTGTTACGAC TT	(16 nucléotides)	40°C	PC5+P3mod : 721 pb
P3mod (126,142)	ATTAGATACCCTDT AGTCC	(19 nucléotides) complémentaire	48,7°C	
EC11 (5)	AAGGATCCGGACT ACHAGGGTATCTA AT (H : C, T ou A)	(28 nucléotides) complémentaire	74°C	EC11+EC12 : 767 pb
EC12 (5)	AATCTAGAGTTTG ATCMTGG (M : A ou C)	(20 nucléotides)	48°C	
EC9 (5)	AAGGATCCTACCTT GTTACGACTT	(24 nucléotides)	64°C	EC9+EC10 : 733 pb
EC10 (5)	AATCTAGATTAGA TACCCTDGTAGTCC (D : A, T ou G)	(27 nucléotides) complémentaire	68°C	

Nous avons travaillé sur sang total et tissus puisque la culture s'est révélée négative. La purification prévue dans notre projet initial par chromatographie sur colonne par filtration sur gel des *Ehrlichia canis* n'a donc pas été réalisée. Aussi, nous nous sommes servis des amorces spécifiques d'espèce HE1C & HE3S (Cf. Tableau IV). Lorsque la bactérie était détectée dans le prélèvement par ces amorces, les amorces universelles P0mod & PC3mod (Cf. Tableau V) ont été testées pour amplifier un fragment plus long en vue du séquençage (Cf. Figure 45). Ces amorces, décrites par WILSON *et al.* en 1990, ont été modifiées car leurs extrémités 3' présentaient des auto-hybridations (142).

1	ctcagaaega	acgctggcgg	caagcctaac	acatgcaagt	cgaacggaca	attattttata	5'	HE1C
61	gcctctgget	ataggaatt	gttagtgga	gacgggtgag	taatgcgtag	gaatctacct		
121	agtagtacgg	aatagccatt	agaaatgggtg	ggtaatactg	tataatcccc	gagggggaaa		
181	gattttatcgc	tattagataa	gcctacgtta	gattagctag	ttgggtgaggt	aatggcttac		
241	caaggctatg	atctatagct	ggtctgagag	gacgatcagc	cacactggaa	ctgagatacg		
301	gtccagactc	ctacgggagg	cagcagtggg	gaatattgga	caatgggcga	aagcctgac		
361	cagctatgcc	gcgtgagtga	agaaggcctt	cgggttgtaa	aactctttca	atagggaaqa		
421	taatgacggt	acctatagaa	gaagtcccg	caaacctctgt	gccagcagcc	gcggtaatac		HE3S
481	ggagggggca	agcgttggtc	ggaattattg	ggcgtaaagg	gcacgtaggt	ggactagtaa		
541	gttaaaagtg	aaataccaaa	gcttaacttt	ggagcggcctt	ttaatactgc	tagactagag		
601	gtcgaaagag	gatagoggaa	ttcctagtgt	agaggtgaaa	ttcgtagata	ttaggaggaa		
661	caccagtggc	gaaggcggct	atctgggttcg	atactgacac	tgaggtgcga	aagcgtgggg		
721	agcaaacagg	attagatacc	ctggtagtcc	acgctgtaaa	cgatgagtgc	taaatgtgag		PC3mod
781	gattttatct	ttgtattgta	gctaaccgct	taagcactcc	gcctggggac	taagggtcga		
841	agactaaaac	tcaagggaat	tgaaggggac	cgcacaaagc	gtggagcatg	tggtttaatt		
901	cgatgctacg	cgaaaaaact	taaccactttt	tgacatgaag	gtcgtatccc	tccatacagg		
961	gggagtcagt	tcggtcggac	cttacacagg	tgctgcattg	ttgtcgtcag	ctcgtgtcgt		
1021	gagatggttg	gttaagtccc	gcacacagcg	caacccctcat	tcttagttac	caacaggtaa		
1081	tgctgggcac	tctaaggaaa	ctgccagtga	taaactggag	gaagggtggg	atgatgtcaa		
1141	atcagcacgg	cccttatagg	gtgggctaca	caagtgtctac	aatggcaact	acaatagggt		
1201	gagagacgc	aaggtttagc	taatccataa	aagttgtctc	agttcggatt	gttctctgaa		
1261	actcgagagc	atgaagtggg	aatecctagt	aatcgtggat	catcacgcca	cgggtgaatac		
1321	gttctcgggt	cttgtacaca	ctgcccgta	cgccatggga	attggcttaa	ctcgaagctg	3'	
1381	gtgtgctaac	cgcaagggaag	cagccattta	aggttggggtt	agtgaactagg	gtg		

Figure 45 : Séquence partielle du gène ARNr16S d'*E. canis* souche Oklahoma (Genbank)
 (séquences jaunes : amorces directes, séquence orange : amorce complémentaire)

5.2.3.2 Protocoles de PCR

La réaction a été optimisée après plusieurs variations des paramètres, notamment la concentration en m

thermocyclé (BIOMETRA) qui produit cette répétition de cycles thermiques de façon automatique. Le nombre de cycles a été fixé à 35.

Chaque cycle comporte plusieurs phases :

- dénaturation pendant 5min à 96°C avant le début des cycles, suivie de 30 sec à 96°C par cycle
- fixation des amorces à 53°C pour les deux couples d'amorces utilisés pendant 40 sec
- élongation à 72°C pendant 1min.

5.2.3.3 Détection des amplicons d'ADN

Les produits d'amplification sont recherchés par électrophorèse en gel d'Agarose à 1% puis visualisés par ajout de Bromure d'éthidium . Cinq μL des 50 μL de la solution d'amplification sont déposés dans les puits du gel avec 5 μL de tampon de charge, bleu-sucrose (118 μL de sucrose pour 2 μL de bleu. L'électrophorèse est effectuée à 80-100 volts pendant 20-30 min en fonction de la taille du gel. Les bandes d'ADN sont visualisées par exposition aux rayons ultraviolets. La taille des amplicons est comparée à un marqueur de poids moléculaire d'ADN.

Protocole de préparation d'un gel

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">- peser 0,5 ou 1 g d'Agarose- mettre l'Agarose dans 50 ou 100 mL de Tampon TAE (Tris-acétate-EDTA) 1X, mélanger et faire chauffer pour une dissolution rapide, pendant 1min- ajouter 3 ou 6 μL de BET (Bromure d'éthidium)- couler la solution chaude dans un moule avec un peigne à puits- laisser solidifier 30 min au moins |
|--|

5.2.4 Séquençage de l'ADN

5.2.4.1 Choix des amorces

Nous avons utilisé les amorces P0mod/PC3mod et HE1C/HE3S pour la réaction de séquence (Cf. Tableaux IV et VI).

5.2.4.2 Purification de l'amplicon

Pour permettre la réaction de séquençage, l'ADN initialement amplifié doit être le plus pur possible pour éviter les interférences qui rendraient ininterprétables les séquences.

Protocole de purification (Kit High Pure PCR Product Purification® , Roche)

- déposer 500 µL de tampon de fixation (guaninidine-thiocyanate-Tris-HCl-éthanol) dans le microtube contenant l'amplicon
- transférer l'ensemble dans le tube de 1,5 mL et mélanger
- transférer l'ensemble dans une colonne montée sur un tube de collection de 2 mL et centrifuger 1 min à 13000 tr/min
- éliminer l'éluat, mettre la colonne dans un nouveau tube de collection
- mettre 500 µL de tampon de lavage (éthanol-NaCl-Tris-HCl) et centrifuger 1 min à 13000 tr/min
- éliminer l'éluat, mettre 200 µL de tampon bleu, centrifuger 1 min à 13000 tr/min
- éliminer l'éluat et transférer la colonne dans un tube de 1,5 mL
- ajouter 10 ou 20 µL d'eau ultra pure en fonction de l'intensité de la bande amplifiée
- centrifuger 1 min à 13000 tr/min
- vérifier la réussite de la réaction de purification par migration sur gel d'Agarose à 1% en mettant dans le puits 1 µL de la solution de purification et 2,5 µL de tampon de charge. Le Marqueur de taille est Smart Ladder d'Eurogentec qui permet de quantifier l'ADN, 2,5 µL sont déposés par puits (la quantification se fait en ng/bande).

Après purification de l'ADN, la réaction de séquence est réalisée.

5.2.4.3 Réaction de séquence

C' est la technique dérivant de la méthode enzymatique de Sanger avec terminateurs marqués (didésoxyribonucléotides –ddNTPs- fluorescents au lieu des amorces) qui est utilisée au Laboratoire de Parasitologie de l'IMTSSA

Protocole de Réaction de Séquence

- mélanger dans un micro-tube les réactifs suivants :
 - * 8 µL de mélange réactionnel
 - * 4 µL de l'amorce à 0,8 pmoles/µL
 - * x µL de matrice (quantité à calculer en fonction de la quantification de la bande purifiée, x doit être compris entre 30 et 90 ng/bande)
 - * qsp 20 µL H2O ultrapure
- le tube est mis dans le thermocycler et on exécute le programme suivant :
 - * 5 min de dénaturation initiale à 96°C puis 25 cycles de :
 - * 5 sec à 96°C
 - * 10 sec à 50°C
 - * 4 min à 68°C

A la fin de la réaction de séquençage, les échantillons sont précipités afin d'éliminer l'enzyme, les sels et surtout les ddNTPs fluorescents non incorporés qui pourraient gêner la détection des fragments.

Protocole de Précipitation

- dans chaque tube de réaction de séquence mettre 2 µL d'Acétate de Sodium (3M pH 4,6) et 50 µL d'éthanol à 90% à froid
- mélanger et transvaser dans un tube de 1,5 mL, laisser déposer 30 min à –20°C
- centrifuger 30 min à 13000 tr/min en repérant le sens du tube pour situer la position du culot
- retirer le surnageant précautionneusement sans laisser de goutte d'éthanol sur la paroi du tube
- rincer en ajoutant 100 µL d'éthanol à 70% froid (sans mélanger)
- centrifuger 10 min à 13000 tr/min
- retirer le surnageant avec précaution, et laisser sécher à l'air.
- une fois sec, fermer le tube et placer à –20°C en attendant le séquençage

Protocole de préparation du séquençage

- reprendre les échantillons dans 10 µL de Formamide (manipuler avec des gants)
- laisser reposer 10 min puis agiter pendant 10 min
- transférer les 10 µL dans les puits de plaques à 96 puits
- chauffer les plaques à 96 puits 2 min à 96°C, afin de dénaturer l'ADN
- laisser reposer 4 min à température ambiante
- les plaques sont ensuite introduites dans le Séquenceur ABI 310 ® ,PERKIN ELMER APPLIED BIOSYSTEMS.

Le séquenceur comprend un détecteur laser qui permet de différencier les longueurs d'ondes émises par quatre chromophores correspondant aux quatre produits d'extension, A, C, G ou T. Les signaux sont ensuite traités grâce à une matrice mathématique pour distinguer les différentes bases (Cf. Figure 46).

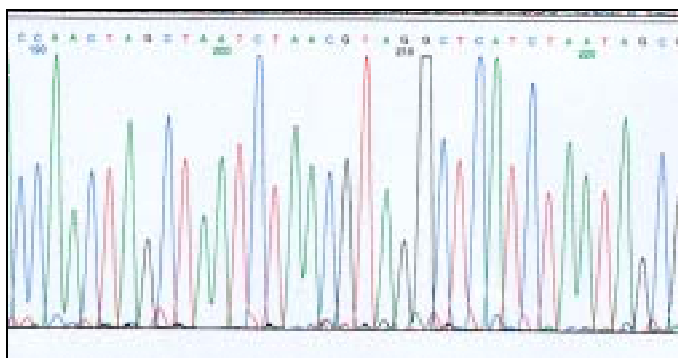


Figure 46 : Exemple de résultat-séquence à la sortie du séquenceur

L'alignement des séquences obtenues a été réalisé grâce à un logiciel spécialisé Perkin sur ordinateur Macintosh® . Puis ces séquences ont été comparées avec les séquences répertoriées d'*E. canis*, d'autres espèces d'*Ehrlichia* ou d'autres genres bactériens.

5.3 Résultats

5.3.1 Mise au point d'une PCR pour le dépistage de l'ehrlichiose canine

L'amorce HE1C située dans une région extrêmement variable à l'extrémité 5' du gène ARNr 16S, en association avec l'amorce complémentaire HE3S, située dans une région conservée d'espèce à l'extrémité 3', a permis l'amplification spécifique d'un fragment de 385 pb du gène ARNr 16S d'*E. canis* (Cf. Annexe I : l'alignement de la séquence du gène ARNr 16S d'*E. canis* avec d'autres espèces d'*Ehrlichia* et d'autres genres de bactéries a permis de visualiser la spécificité de l'amorce HE1C pour *E. canis*). Nous avons utilisé comme témoin positif (T+) le sang total du chien Y en phase aiguë d'ehrlichiose (sang prélevé en 1999, et conservé à -80°C) et comme témoin négatif (T-) le sang total du chien n°1 à J0 avant inoculation (Cf. Figure 47).

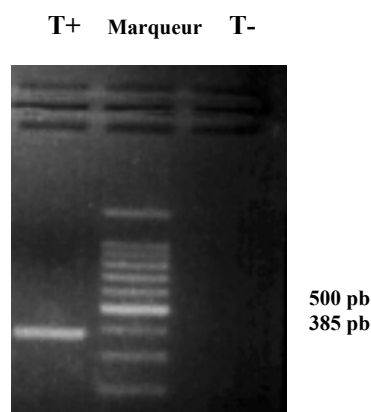


Figure 47 : Détection du fragment de 385 paires de base spécifique d'*E. canis* sur sang total de témoins positif et négatif avec les amorces HE1C et HE3S

La vérification par séquençage de l'amplicon obtenu de la présence d'*E. canis* dans le sang du chien Y permet de valider le protocole pour notre étude sur quatre chiens.

- L'utilisation des amorces P0mod et PC3 mod n'a pas permis l'amplification d'une bande spécifique (Cf. Figure 48).

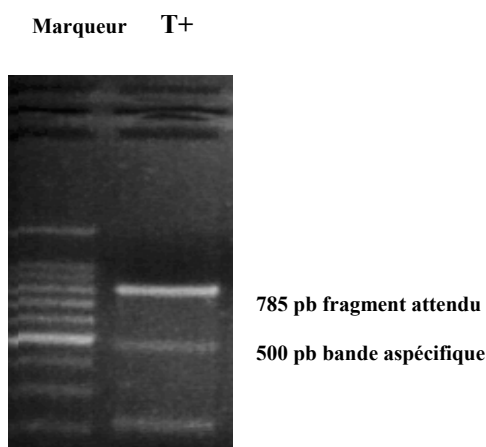


Figure 48 : Détection du fragment de 789 paires de base du gène ARN r 16S bactérien sur sang total d'un témoin positif avec les amorces P0mod et PC3mod (T+ : sang du chien Y, étude de 1999)

5.3.2 Dépistage par PCR appliqué à quatre cas d'ehrlichiose expérimentale

La bactérie a été recherchée à l'aide de la réaction spécifique mise au point (Cf. 5.3.1).

Elle a été détectée chez les 4 chiens de notre étude.

E. canis a été détectée dès le 7^{ème} jour suivant l'inoculation (J7), sur sang total des chiens n° 1 et 2 (Cf. Tableau VIII).

5.3. Détection d'*E. canis* par PCR sur tissus

E. canis a été détectée de façon évidente (bande franche à 385 pb) sur la rate des chiens n°1,2 et 3, le nœud lymphatique mésentérique du chien n°2, dans les poumons, le foie du chien n°3. Un doute a été émis pour la rate du chien n°4 (Cf. Figure 50). Des bandes aspécifiques ont aussi été notées sur les migrations 5, 6, 9 et 11 (plus visibles en image inversée).

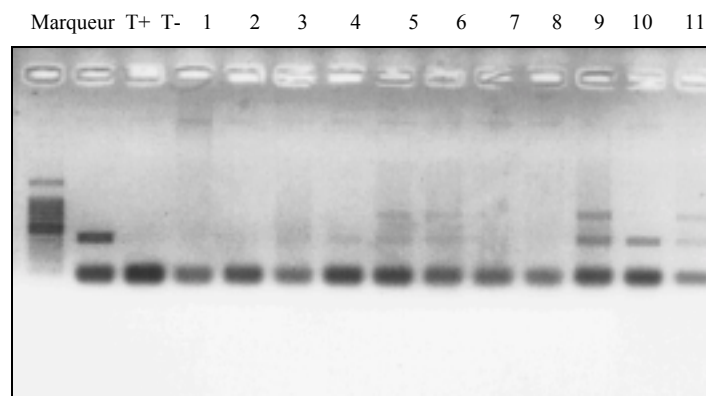


Figure 50 : Résultats des PCR sur tissus des chiens n°1, 2, 3 et 4

1 : poumons chien n°4	7 : poumons chien n°1
2 : foie chien n°4	8 : foie chien n°1
3 : rate chien n°4	9 : rate chien n°1
4 : poumons chien n°3	10 : rate chien n°2
5 : foie chien n°3	11 : nœud lymphatique chien n°2
6 : rate chien n°3	Témoin + : sang total chien Y / Témoin - : sang total chien n°1, J0

5.3.4 Vérification de l'infection des cultures par PCR

Les PCR réalisées sur l'ensemble de nos flasques de culture inoculées par *E. canis* se sont révélées négatives à l'exemple de la Figure 51.

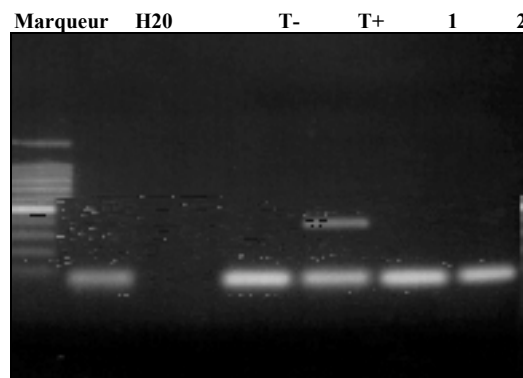


Figure 51 : Résultats des PCR sur suspensions cellulaires
(1 : culture de cellules MDH inoculée par *E. canis*, 2 : culture de MDH saine
T- : sang du chien n°1 à J0 avant inoculation, T+ : sang du chien Y, étude de 1999)

5.3.5 Essai de séquençage partiel du gène ARNr 16S

Le séquençage a été réalisé dans les deux sens sur les amplicons purifiés de 385 pb spécifiques d'*E. canis* à l'aide des amorces HE1C et HE3S sur les sangs des chiens n°1 et 4.

Les séquences obtenues s'alignent sur 385 paires de bases en prenant comme référence la souche Oklahoma d'*E. canis* (GenBank n° M73221). On ne note qu'une seule différence à la position 199. Un nucléotide adénosine est remplacé par un nucléotide guanosine sur toutes nos séquences expérimentales (Cf. Figure 52). L'acide aminé codé devient donc un acide glutamique à la place d'une lysine, d'après le code génétique universel.

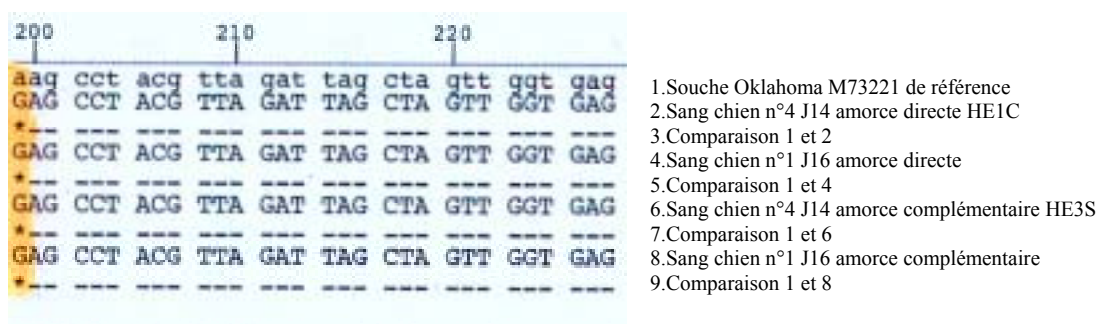


Figure 52 : Alignement partiel des séquences du gène ARNr 16S détecté sur sang total des chiens n°1 et n°4

Cette mutation est présente sur les souches israélienne (Genbank n° U26740) et chinoise de Guangzhou (Genbank n° AF162860) d'*E. canis* (Cf. Figure 53).

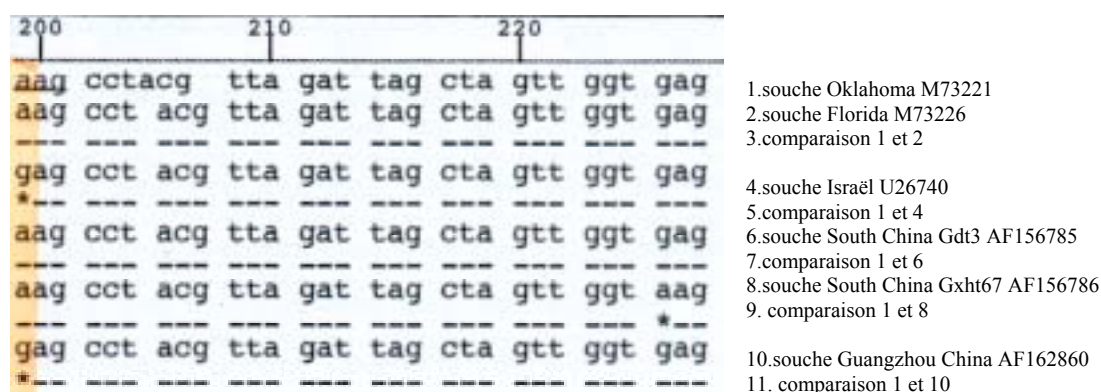


Figure 53 : Alignement partiel des séquences du gène ARNr 16S des souches connues d'*E. canis*

Le séquençage d'un fragment plus long du gène par les amorces P0mod et PC3mod est en cours de mise au point à l'IMTSSA.

5.4 Discussion

5.4.1 Sensibilité et spécificité de la PCR

- La réaction d'amplification utilisant les amorces HE1C et HE3S a montré une spécificité satisfaisante.

Nous n'avons pas étudié sa sensibilité : une quantification par dilution de l'antigène initial purifié aurait été nécessaire.

La technique de PCR a été décrite dans les études comme très sensible mais toutefois moins que la culture cellulaire (84,104). Cependant récemment, une méthode d'hybridation chimique avec marquage luminescent (PCR/CH) a permis d'améliorer le seuil de sensibilité de la PCR : l'équivalent de 150 micro-organismes ont pu être détectés contre $1,5 \cdot 10^6$ par lecture sur gel d'Agarose avec bromure d'éthidium (104). La PCR/CH apparaît alors plus sensible que la culture.

La technique de Réverse Transcription-PCR a également été essayée, sur *E. chaffeensis* en 2001: elle s'est avérée 100 fois plus sensible que la PCR mais elle implique la présence d'agent pathogène vivant pour être fiable (66).

Par ailleurs, des méthodes de Nested-PCR, « PCR nichée », ont été récemment testées pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la réaction (20). L'amplification est alors faite en plusieurs étapes, d'abord avec des amorces universelles non spécifiques puis avec des amorces spécifiques de genre ou d'espèces.

- Pour les amorces P0mod et PC3mod, la spécificité de la réaction n'a pu être optimisée. Ces amorces universelles sont capables d'amplifier une grande variété de genres bactériens (142). Des hybridations de type southern blot auraient permis de confirmer l'origine du fragment amplifié. Sur sang total, la spécificité de ces amorces universelles ne pouvait être optimale.

5.4.2 Etude de la bactériémie

- Dans notre étude, *E. canis* a été détectée par PCR à J7 post-inoculation, ce qui correspond aux études faisant état d'une détection précoce entre le 4^{ème} et le 10^{ème} jour suivant l'inoculation (82,137). Toutefois ne possédant pas de prélèvements des chiens entre J1 et J7, la détection est peut-être antérieure à J7 dans notre étude.

- La discussion sur la persistance de l'ADN antigénique après traitement antibiotique de l'éhrlichiose canine, est motivée par le résultat positif du chien n°1 (20 jours après la fin de son traitement) par PCR sur sang total et tissus alors qu'il n'a pas été en contact avec des tiques pendant et après son traitement. Le protocole thérapeutique à 10mg/kg/j en une seule prise quotidienne de doxycycline pendant 30 jours n'a pas été stérilisant pour le chien n°1.

D'après les publications, il existe une forte variabilité d'efficacité de la doxycycline, qui dépend de la dose et de la durée du traitement mis en œuvre.

IQBAL *et al.* en 1994 démontrent par PCR, la persistance de l'ADN d'*E. canis* dans le sang total de 3 chiens sur 5, 2 mois après le traitement de 7 jours par 10 mg/kg/j de doxycycline (85). WEN *et al.* en 1997 trouvent 43 positifs en PCR sur 80 prélèvements sanguins de chiens traités à 10mg/kg/j de doxycycline. Les délais du test après traitement sont par contre variables, donc ces résultats sont difficiles à interpréter (140). Les auteurs conseillent de suspendre le traitement lorsque la PCR est négative en l'absence de signes cliniques, même si l'IFI positive et de retester le chien 2 mois après par IFI et PCR. Par contre, si l'IFI est négative avec une PCR positive même sans signes cliniques, ils recommandent la poursuite du traitement.

BREITSCHWERDT *et al.* en 1998 recense un cas de chien positif en PCR 6 mois après son traitement, cependant l'auteur lui-même signale la possibilité de réinfection de ce chien exposé aux tiques (20).

Par opposition, une autre étude de BREITSCHWERDT en 1998 portant sur 8 chiens traités avec 12 mg/kg/j de doxycycline pendant 14 jours, ne donne aucun positif ni en PCR, ni en culture, après traitement (19).

On ne peut donc pas conclure à l'inefficacité de la stérilisation avec la doxycycline, mais seulement émettre des hypothèses d'explication. La chimiorésistance de certaines souches d'*E. canis* vis-à-vis des cyclines a été avancée pour tenter d'expliquer cette bactériémie persistante non systématique (140). Cette hypothèse mériterait la mise en œuvre d'expérimentations supplémentaires *in vivo* et *in vitro*.

5.4.3 Application de la PCR aux tissus

- La PCR appliquée à la détection d'*E. canis* dans les tissus, utilisée la première fois par IQBAL et RIKIHISA en 1994 avec des amorces spécifiques de genre (85), s'est avérée possible en utilisant des amorces spécifiques d'espèce.

- Les biopsies d'organes prélevées lors de l'autopsie du chien n°3 à J44, en phase subclinique de la maladie, sans traitement, ont toutes été positives (poumons, foie, rate) comme la PCR sur sang à J44. Par contre, les biopsies de poumons et de foie du chien n°4 dans la même situation ont été négatives ; la rate s'est avérée très faiblement positive. La mise en parallèle des résultats PCR et de la biologie ne permet pas d'expliquer ces différences. L'atteinte hépatique semble s'être stabilisée à J44 chez les chiens n°3 et 4 (valeurs d'ASAT et ALAT normales et identiques) ; le foie du chien n°3 ne paraît dès lors pas plus atteint que celui du chien n°4.

Mais ces résultats sont difficiles à interpréter car la sensibilité de la recherche par PCR, sur un échantillon unique de si faible volume de chaque organe, bien que meilleure que par calque (calques sur organes du chien n°3 : tous négatifs), n'est pas optimale. On ne peut donc pas conclure à l'absence d'*E. canis* devant un résultat négatif, mais la détection de positifs peut être faite sur des chiens dont les PCR sur sang à la même date sont négatives. Dans notre étude, cependant les 4 chiens étaient positifs en PCR sur sang le jour de l'euthanasie.

La PCR sur tissus semble, comme l'avaient prouvé IQBAL *et al.* en 1994, certes très sensible pour la détection de très faibles quantités d'*E. canis* non détectables directement (85) mais nécessite le test de plusieurs fragments de chaque organe. En effet le nombre de microorganismes n'est probablement pas suffisant pendant la phase subclinique pour être observé en microscopie optique après coloration sur calque d'organes ou étalement sanguin, tandis que l'amplification par PCR permet la mise en évidence de l'ADN de la bactérie.

- Seule la rate est apparue contaminée par *E. canis* sur le chien n°1, 20 jours après la fin du traitement. Les autres tissus apparaissent négatifs dans notre étude. La rate, organe filtre, semble donc être, comme l'évoquaient HARRUS *et al.* en 1998, un des derniers organes, si ce n'est le dernier, hébergeant la bactérie pendant le processus de guérison. La PCR était alors encore positive 34 mois après l'infection (73). L'importance de la rate dans la pathogénie de la maladie est d'ailleurs maintenant bien connue comme dans toutes les maladies à médiation immune (77). En effet il s'agit du site d'initiation de la réponse immune, lieu majeur de synthèse de substances promotrices de l'opsonisation et de la phagocytose, de composants du complément, et site essentiel de production des anticorps. Les bactéries infectant les macrophages spléniques sont protégées longtemps.

- Le chien n°2, sans montrer de manifestations cliniques, ni perturbations biologiques mise à part une lymphocytose, a présenté une rate et des ganglions lymphatiques mésentériques positifs à J69 ; la présence d'*E. canis* dans les autres organes ne peut cependant être exclue. Il est

intéressant de constater la confirmation de la présence d'*E. canis* (dans les tissus et le sang) grâce à la PCR sur ce chien asymptomatique. Quant aux résultats positifs dans les organes lymphoïdes, ils peuvent être expliqués par le fait que, dans la pathogénie de l'ehrlichiose monocyttaire canine, l'agent pathogène se multiplie majoritairement dans les cellules mononucléées des organes contenant ces cellules (39).

5.4.4 Etude de la séquence partielle du gène ARNr 16S

- Seul un quart environ du gène ARNr 16S long de 1500 paires de base a pu être séquencé au cours de notre étude. Seules les amorces spécifiques d'*E. canis* ont en effet pu être utilisées en vue d'un séquençage interprétable. Les bruits de fond étaient trop forts sur les séquences obtenues sur les fragments plus longs amplifiés par les amorces universelles non spécifiques.

- Une mutation ponctuelle a été relevée sur toutes nos séquences concernant des chiens et des jours post-inoculation différents. Cette différence est d'ailleurs la seule décrite sur ce fragment de 385 pb à l'extrémité 5', sur les souches actuellement connues d'*E. canis* (position 199) (Cf. Annexe II). Elle est présente sur la souche israélienne (Genbank n° U26740) et a d'ailleurs déjà été décrite comme un des 3 nucléotides distincts des souches Oklahoma (Genbank n° M73321) et Florida (Genbank n° M73226) (90). Elle est également retrouvée sur la souche chinoise de Guangzhou (Genbank n° AF162860) (82).

La conclusion d'appartenance à l'une ou l'autre de ces deux souches nécessiterait un séquençage complet du gène. En effet à l'extrémité 3' du gène, entre les bases 980 et 1380, deux différences ont été relevées entre la souche israélienne et chinoise (Cf. Annexe II), qui permettent de les différencier.

- La perspective de séquençage total de notre souche, afin d'aboutir à la caractérisation de celle-ci, nous amène à discuter des amorces à utiliser pour séquencer les 1500 paires de base du gène ARNr 16S d'*E. canis* de façon spécifique.

En alignant les séquences entières d'*E. canis* souche Oklahoma (Genbank n° M73321), souche Guangzhou (Genbank n° AF162860) et d'une souche d'*Escherichia coli*, il apparaît une région hypervariable à l'extrémité 5' correspondant à l'amorce spécifique d'*E. canis* HE1C utilisée dans notre étude, et une région très variable à l'extrémité 3' qui serait, elle aussi, spécifique d'*E. canis* (Cf. Figure 54). En effet cette région comporte des mutations également

sur les autres espèces d'*Ehrlichia* qui permettraient de différencier l'espèce *E. canis* (Cf. Annexe I).

		30	H3C-specific Caa										60	70	80	
1	AF162860	tcg aac gga	caa tta ttt	ata gcc tct	ggc tat agg	aaa	ttg									
2	M73221	tcg aac gga	caa tta ttt	ata gcc tct	ggc tat agg	aaa	ttg									
3		---	---	---	---	---	---									
4	E. COLI	TCG AAC GG-	---	TAA CAG	GAA GAA GCT	TGC TCT TTG	--C TGA									
5		---	---	---	---	---	---									

amorce directe : HE1C 5' CAATTATTATAGCCTCTGGCTATAGG 3' Th : 70°C

	1430	1440	1450	1460	1470
AF162860	tgg tgt gct aac cgc aag gaa gca gcc att taa ggt tgg gtt				
M73221	tgg tgt gct aac cgc aag gaa gca gcc att taa ggt tgg gtt				
E. COLI	AGG TAG CTT AAC CTT CGG GAG GGC GCT TAC CAC TTT GTG ATT				
	1480	1490	1500	1510	
AF162860	agt gac tag ggt gaa gtc gta aca agg tag ctg tag gtg aac				
M73221	agt gac tag ggt gt				
E. COLI	CAT GAC TGG GGT GAA GTC GTA ACA AGG TAA CCG TAG GGG AAC				

amorce complémentaire 5' TCGTCGGTAAATTCCAACCCAATC 3' (← sens codant) Th : 66°C

Figure 54 : Choix d'amorces spécifiques pour l'amplification et le séquençage du gène ARNr 16S d'*Ehrlichia canis*

Ce couple d'amorces possède de plus des températures d'hybridation compatibles.

→ Une caractérisation complète avec ces amorces, de la souche à partir de sang total est donc en cours à l'IMTSSA . D'autres tentatives de culture *in vitro* de la bactérie permettraient aussi, après purification du micro-organisme et amplification, d'optimiser le séquençage du gène ARNr 16S.

→ Par ailleurs, l'étude d'autres gènes que celui de l'ARNr 16S, notamment le gène de l'opéron *groEL* , des protéines p28 et p120 (Cf. Première Partie 6.3.4.1), a débuté pour compléter la caractérisation génétique des *Ehrlichia*.

Le séquençage de ces gènes pour la bactérie dans un prélèvement du chien n°2 serait intéressant. Il existe en effet, d'après les auteurs, une grande variabilité d'expression de ces gènes en fonction de l'hôte et de la bactérie qui modifieraient les caractéristiques de l'*Ehrlichia* et serait donc à l'origine d'un échappement à la réponse immunitaire (105,145).

De nombreuses perspectives de recherche sont donc ouvertes ...

CONCLUSION

Des quatre points de l'étude expérimentale que nous nous sommes proposés de mener concernant la souche Borgo d'*Ehrlichia canis*, seule la culture cellulaire n'a pas donné résultat. Les études clinique, immunologique et génétique sur les quatre chiens que nous avons étudiés ont permis d'engager une réflexion sur le rôle éventuel de facteurs individuels d'immunité, car nous avons observé une différence de réceptivité des chiens à une même souche d'*E. canis* et ont permis de confirmer et de compléter les conclusions antérieures sur la pathogénicité de la bactérie.

Ainsi dans notre étude, les symptômes apparaissent en moyenne à J11 post-inoculation et sont dominés par l'hyperthermie, l'asthénie, et l'anorexie, accompagnées d'une panleucopénie. La chronologie d'apparition des symptômes est similaire sur chien naïf ou sur chien réinfecté. L'étude de la pathogénicité en fonction de la voie d'inoculation lors d'expérimentation serait par ailleurs importante à compléter sur un échantillon plus large.

La séroconversion a lieu à J13 en moyenne. Les anticorps, non protecteurs, diminuent en quantité après traitement. Pourtant une séropositivité résiduelle peut persister et l'on assiste à une relance de l'activité immunitaire lors de réinfection.

Le traitement à la doxycycline (10 mg/kg/j *per os* en une seule prise quotidienne pendant 30 jours) permet une disparition des symptômes et une normalisation des paramètres biologiques et hématologiques. Mais l'efficacité stérilisante du protocole n'est pas démontrée ; ceci a déjà été relevé dans la littérature.

L'immunofluorescence indirecte est la méthode diagnostique de référence, mais elle nécessite l'expérience d'un laboratoire spécialisé et ne permet donc pas un diagnostic précoce. De nouveaux moyens de dépistage sont utilisables tels que le dépistage génétique, précoce (J7 dans notre étude) et spécifique mais inutilisable en routine, ou l'immunomigration rapide de sensibilité inférieure mais réalisable en clientèle et donc facilitant une mise en œuvre rapide du traitement.

L'amplification génomique permet aussi de préciser la phylogénie de l'espèce *Ehrlichia canis*. Ainsi, la caractérisation de la souche étudiée, que nous avons menée et qui demande à être complétée, pourrait éventuellement mettre en évidence une souche régionale d'*E. canis*.

ANNEXES

Annexe I : Alignement des séquences du gène ARNr 16S de plusieurs espèces d'*Ehrlichia* et d'*Escherichia coli*

[illegible]

Légende : - 1 : M73221 *E. canis* souche Oklahoma

- 2 : AF084907 *E. spp* = 3 : comparaison de 1 et 2 (* : différence)
 - 4 : AF093788 *Ehrlichia* responsable de l'éhrlichiose granulocytaire humaine = 5 : 1/4
 - 6 AF227954 *E. phagocytophila* = 7 : 1/6
 - 8 U60476 *E. chaffeensis* = 9 : 1/8
 - 10 *Escherichia coli* = 11 : 1/10

HERLICHIA NON CANIS 2.7.2001 13:41									
		470	480	490	500	510	520	530	540
1 M73221	agt gaa gaa ggc ctt cgg gtt gta aaa ctc ttt caa tag gga aga --- taa --- --- ---								
2 AF084907	agt gag gaa ggc ctt cgg gtt gta aaa ctc ttt cag tag gga aga --- taa --- --- ---								
3	---								
4 AF093788	agt gag gaa ggc ctt cgg gtt gta aaa ctc ttt cag tag gga aga --- taa --- --- ---								
5	---								
6 AF227954	agt gag gaa ggc ctt cgg gtt gta aaa ctc ttt cag tag gga aga --- taa --- --- ---								
7	---								
8 U60476	agt gaa gaa ggc ctt cgg gtt gta aaa ctc ttt caa tag gga aga --- taa --- --- ---								
9	---								
0 E. COLI	TAT GAA GAA GGC CTT CGG GTT GTA AAG TAC TTT CAG CCG GGA GGA AGG GAG TAA AGT TAA TAC CTT								
1	***								
		470	480	490	500	510	520		
1 M73221	--- -tg acg gta cct ata gaa gaa gtc cgg gca aac tct gtg cca gca gcc gcg gta ata cgg								
2 AF084907	--- -tg acg gta cct ata gaa gaa gtc cgg gca aac tcc gtg cca gca gcc gcg gta ata cgg								
3	---								
4 AF093788	--- -tg acg gta cct ata gaa gaa gtc cgg gca aac tcc gtg cca gca gcc gcg gta ata cgg								
5	---								
6 AF227954	--- -tg acg gta cct ata gaa gaa gtc cgg gca aac tcc gtg cca gca gcc gcg gta ata cgg								
7	---								
8 U60476	--- -tg acg gta cct ata gaa gaa gtc cgg gca aac tct gtg cca gca gcc gcg gta ata cgg								
9	---								
0 E. COLI	TGC TCA TTA ACG TTA CCC GCA GAA GCA CCG GCT AAC TCC GTC CCA GCA GCC GCG GTA ATA CCG								
1	***								
		530	540	550	560	570	580	590	
1 M73221	agg ggg caa gcg ttg ttc gga att att ggg cgt aaa ggg caa gta ggt gga cta gta agt taa aag								
2 AF084907	agg ggg caa gcg ttg ttc gga att att ggg cgt aaa ggg caa gta ggt gga cta gta agt taa aag								
3	---								
4 AF093788	agg ggg caa gcg ttg ttc gga att att ggg cgt aaa ggg caa gta ggt gga cta gta agt taa aag								
5	---								
6 AF227954	agg ggg caa gcg ttg ttc gga att att ggg cgt aaa ggg caa gta ggt gga cta gta agt taa aag								
7	---								
8 U60476	agg ggg caa gcg ttg ttc gga att att ggg cgt aaa ggg caa gta ggt gga cta gta agt taa aag								
9	---								
0 E. COLI	AGG GTG CAA GCG TTA ATC GGA ATT ACT GGG CGT AAA GCG CAC GCA GCG GGT TTG TTA AGT CAG AAG								
1	---								
		600	610	620	630	640	650	660	
1 M73221	tga aat acc aaa gct taa ctt tgg agc ggc ttt taa tac tgc tag act aga ggt cga aag agg ata								
2 AF084907	tga aat acc aaa gct taa ctt tgg agc ggc ttt taa tac tgc tag act aga ggt cga aag agg ata								
3	---								
4 AF093788	tga aat acc aaa gct taa ctt tgg agc ggc ttt taa tac tgc tag act aga ggt cga aag agg ata								
5	---								
6 AF227954	tga aat acc aaa gct taa ctt tgg agc ggc ttt taa tac tgc tag act aga ggt cga aag agg ata								
7	---								
8 U60476	tga aat acc aaa gct taa ctt tgg agc ggc ttt taa tac tgc tag act aga ggt cga aag agg ata								
9	---								
0 E. COLI	TGA AAT CCC CGG GCT CAA CTT GGG AAC TGC ATC TGA TAC TGG CAA GGT TGA GTC TCG TAG AAG GGG								
11	---								
		670	680	690	700	710	720		
1 M73221	gcg gaa ttc cta gtg tag agg tga aat tgg tag ata tta gga gga aca cca gtg gcg aag gcg gct								
2 AF084907	gcg gaa ttc cta gtg tag agg tga aat tgg tag ata tta gga gga aca cca gtg gcg aag gcg gct								
3	---								
4 AF093788	gcg gaa ttc cta gtg tag agg tga aat tgg tag ata tta gga gga aca cca gtg gcg aag gcg gct								
5	---								
6 AF227954	gcg gaa ttc cta gtg tag agg tga aat tgg tag ata tta gga gga aca cca gtg gcg aag gcg gct								
7	---								
8 U60476	gcg gaa ttc cta gtg tag agg tga aat tgg tag ata tta gga gga aca cca gtg gcg aag gcg gct								
9	---								
0 E. COLI	GTA GAA TTC CAG GTC TAG CCG GGA AAT GCG TAG AGA TCT GGA GGA ATA CCG GTC GCG AAG GCG GCT								
11	---								
		730	740	750	760	770	780	790	
1 M73221	atc tgg ttc gat act gac act gag gtg cga aag cgt ggg gag caa aca gga tta gat acc ctg gta								
2 AF084907	atc tgg ttc gat act gac act gag gtg cga aag cgt ggg gag caa aca gga tta gat acc ctg gta								
3	---								
4 AF093788	atc tgg ttc gat act gac act gag gtg cga aag cgt ggg gag caa aca gga tta gat acc ctg gta								
5	---								
6 AF227954	atc tgg ttc gat act gac act gag gtg cga aag cgt ggg gag caa aca gga tta gat acc ctg gta								
7	---								
8 U60476	atc tgg ttc gat act gac act gag gtg cga aag cgt ggg gag caa aca gga tta gat acc ctg gta								
9	---								
0 E. COLI	CCC TGG ACG AAG ACT GAC GCT CAG GTG CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA GGA TTA GAT ACC CCG GTA								
11	---								

EMBL/CHIA NON CANTIS 2.7.2001 13:49										
		800	810	820	830	840	850			
1 M73221	gtc cac gct gta aac gat gag tgc t-a aat gtg agg att tt- -at ctt tgt att -gt agc taa cgc									
2 AF084907	gtc cac gct gta aac gat gag tgc t-g aat gtg ggg att ttt tat ctc tgt gtt -gt agc taa cgc									
3	---									
4 AF093788	gtc cac gct gta aac gat gag tgc t-g aat gtg ggg att ttt tat ctc tgt gtt -gt agc taa cgc									
5	---									
6 AF227954	gtc cac gct gta aac gat gag tgc t-g aat gtg ggg att ttt tat ctc tgt gtt -gt agc taa cgc									
7	---									
8 U60476	gtc cac gct gta aac gat gag tgc t-a aat gtg agg att tt- -at ctt tgt att -gt agc taa cgc									
9	---									
10 E. COLI	gtc cac gcc gta aac gat gat tgc cag gtc gtc ccc ttc agc cgc ttc cgc aac taa cgc									
11	---									
		860	870	880	890	900	910	920		
1 M73221	ggt aag cac tcc gcc tgg gga cta cgg tgg caa gac taa aac tca aag gaa ttg acg ggg acc cgc									
2 AF084907	ggt aag cac tcc gcc tgg gga cta cgg tgg caa gac taa aac tca aag gaa ttg acg ggg acc cgc									
3	---									
4 AF093788	ggt aag cac tcc gcc tgg gga cta cgg tgg caa gac taa aac tca aag gaa ttg acg ggg acc cgc									
5	---									
6 AF227954	ggt aag cac tcc gcc tgg gga cta cgg tgg caa gac taa aac tca aag gaa ttg acg ggg acc cgc									
7	---									
8 U60476	ggt aag cac tcc gcc tgg gga cta cgg tgg caa gac taa aac tca aag gaa ttg acg ggg acc cgc									
9	---									
10 E. COLI	ggt aag tcc acc gcc tgg gga cta cgg ccc caa ggt taa aac tca aat gaa ttg acg ggg gcc cgc									
11	---									
		930	940	950	960	970	980	990		
1 M73221	aca agc g-t gga gca tgt ggt tta att cga tgc tac gcg aaa aac ctt acc act ttt tga cat gaa									
2 AF084907	aca agc ggt gga gca tgt ggt tta att cga tgc aac gcg aaa aac ctt acc act cct tga cat gga									
3	---									
4 AF093788	aca agc ggt gga gca tgt ggt tta att cga tgc aac gcg aaa aac ctt acc act cct tga cat gga									
5	---									
6 AF227954	aca agc ggt gga gca tgt ggt tta att cga tgc aac gcg aaa aac ctt acc act cct tga cat gga									
7	---									
8 U60476	aca agc ggt gga gca tgt ggt tta att cga tgc aac gcg aaa aac ctt acc act ttt tga cat gaa									
9	---									
10 E. COLI	aca acc ggt gga gca tgt ggt tta att cga tgc aac gcg aaa aac ctt acc act ttt tga cat gaa									
11	---									
		1390	1400	1410	1420	1430	1440	1450		
1 M73221	gta cac act gcc cgt cac gcc atg gga att ggc tta act cga agc tgg tgt gct aac cgc aag gaa									
2 AF084907	gta cac act gcc cgt cac gcc atg gga att ggc tta act cga agc tgg tgc gcc aac cga aag gag									
3	---									
4 AF093788	gta cac act gcc cgt cac gcc atg gga att ggc tta act cga agc tgg tgc gcc aac cga aag gag									
5	---									
6 AF227954	---									
7	---									
8 U60476	gta cac act gcc cgt cac gcc atg gga att ggc tta act cga agc tgg tgt gct aac cgc aag gaa									
9	---									
10 E. COLI	gta cac acc gcc cgt cac acc atg gga gtc ggt tgc aaa aga agt agc tag ctt aac ctt cgc gag									
11	---									
		1460	1470	1480	1490	1500	1510			
1 M73221	gca gc- --- ca- ttt aag gtt --- --- -g ggt ta- --- gtg act agg --- -g t- --- ---									
2 AF084907	gca gc- --- ca- ttt aag gtt --- --- -g ggt ca- --- gtg act --- --- -g t- --- ---									
3	---									
4 AF093788	gca gc- --- ca- ttt aag gtt --- --- -g ggt ca- --- gtg act agg --- -g t- --- ---									
5	---									
6 AF227954	---									
7	---									
8 U60476	gc- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---									
9	---									
10 E. COLI	gac gct tac cac ttt ctc att cgt gac tgc ggt gaa ctc gta aca agc taa cgc tag ggc aac ctc									
11	---									
		1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580		
1 M73221	---g									
2 AF084907	---									
3	---									
4 AF093788	---g									
5	---									
6 AF227954	---									
7	---									
8 U60476	---									
9	---									
10 E. COLI	ccg									
11	---									

KEMLIČIA NON CANIS 2.7.2001 13:50										
		1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250		
1 M73221		tca aat cag cac ggc oot tat agg gtg ggc tac aca cgt got aca atg gca act aca ata ggt tgc								
2 AF084907		tca agt cag cac ggc oot tat agg gtg ggc tac aca cgt got aca atg gca act aca ata ggt tgc								
3		---								
4 AF093788		tca agt cag cac ggc oot tat agg gtg ggc tac aca cgt got aca atg gca act aca ata ggt tgc								
5		---								
6 AF227954		---								
7		---								
8 U60476		tca agt cag cac ggc oot tat agg gtg ggc tac aca cgt got aca atg gca act aca ata ggt tgc								
9		---								
10 E. COLI		TCA AGT CAG CAC GGC OOT TAT AAG GTG GGC TAC ACA CGT GCT ACA ATG GCG CAT ACA AAG AGA AGC								
11		---								
		1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320		
1 M73221		gag aac gca agg ttt agc taa tc- cat aaa agt tgt ctc agt tog gat tgt tct ctg aaa ctc gag								
2 AF084907		aat gtc gca agg ctg agc taa tc- cgt aaa agt cat ctc agt tog gat tgt cct ctg caa ctc gag								
3		---								
4 AF093788		aat gtc gca agg ctg agc taa tc- cgt aaa agt cat ctc agt tog gat tgt cct ctg caa ctc gag								
5		---								
6 AF227954		---								
7		---								
8 U60476		gag aac gca agg ttt agc taa tc- cat aaa agt tgt ctc agt tog gat tgt tct ctg caa ctc gag								
9		---								
10 E. COLI		GAG CTC GCG AGA GCA AGC GGA CCG CAT AAA GTG CGT CGT AGT CCG GAT TCG AGT CTG CAA CTC GAC								
11		---								
		1330	1340	1350	1360	1370	1380			
1 M73221		agg atg aag tog gaa tog cta gta atc gtg gat cat cac gcc aag gtg aat aag ttc tog ggt ctt								
2 AF084907		ggc atg aag tog gaa tog cta gta atc gtg gat cat cac gcc aag gtg aat aag ttc tog ggt ctt								
3		---								
4 AF093788		ggc atg aag tog gaa tog cta gta atc gtg gat cat cac gcc aag gtg aat aag ttc tog ggt ctt								
5		---								
6 AF227954		---								
7		---								
8 U60476		agg atg aag tog gaa tog cta gta atc gtg gat cat cac gcc aag gtg aat aag ttc tog ggt ctt								
9		---								
10 E. COLI		TGC ATG AAG TCG GAA TCG CTA GTA ATC GTG GAT CAG AAT GCC ACG GTG AAT ACG TTC CCG GGC CTT								
11		---								
		1390	1400	1410	1420	1430	1440	1450		
1 M73221		gta cac act gcc cgt cac gcc atg gga att ggc tta act cga agc tgg tgt gct aac cgc aag gaa								
2 AF084907		gta cac act gcc cgt cac gcc atg gga att ggc tta act cga agc tgg tgt gct aac cgc aag gaa								
3		---								
4 AF093788		gta cac act gcc cgt cac gcc atg gga att ggc tta act cga agc tgg tgt gct aac cgc aag gaa								
5		---								
6 AF227954		---								
7		---								
8 U60476		gta cac act gcc cgt cac gcc atg gga att ggc tta act cga agc tgg tgt gct aac cgc aag gaa								
9		---								
10 E. COLI		GTA CAC ACC GCC CGT CAC ACC ATG GGA GTG CGT TCG AAA AGA AGT AGG TAG CTT AAC CTT CCG GAG								
11		---								
		1460	1470	1480	1490	1500	1510			
1 M73221		gca gc- --- ca- ttt aag gtt --- --- -g ggt ta- --- gtg act agg --- -g t- --- ---								
2 AF084907		gca gc- --- ca- ttt aag gtt --- --- -g ggt ca- --- gtg act --- --- --- ---								
3		---								
4 AF093788		gca gc- --- ca- ttt aag gtt --- --- -g ggt ca- --- gtg act agg --- -g t- --- ---								
5		---								
6 AF227954		---								
7		---								
8 U60476		gc- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---								
9		---								
10 E. COLI		GCG GCT TAC CAC TTT GTG AAT CAT GAC TGG CGT GAA CTC GTA ACA AGC TAA CCG TAG GCG AAC CTG								
11		---								
		1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580		
1 M73221		---								
2 AF084907		---								
3		---								
4 AF093788		---								
5		---								
6 AF227954		---								
7		---								
8 U60476		---								
9		---								
10 E. COLI		CGC								
11		---								

Annexe II : Alignement des séquences partielles du gène ARNr 16S des souches de l'espèce *Ehrlichia canis*

EHRlichia CANIS 12.6.2001 13:52		10	20	30	40	50	60															
1 M73221	ctc	aga	acg	aac	ggt	ggc	ggc	aag	ccg	aac	aca	tgc	aag	tgc	aac	gga	caa	tta	ttt	ata	goc	tct
2 M73226	ctc	aga	acg	aac	ggt	ggc	ggc	aag	ccg	aac	aca	tgc	aag	tgc	aac	gga	caa	tta	ttt	ata	goc	tct
3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4 U26740	---	---	---	---	---	---	---	aag	ccg	aac	aca	tgc	aag	tgc	aac	gga	caa	tta	ttt	ata	goc	tct
5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6 AF156785	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8 AF156786	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10	ctc	aga	acg	aac	ggt	ggc	ggc	aag	ccg	aac	aca	tgc	aag	tgc	aac	gga	caa	tta	ttt	ata	goc	tct
11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200							
1 M73221	ggc	tat	agg	aaa	ttg	tta	gtg	gca	gac	ggg	tga	gta	atg	agt	agg	aat	cta	ccg	agt	agt	acg	gaa
2 M73226	ggc	tat	agg	aaa	ttg	tta	gtg	gca	gac	ggg	tga	gta	atg	agt	agg	aat	cta	ccg	agt	agt	acg	gaa
3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4 U26740	ggc	tat	agg	aaa	ttg	tta	gtg	gca	gac	ggg	tga	gta	atg	agt	agg	aat	cta	ccg	agt	agt	acg	gaa
5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
6 AF156785	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
8 AF156786	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
10	ggc	tat	agg	aaa	ttg	tta	gtg	gca	gac	ggg	tga	gta	atg	agt	agg	aat	cta	ccg	agt	agt	acg	gaa
11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
		140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270							
1 M73221	tag	cca	tta	gaa	atg	gtg	ggt	aat	act	gta	taa	tcc	ccg	agg	ggg	aaa	gat	tta	tcc	cta	tta	gat
2 M73226	tag	cca	tta	gaa	atg	gtg	ggt	aat	act	gta	taa	tcc	ccg	agg	ggg	aaa	gat	tta	tcc	cta	tta	gat
3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4 U26740	tag	cca	tta	gaa	atg	gtg	ggt	aat	act	gta	taa	tcc	ccg	agg	ggg	aaa	gat	tta	tcc	cta	tta	gat
5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
6 AF156785	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
8 AF156786	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
10	tag	cca	tta	gaa	atg	gtg	ggt	aat	act	gta	taa	tcc	ccg	agg	ggg	aaa	gat	tta	tcc	cta	tta	gat
11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
		280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410							
1 M73221	aag	cca	acg	tta	gat	tag	cta	gtt	ggt	gag	gta	atg	ggt	tac	caa	ggc	tat	gat	cta	tag	ctg	gtc
2 M73226	aag	cca	acg	tta	gat	tag	cta	gtt	ggt	gag	gta	atg	ggt	tac	caa	ggc	tat	gat	cta	tag	ctg	gtc
3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4 U26740	aag	cca	acg	tta	gat	tag	cta	gtt	ggt	gag	gta	atg	ggt	tac	caa	ggc	tat	gat	cta	tag	ctg	gtc
5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
6 AF156785	aag	cca	acg	tta	gat	tag	cta	gtt	ggt	gag	gta	atg	ggt	tac	caa	ggc	tat	gat	cta	tag	ctg	gtc
7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
8 AF156786	aag	cca	acg	tta	gat	tag	cta	gtt	ggt	aag	gta	atg	ggt	tac	caa	ggc	tat	gat	cta	tag	ctg	gtc
9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
10	aag	cca	acg	tta	gat	tag	cta	gtt	ggt	gag	gta	atg	ggt	tac	caa	ggc	tat	gat	cta	tag	ctg	gtc
11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
		320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450							
1 M73221	tga	gag	gac	gat	cag	cca	cac	tgg	aac	tga	gat	acg	gtc	cag	act	ccg	acg	gga	ggc	agc	agt	ggg
2 M73226	tga	gag	gac	gat	cag	cca	cac	tgg	aac	tga	gat	acg	gtc	cag	act	ccg	acg	gga	ggc	agc	agt	ggg
3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4 U26740	tga	gag	gac	gat	cag	cca	cac	tgg	aac	tga	gat	acg	gtc	cag	act	ccg	acg	gga	ggc	agc	agt	ggg
5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
6 AF156785	tga	gag	gac	gat	cag	cca	cac	tgg	aac	tga	gat	acg	gtc	cag	act	ccg	acg	gga	ggc	agc	agt	ggg
7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
8 AF156786	tga	gag	gac	gat	cag	cca	cac	tgg	aac	tga	gat	acg	gtc	cag	act	ccg	acg	gga	ggc	agc	agt	ggg
9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
10	tga	gag	gac	gat	cag	cca	cac	tgg	aac	tga	gat	acg	gtc	cag	act	ccg	acg	gga	ggc	agc	agt	ggg
11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
		460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590							
1 M73221	gaa	tat	tgg	aca	atg	ggc	gaa	agc	ctg	atc	cag	cta	tgc	ggc	gtg	agt	gaa	gaa	ggc	ctt	cgg	gtt
2 M73226	gaa	tat	tgg	aca	atg	ggc	gaa	agc	ctg	atc	cag	cta	tgc	ggc	gtg	agt	gaa	gaa	ggc	ctt	cgg	gtt
3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
4 U26740	gaa	tat	tgg	aca	atg	ggc	gaa	agc	ctg	atc	cag	cta	tgc	ggc	gtg	agt	gaa	gaa	ggc	ctt	cgg	gtt
5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
6 AF156785	gaa	tat	tgg	aca	atg	ggc	gaa	agc	ctg	atc	cag	cta	tgc	ggc	gtg	agt	gaa	gaa	ggc	ctt	cgg	gtt
7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
8 AF156786	gaa	tat	tgg	aca	atg	ggc	gaa	agc	ctg	atc	cag	cta	tgc	ggc	gtg	agt	gaa	gaa	ggc	ctt	cgg	gtt
9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
10	gaa	tat	tgg	aca	atg	ggc	gaa	agc	ctg	atc	cag	cta	tgc	ggc	gtg	agt	gaa	gaa	ggc	ctt	cgg	gtt
11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

Légende : - 1 M73221 OKLAHOMA
 - 2 M73226 FLORIDA = 3 : comparaison de 1 & 2
 - 4 U26740 ISRAEL = 5 : 1/4
 - 6 AF156785 South CHINA Gdt 3 = 7 : 1/6
 - 8 AF156786 South CHINA Gxht 67 = 9 : 1/8
 - 10 AF162860 Guangzhou CHINA = 11 : 1/10

BRUCHIA CANIS 12.6.2001 13:52									
		400	410	420	430	440	450	460	
1 M73221	gta	aaa	ctc	ttt	caa	tag	gga	aga	taa
2 M73226	gta	aaa	ctc	ttt	caa	tag	gga	aga	taa
3									
4 U26740	gta	aaa	ctc	ttt	caa	tag	gga	aga	taa
5									
6 AF156785	gta	aaa	ctc	ttt	caa	tag	gga	aga	taa
7									
8 AF156786	gta	aaa	ctc	ttt	caa	tag	gga	aga	taa
9									
11									
		470	480	490	500	510	520		
1 M73221	cag	cag	cog	egg	taa	tac	gga	ggg	ggc
2 M73226	cag	cag	cog	egg	taa	tac	gga	ggg	ggc
3									
4 U26740	cag	cag	cog	egg	taa	tac	gga	ggg	ggc
5									
6 AF156785	cag	cag	cog	egg	taa	tac	gga	ggg	ggc
7									
8 AF156786	cag	cag	cog	egg	taa	tac	gga	ggg	ggc
9									
11									
		530	540	550	560	570	580	590	
1 M73221	gtg	gac	tag	taa	gtt	aaa	agt	gaa	ata
2 M73226	gtg	gac	tag	taa	gtt	aaa	agt	gaa	ata
3									
4 U26740	gtg	gac	tag	taa	gtt	aaa	agt	gaa	ata
5									
6 AF156785	gtg	gac	tag	taa	gtt	aaa	agt	gaa	ata
7									
8 AF156786	gtg	gac	tag	taa	gtt	aaa	agt	gaa	ata
9									
11									
BRUCHIA CANIS 12.6.2001 13:52									
		600	610	620	630	640	650	660	
1 M73221	cta	gag	gtc	gaa	aga	gga	tag	cgg	aat
2 M73226	cta	gag	gtc	gaa	aga	gga	tag	cgg	aat
3									
4 U26740	cta	gag	gtc	gaa	aga	gga	tag	cgg	aat
5									
6 AF156785	cta	gag	gtc	gaa	aga	gga	tag	cgg	aat
7									
8 AF156786	cta	gag	gtc	gaa	aga	gga	tag	cgg	aat
9									
11									
		670	680	690	700	710	720		
1 M73221	cac	cag	tgg	cga	agg	ogg	cta	tct	ggg
2 M73226	cac	cag	tgg	cga	agg	ogg	cta	tct	ggg
3									
4 U26740	cac	cag	tgg	cga	agg	ogg	cta	tct	ggg
5									
6 AF156785	cac	cag	tgg	cga	agg	ogg	cta	tct	ggg
7									
8 AF156786	cac	cag	tgg	cga	agg	ogg	cta	tct	ggg
9									
11									
		730	740	750	760	770	780	790	
1 M73221	cag	gat	tag	ata	ccc	tgg	tag	ccc	acg
2 M73226	cag	gat	tag	ata	ccc	tgg	tag	ccc	acg
3									
4 U26740	cag	gat	tag	ata	ccc	tgg	tag	ccc	acg
5									
6 AF156785	cag	gat	tag	ata	ccc	tgg	tag	ccc	acg
7									
8 AF156786	cag	gat	tag	ata	ccc	tgg	tag	ccc	acg
9									
11									

[illegible]



ANNEXE III : Alignement des séquences des amplicons de 385 pb spécifiques d'*E. canis* du gène ARNr 16S détecté sur sang total des quatre chiens inoculés expérimentalement

alignement du 29/06/01 2.7.2001 16:17		10	20	30	40	50	60	
1 M73221		ctc aga acg aac gct ggc ggc aag oct aac aca tgc aag tgc aac gga caa tta ttt ata gcc tct						
2 R14CHE3R1.AB1		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
3		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
4 R14CHE3R2.AB1		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
5		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
6 R14DHE1C1.AB1		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
7		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
8 R14DHE1C2.AB1		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
9		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
		70 Hc1C	80	90	100	110	120	130
1 M73221		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
2 R14CHE3R1.AB1		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
3		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
4 R14CHE3R2.AB1		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
5		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
6 R14DHE1C1.AB1		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
7		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
8 R14DHE1C2.AB1		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
9		ggc tat agg aaa ttg tta gtg gca gac ggc tga gta atg oct agg aat cta oct agt agt acg gaa						
		140	150	160	170	180	190	
1 M73221		tag oca tta gaa atg gtg ggt aat act gta taa tcc ccg agg ggg aaa gat tta tog cta tta gat						
2 R14CHE3R1.AB1		tag oca tta gaa atg gtg ggt aat act gta taa tcc ccg agg ggg aaa gat tta tog cta tta gat						
3		tag oca tta gaa atg gtg ggt aat act gta taa tcc ccg agg ggg aaa gat tta tog cta tta gat						
4 R14CHE3R2.AB1		tag oca tta gaa atg gtg ggt aat act gta taa tcc ccg agg ggg aaa gat tta tog cta tta gat						
5		tag oca tta gaa atg gtg ggt aat act gta taa tcc ccg agg ggg aaa gat tta tog cta tta gat						
6 R14DHE1C1.AB1		tag oca tta gaa atg gtg ggt aat act gta taa tcc ccg agg ggg aaa gat tta tog cta tta gat						
7		tag oca tta gaa atg gtg ggt aat act gta taa tcc ccg agg ggg aaa gat tta tog cta tta gat						
8 R14DHE1C2.AB1		tag oca tta gaa atg gtg ggt aat act gta taa tcc ccg agg ggg aaa gat tta tog cta tta gat						
9		tag oca tta gaa atg gtg ggt aat act gta taa tcc ccg agg ggg aaa gat tta tog cta tta gat						
		200	210	220	230	240	250	260
1 M73221		agg oct acg tta gat tag cta gtt ggt gag gta atg gct tac caa ggc tat gat cta tag ctg gtc						
2 R14CHE3R1.AB1		agg oct acg tta gat tag cta gtt ggt gag gta atg gct tac caa ggc tat gat cta tag ctg gtc						
3		agg oct acg tta gat tag cta gtt ggt gag gta atg gct tac caa ggc tat gat cta tag ctg gtc						
4 R14CHE3R2.AB1		agg oct acg tta gat tag cta gtt ggt gag gta atg gct tac caa ggc tat gat cta tag ctg gtc						
5		agg oct acg tta gat tag cta gtt ggt gag gta atg gct tac caa ggc tat gat cta tag ctg gtc						
6 R14DHE1C1.AB1		agg oct acg tta gat tag cta gtt ggt gag gta atg gct tac caa ggc tat gat cta tag ctg gtc						
7		agg oct acg tta gat tag cta gtt ggt gag gta atg gct tac caa ggc tat gat cta tag ctg gtc						
8 R14DHE1C2.AB1		agg oct acg tta gat tag cta gtt ggt gag gta atg gct tac caa ggc tat gat cta tag ctg gtc						
9		agg oct acg tta gat tag cta gtt ggt gag gta atg gct tac caa ggc tat gat cta tag ctg gtc						
alignement du 29/06/01 2.7.2001 16:17		270	280	290	300	310	320	330
1 M73221		tga gag gac gat cag oca cac tgg aac tga gat acg gtc cag act oct acg gga ggc agc agt ggc						
2 R14CHE3R1.AB1		tga gag gac gat cag oca cac tgg aac tga gat acg gtc cag act oct acg gga ggc agc agt ggc						
3		tga gag gac gat cag oca cac tgg aac tga gat acg gtc cag act oct acg gga ggc agc agt ggc						
4 R14CHE3R2.AB1		tga gag gac gat cag oca cac tgg aac tga gat acg gtc cag act oct acg gga ggc agc agt ggc						
5		tga gag gac gat cag oca cac tgg aac tga gat acg gtc cag act oct acg gga ggc agc agt ggc						
6 R14DHE1C1.AB1		tga gag gac gat cag oca cac tgg aac tga gat acg gtc cag act oct acg gga ggc agc agt ggc						
7		tga gag gac gat cag oca cac tgg aac tga gat acg gtc cag act oct acg gga ggc agc agt ggc						
8 R14DHE1C2.AB1		tga gag gac gat cag oca cac tgg aac tga gat acg gtc cag act oct acg gga ggc agc agt ggc						
9		tga gag gac gat cag oca cac tgg aac tga gat acg gtc cag act oct acg gga ggc agc agt ggc						
		340	350	360	370	380	390	
1 M73221		gaa tat tgg aca atg ggc gaa agc ctg atc cag cta tgc cgc gtc agt gaa gaa ggc ctt ogg gtt						
2 R14CHE3R1.AB1		gaa tat tgg aca atg ggc gaa agc ctg atc cag cta tgc cgc gtc agt gaa gaa ggc ctt ogg gtt						
3		gaa tat tgg aca atg ggc gaa agc ctg atc cag cta tgc cgc gtc agt gaa gaa ggc ctt ogg gtt						
4 R14CHE3R2.AB1		gaa tat tgg aca atg ggc gaa agc ctg atc cag cta tgc cgc gtc agt gaa gaa ggc ctt ogg gtt						
5		gaa tat tgg aca atg ggc gaa agc ctg atc cag cta tgc cgc gtc agt gaa gaa ggc ctt ogg gtt						
6 R14DHE1C1.AB1		gaa tat tgg aca atg ggc gaa agc ctg atc cag cta tgc cgc gtc agt gaa gaa ggc ctt ogg gtt						
7		gaa tat tgg aca atg ggc gaa agc ctg atc cag cta tgc cgc gtc agt gaa gaa ggc ctt ogg gtt						
8 R14DHE1C2.AB1		gaa tat tgg aca atg ggc gaa agc ctg atc cag cta tgc cgc gtc agt gaa gaa ggc ctt ogg gtt						
9		gaa tat tgg aca atg ggc gaa agc ctg atc cag cta tgc cgc gtc agt gaa gaa ggc ctt ogg gtt						
		400	410	420 Hc2S	430	440	450	460
1 M73221		gta aaa ctc ttt caa tag gga aga taa tga ogg tac cta tag aag aag tcc cgg caa act ctg tgc						
2 R14CHE3R1.AB1		gta aaa ctc ttt caa tag gga aga taa tga ogg tac cta tag aag aag tcc cgg caa act ctg tgc						
3		gta aaa ctc ttt caa tag gga aga taa tga ogg tac cta tag aag aag tcc cgg caa act ctg tgc						
4 R14CHE3R2.AB1		gta aaa ctc ttt caa tag gga aga taa tga ogg tac cta tag aag aag tcc cgg caa act ctg tgc						
5		gta aaa ctc ttt caa tag gga aga taa tga ogg tac cta tag aag aag tcc cgg caa act ctg tgc						
6 R14DHE1C1.AB1		gta aaa ctc ttt caa tag gga aga taa tga ogg tac cta tag aag aag tcc cgg caa act ctg tgc						
7		gta aaa ctc ttt caa tag gga aga taa tga ogg tac cta tag aag aag tcc cgg caa act ctg tgc						
8 R14DHE1C2.AB1		gta aaa ctc ttt caa tag gga aga taa tga ogg tac cta tag aag aag tcc cgg caa act ctg tgc						
9		gta aaa ctc ttt caa tag gga aga taa tga ogg tac cta tag aag aag tcc cgg caa act ctg tgc						
		470	480	490	500	510	520	
1 M73221		cag cag cgg cgg taa tac gga ggg ggc aag cgt tgt tgc gaa tta ttg ggc gta aag ggc acg tag						
2 R14CHE3R1.AB1		cag cag cgg cgg taa tac gga ggg ggc aag cgt tgt tgc gaa tta ttg ggc gta aag ggc acg tag						
3		cag cag cgg cgg taa tac gga ggg ggc aag cgt tgt tgc gaa tta ttg ggc gta aag ggc acg tag						
4 R14CHE3R2.AB1		cag cag cgg cgg taa tac gga ggg ggc aag cgt tgt tgc gaa tta ttg ggc gta aag ggc acg tag						
5		cag cag cgg cgg taa tac gga ggg ggc aag cgt tgt tgc gaa tta ttg ggc gta aag ggc acg tag						
6 R14DHE1C1.AB1		cag cag cgg cgg taa tac gga ggg ggc aag cgt tgt tgc gaa tta ttg ggc gta aag ggc acg tag						
7		cag cag cgg cgg taa tac gga ggg ggc aag cgt tgt tgc gaa tta ttg ggc gta aag ggc acg tag						
8 R14DHE1C2.AB1		cag cag cgg cgg taa tac gga ggg ggc aag cgt tgt tgc gaa tta ttg ggc gta aag ggc acg tag						
9		cag cag cgg cgg taa tac gga ggg ggc aag cgt tgt tgc gaa tta ttg ggc gta aag ggc acg tag						

BIBLIOGRAPHIE

1. **ABEYGUNAWARDENA I. KAHOMA I. et SMITH R.D.** Pathophysiology of canine ehrlichiosis. In : *Ehrlichiosis. Williams et Kakoma Eds, Kluwer Academic Publishers.* 1990: 78-92.
2. **ADEYANJU B.J. et ALIU YO.** Chemotherapy of canine ehrlichiosis and babesiosis with Imidocarb Dipropionate. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1982. **18** : 827-830.
3. **ADES E.W. CANDAL F.J. SWERLICK R.A. et al.** HMEC-1 : Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 1992. **99** : 683-690.
4. **AMYX H.L. et HUXSOLL D.L.** Red and gray foxes-potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. *J. Wildl. Dis.* 1973. **9** : 47-50.
5. **ANDERSON B.E. SUMNER J.W. DAWSON J.E et al.** Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1992. **30** : 775-780.
6. **ANDERSON B.E. DAWSON J.E. JONES D.C. et al.** *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human Ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991. **29** (12) : 2838-2842.
7. **BEAUFILS JP.** Rickettsioses du chien et du chat. In *Encyclopédie Vétérinaire Tome 3.* Elsevier, Paris. 1997. Médecine Générale 1100 : 1-7.
8. **BEAUFILS JP.** Ehrlichiose canine. In *Encyclopédie Vétérinaire Tome 3.* Elsevier, Paris. 1997. Médecine Générale 1200 : 1-7.
9. **BEAUFILS JP.** Clinique, Biologie et Traitement de l'Ehrlichiose chez le chien et le chat. In : *Cahier du Vétomécum. Maladies transmises par les tiques, Mérial.* 1997 : 13-25.
10. **BEAUFILS JP. LEGROUX JP.** Présence simultanée d'*Ehrlichia sp.* et d'*Hepatozoon canis* dans des granulocytes de chien : à propos de deux cas. *Prat. Chir. Anim. Comp.* 1992. **27** (1) : 81-86.
11. **BEAUFILS JP. MARTIN-GRANEL J. et BERTRAND F.** Atteinte médullaire selective et hématopoïèse extramédullaire chez un chien infecté par *Ehrlichia canis* et *Hepatozoon canis*. *Prat.Méd.Chir.Anim.Comp.* 1991. **26** (4) : 347-353.
12. **BEAUFILS JP. MARTIN-GRANEL J. et JUMELLE P.** Diagnostic cytologique des ehrlichioses canines. *Prat.Méd.Chir.Anim.Comp.* 1995. **30** : 189-195.
13. **BEAUFILS JP. MARTIN-GRANEL J. et JUMELLE P.** Infection du chat par une *Ehrlichia sp.* : à propos de trois cas. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.* 1995. **30** (3) : 397-402.
14. **BONI M. et DAVOUST B.** Contrôle des zoonoses au sein des effectifs de chiens militaires stationnés sous les tropiques. *Med. Trop.* 1997. **57** : 98.
15. **BONNARD P. et DRALEZ F.** Cas clinique : pancytopénie canine. *Point Vét.* 1990. **22** (128) : 129-134.
16. **BOURDEAU P.** Les tiques d'importance médicale et vétérinaire. Principales espèces de tiques dures. *Point Vét.* 1993. **25** (151) : 27-41.
17. **BOWMAN AS. COON LB. NEEDHAM GR. et al.** Tick saliva : recent advances and implications for vector competence. *Med. Vet. Entomol.* 1997. **11** (3) : 277-285.
18. **BREITSCHWERDT EB. WOODY BJ. ZERBE C.A.ç et al.** Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. *J. Vet. Intern. Med.* 1987. **1** : 2-9.
19. **BREITSCHWERDT EB. et al.** Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998. **42** : 362-368.

20. **BREITSCHWERDT EB. HEGARTY BC. et HANCOCK S.I.** Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. 1998. *J. Clin. Microbiol.* **36** (9) : 2645-2651.
21. **BROUQUI P.** *Ehrlichia* . In : Précis de Bactériologie Clinique. Editions ESKA, Paris. 2000 : 1651- 1662.
22. **BROUQUI P. et RAOULT D.** *Ehrlichia*. Ehrlichiose. Encycl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses. 8-037-1-25. 1998, 10p.
23. **BROUQUI P. et RAOULT D.** Effects of antibiotics on the phagolysosome fusion in *Ehrlichia sennetsu* infected P 388 D1 cells. In : Kasar J. Raoult D. eds. *Rickettsia* and Rickettsial diseases. Bratislava : Publishing house of the Slovak Academy of Sciences. 1991 : 751-757.
24. **BROUQUI P. et RAOULT D.** Susceptibilities of *Ehrlichia* to antibiotics. In : Antimicrobial agents and intracellular pathogens. RAOULT D. eds. Boca Raton : CRC Press. 1993 : 181-199.
25. **BUHLES WC. HUXSOLL DL. et RISTIC M.** Tropical Canine pancytopenia : clinical, hematologic and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline Therapy and challenge inoculation. *J. Infect. Dis.* 1974; **130** : 357-367.
26. **BUHLES WC. HUXSOLL DL. et HILDEBRANDT P.K.** Tropical Canine Pancytopenia : role of aplastic anemia in the pathogenesis of severe disease. *J. Comp. Pathol.* 1975. **85** : 511-521.
27. **BURGHEN GA. BEISEL WR. WALKER J.S. et al.** Development of hypergammaglobulinemia in Tropical Canine Pancytopenia. *Am. J. Vet. Res.* 1971. **32** (5) : 749-756.
28. **BUSSIERAS J. et CHERMETTE R.** *Abrégé de Parasitologie vétérinaire Fascicule IV Entomologie vétérinaire*. 1991 : 37-52.
29. **BUXTON A. et FRASER G.** *The Rickettsias*. In *Animal microbiology*. London, Blackwell Scientific Publications. 1977 : 359-377.
30. **CAPELLI J.L. BOHLAY P. et BARRE D.** Carence en folates et vitamine B12 chez un chien infecté par *Ehrlichia canis*. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.* 1994. **29** : 395-402.
31. **CECCHINI G. BEKELE T. et KASALI O.B.** The effect of repeated freezing and thawing of serum on the activity of antibodies. *Veterinary Research Communications*. 1992. **16** : 425-428.
32. **CHANG W.L. et PAN M.J.** Specific Amplification of

38. **DAVOUST B.** Epidémiologie de l'ehrlichiose, de la leishmaniose et de la dirofilariose canine. A propos de la situation actuelle dans les effectifs de l'armée française. *Rec. Méd. Vét.* 1994. **145** (4) : 249-256.
39. **DAVOUST B.** L'ehrlichiose canine. *Point Vét.* 1993. **25** (151) : 43-51.
40. **DAVOUST B. MACKOWIAK M. et MOREAU Y.** Ehrlichiose canine, Enquête épidémiologique. *Rec. Méd. Vét.* 1986. **162** (4) : 471-475.
41. **DAVOUST B. PARZY D. et BONI M.** Essai d'un test d'immunomigration rapide en vue du dépistage de l'ehrlichiose canine. *Bull. Soc.Vét. Prat. de France.* 2000. **84** (3).
42. **DAVOUST B. et PARZY D.** Ehrlichiose canine : Surveillance épidémiologique dans les chenils militaires du Sud-Est. *Rec. Méd. Vét.* 1989. **165** (4) : 373-377.
43. **DAVOUST B. PARZY D. et PUBERT D.** Bilan de 10 années de surveillance épidémiologique de l'ehrlichiose dans les chenils militaires corses. *Rec. Méd. Vét.* 1994. **170** (8-9) : 531-537.
44. **DAVOUST B. PARZY D. et al.** Ehrlichiose canine chronique : Intérêt de la numération plaquettaire. *Revue Méd. Vét.* 1991. **142** (4) : 287-292.
45. **DAVOUST B. PARZY D. OTT D. et al.** Evaluation de l'efficacité de la doxycycline dans la lutte contre l'ehrlichiose canine asymptomatique. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.* 1994. **29** : 575-581.
46. **DAVOUST B. PARZY D. PUBERT D. et al.** Signes hématologiques de l'ehrlichiose canine aigüe. *Rec. Méd. Vét.* 1996. **147** (1) : 69-74.
47. **DAVOUST B. et PARZY D.** Actualités des Ehrlichioses. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France* .1995. **79.** (4) : 183-204.
48. **DAVOUST B. PARZY D. et al.** Ehrlichiose canine expérimentale : étude clinique et thérapeutique. *Rec. Méd. Vét.* 1991. **27** : 256-266.
49. **DAVOUST B.** Prophylaxie médico-sanitaire de l'ehrlichiose canine. Note du Bureau Vétérinaire de la Direction Centrale du Service de Santé des Armées. Mars 2001.« Communication personnelle ».
50. **DAWSON JE. et RIKIHISA Y.** Growing *Ehrlichia species* in a continuous cell line. *U.S. Pat.* 1993. **5** (192) : 679.
51. **DAWSON JE. RIKIHISA Y. EWING S.A. et al.** Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. *J. Infect. Dis.* 1991. **163** : 564-567.
52. **DAWSON JE. CANDAL FJ. GEORGE V.G. et al.** Human endothelial cells as an alternative to DH82 cells for isolation of *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia canis*, and *Rickettsia rickettsii*. *Pathobiology.* 1993. **61**: 293-296.
53. **DAWSON JE. STALLKNECHT D.E. HOWERTH E.W. et al.** Susceptibility of while-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to Infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1994. **32** (11) : 2725-2728.
54. **DAWSON JE. WARNER C. EWING SA. et al.** Fingerprinting of *Ehrlichia species* repetitive element PCR. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997. **57** (1) : 109-114.
55. **DAWSON JE. ANDERSON BE. et al.** Isolation and characterization of an *Ehrlichia sp.* from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991. **29** (12) : 2741-2745.
56. **DAWSON JE. et EWING SA.** Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis, in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1992. **53** : 1322-1327.

57. **DAY M.J.** Mechanisms of immunomodulation by ticks and tick-borne infectious agents. Proceeding Colloque Merial Amsterdam Mars 2001. Maladies transmises par les tiques aux animaux.
58. **DEPASSE F.** Piéges en immunoanalyse. *Option/Bio*. 1995. **136** : 1-4.
59. **DONATIEN A. et LESTOQUARD F.** Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. *Bull. Soc. Path. Exot.* 1935. **28** : 418-419.
60. **DONATIEN A. et LESTOQUARD F.** Etat actuel des connaissances sur les Rickettsioses animales. *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*. 1937. **15** : 142-187.
61. **DRANCOURT M.** Outils moléculaires d'identification en bactériologie. *Méd. Mal. Infect.* 1998. **28** : 380-382.
62. **DUMLER J.S. et BROUQUI P.** Human granulocytic ehrlichiosis. 1997. In : *Rickettsial Infection and Immunity*. Plenum Press. New-York : 149-162.
63. **DUMLER J.S. et WALKER D.H.** Tick-borne ehrlichioses. *Lancet. Infectious Diseases*. Avril 2001: 21-28.
64. **ELIAS E.** Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. *J. Small Anim. Pract.* 1991. **33** : 540-543.
65. **EUZEBY J.P.** *Ehrlichia canis*. In : Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. 2000. site Internet : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ee/canis.html>.
66. **FELEK S. UNVER A. STICH W. et al.** Sensitive detection of *Ehrlichia chaffeensis* in cell culture blood, and tick specimens by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001. **39** (2) : 460-463.
67. **FREDERICKS D.N. et RELMAN D.A.** *Clin. Microbiol. Rev.* 1996. **9** : 18-33.
68. **GAUNT S. CORSTVET R. et al.** Isolation of *Ehrlichia canis* from Dogs following Subcutaneous Inoculation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996. **34** (6) : 1429-1432.
69. **GHORBEL A. CADORE JL. et al.** L'efficacité de l'oxytétracycline dans le traitement de l'ehrlichiose canine. *Revue Méd. Vét.* 1993. **144** : 109-114.
70. **GREENE C.E. et HARVEY J.W.** Canine ehrlichiosis in clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat. GREENE C.E. W.B. SAUNDERS. 1984. Philadelphie : 545-561.
71. **GROVES M.G. DENNIS G.L. AMYX HL. et al.** Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by Ticks. *Am. J. Vet. Res.* 1975. **36** : 937-940.
72. **HARRUS S. BARK H. et WANER T.** Canine monocytic ehrlichiosis : An Update. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 1997. **19** (4) : 431-441.
73. **HARRUS S. WANER T. AIZENBERG I. et al.** Amplification of *Ehrlichia* DNA from Dogs 34 months after Infection with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.* 1998. **36** (1) : 73-76.
74. **HARRUS S. WANER T. et WEISS D.J. et al.** Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1996. **51**: 13-20.
75. **HARRUS S. WANER T. ELDOR A. et al.** Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Record*. 1996. **139** : 290-293.
76. **HARRUS S. WANER T. AVIDAR Y. et al.** Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*. 1996. **66** (3-4). 241-249.
77. **HARRUS S. WANER T. BARK H. et al.** Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of clinical Microbiology*. 1999. **37** (9) : 2745-2749.

78. **HEALD R.D.** Ehrlichia-associated Coombs'-positive anemia in a dog. *Canine Practice*. 1991. **16** (3) : 13-21.
79. **HELMET I.E. LEWIS G.E.Jr. HUXSOLL D.L. et al.** Serial propagation of *Ehrlichia canis* in primary canine peripheral blood monocyte cultures. *Cornell Vet.* 1980. **70** : 37-42.
80. **HILDEBRANDT P.K. HUXSOLL D.L. WALKER J.S. et al.** Pathology of canine Ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia). *Am. J. Vet. Res.* 1973. **34** (10) : 1309-1320.
81. **HOLLAND C. et RISTIC M.** Developpement of a cell line continuous in vitro propagation of *Ehrlichia canis*. Proceeding 4th International Symposium Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Piestany Spa. Czechoslovakia. 1990 : 771-775.
82. **HUA P. YUBAI M. SHIDE T. et al.** Canine ehrlichiosis Ffound in China. In Rickettsiae and rickettsial diseases as the turn of the third millenium.RAOULT D. eds. Elsevier, Paris. 1999 : 369-372.
83. **INOKUMA H. RAOULT D. et BROUQUI P.** Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2000. **38** (11) : 4219-4221.
84. **IQBAL Z. CHAICHANASIRIWITHAYA W. et RIKIHISA Y.** Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine Ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1994.**32** (7) : 1658-1662.
85. **IQBAL Z. et RIKIHISA Y.** Application of the PCR for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. *Veterinary Microbiology*. 1994. **42** : 281-287.
86. **JESTIN A. FOULON T.** Amplification enzymatique du gène par PCR. *Point Vét.* 1989. **21** (124) : 49-55.
87. **KAKOMA I. CARSON CA. et RISTIC M.** Direct and indirect lymphocyte participation in the immunity and immunopathology of Tropical Canine Pancytopenia. A review . *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1980. **3** : 291-298.
88. **KAKOMA I. CARSON C.A. RISTIC M. et al.** Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine Ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.* 1977. **38** (10) : 1557-1559.
89. **KAKOMA I. CARSON CA. RISTIC M. et al.** Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. *Infect. Immun.* 1978. **20** : 242-247.
90. **KEYSARY A. WANER T. ROSNER M. et al.** The first isolation, *in vitro* propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. *Veterinary Parasitology*. 1996. **62**: 331-340.
91. **KORDICK S. BREITSCHWERDT E.B.** Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North America. *J. clin. Microbio.* 1999. **37** (8) : 2631-2638.
92. **KUEHN NF. et GAUNT SD.** Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *JAVMA*. 1985. **186** (4) : 355-358.
93. **LATOUR S.** Biologie des Tiques et rôles pathogènes. In : Cahier du Vétomecum, Maladies transmises par les tiques. Mérial. 1997 : 3-8.
94. **LEWIS G.E. RISTIC M. SMITH R.D. et al.** The brown tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.* 1977. **38** (12) : 1953-1955.
95. **LEWIS G.E. HILL S.L. RISTIC M. et al.** Effect of canine immune serum on the growth of *Ehrlichia canis* within non immune canine macrophages. *Am. J. Vet. Res.* 1978. **39** (1) : 71-75.

96. **LEWIS G.E. et RISTIC M.** Effect of canine immune macrophages and canine immune serum on the growth of *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.* 1978. **39** (1) : 77-82.
97. **LOSSON B.J. et BAAR D.** Tick species commonly found on dogs and cats in Belgium. Proceeding Colloque Merial Amsterdam Mars 2001. Maladies transmises par les tiques aux animaux.
98. **MAEDA K. MARKOWITZ N.** Human infection with *Ehrlichia canis* a leucocytic Rickettsia. *N. Eng. J. Med.* 1987. **316** (14) : 853-856.
99. **MAGNARELLI L.A.** Hemocytic rickettsia like organisms in ticks : serologic reactivity with antisera to *Ehrlichiae* and detection of DNA of agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995oct : 2710-2714.
100. **MATTHEWMAN LA. KELLY PJ. BROUQUI P. et al.** Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection. *Journal of the South African Veterinary Association.* 1994. **65** (3) : 104-107.
101. **MATTHEWMAN LA.** Report on attempt to show presence of *Ehrlichia spp.* DNA in a dog with chronic ehrlichiosis using PCR. "Communication personnelle".
102. **MAURIN M. et RAOULT D.** Antibiotics penetration within eukaryotic cells, p21-37. In : D. Raoult (ed.), *Antimicrobial agents and intracellular pathogens.* 1993. CRC Press, Boca Raton, Fla.
103. **MAURIN M. ABERGEL C. et RAOULT D.** DNA Gyrase-mediated natural resistance to fluoroquinolones in *Ehrlichia spp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2001. **45** (7) : 2098-2105.
104. **MC BRIDE JW. CORSTVET R.E. GAUNT S.D. et al.** PCR Detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996. **8** : 441-447.
105. **MC BRIDE JW.** Molecular cloning of the gene for conserved major immunoreactive 28-kilodalton protein of *Ehrlichia canis* : a potential serodiagnostic antigen. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999. **6** : 392-399.
106. **NIMS RM. FERGUSON JA.** Epizootiology of Tropical Canine Pancytopenia in Southeast Asia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1971. **158** : 53-63.
107. **NYINDO MBA. HUXSOLL DL. RISTIC M. et al.** Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.* 1980. **41** : 250-254.
108. **NYINDO MBA. RISTIC M. HUXSOLL D.L. et al.** Tropical canine pancytopenia : *in vitro* cultivation of the causative agent- *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.* 1971. **32** : 1651-1658.
109. **OGUNKOYA AB. ABEYANJU JB et ALIU Y.O.** Experiences with the use of imizol in treating canine blood parasites in Nigeria. *Journal of Small Animal Practice.* 1981. **22** (12) : 775-778.
110. **PAROLA P.** Approche Moléculaire de l'épidémiologie des Rickettsioses et Ehrlichioses transmises par les tiques . Thèse d'Université. Faculté de Médecine de la Timone. Marseille. Avril 2001.
111. **PAROLA P. ROUX V. CAMICAS J.L. et al.** Detection of *Ehrlichiae* in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans. Roy. Soc. Trop. Méd.Hyg.* 2000. **94** : 707-708.
112. **PARZY D. DAVOUST B.** Human pathogenicity of *Ehrlichia canis*. *Lancet.* 1991. **337** : 1169.
113. **PARZY D. DAVOUST B. BONI M. et al.** Apport de la technique d'immunotransfert dans le diagnostic de l'infection à *Ehrlichia canis*. *Méd.Trop.* 1997. **57** (3S) : 93.

114. **PRICE JE. et DOLAN TT.** A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. *Vet. Rec.* 1980. **107** : 275-277.
115. **PRELAUD P.** Epidemiologie de l'Ehrlichiose canine en France, Synthèse des résultats sérologiques. In : Cahier du Vétomécum, maladies transmises par les Tiques, Merial. 1997 : 9-12.
116. **REARDON M.J. et PIERCE K.R.** Acute experimental Canine Ehrlichiosis : sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Vet. Pathol.* 1981. **18** : 48-61.
117. **RIKIHISA Y.** The Tribe *Ehrlichieae* and Ehrlichial Diseases. *Clinical Microbiology Reviews.* 1991 July : 286-308.
118. **RIKIHISA Y. et YAMAMOTO S.** C. reactive protein and alpha 1 acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.* 1994. **32** (4) : 912-917.
119. **RISTIC M. HUXSOLL DL. WEISIGER R.M. et al.** Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infect. Immun.* 1972. **6** : 226-231.
120. **RISTIC M. et MOREAU Y.** Infections humaines et animales dues à des rickettsies du genre *Ehrlichia*. *Sci. Vét. Méd. Comp.* 1987. **89** (4) : 161-171.
121. **ROUX V. et RAOULT D.** Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res. Microbiol.* 1995. **46** : 385-396.
122. **SHAW S.E. et IRWIN P.** Les conséquences d'une infestation par les tiques chez le chien et le chat. *Waltham Focus.* 2001. **11** (2) : 16-23.
123. **SMITH R.D. SELLS M. STEPHENSON E.H. et al.** Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. *Am. J. Vet. Res.* 1976. **37** (2) : 119-126.
124. **STEPHENSON E.H. et OSTERMAN J.V.** Canine peritoneal macrophages : cultivation and infection with *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.* 1977. **38** : 1815-1819.
125. **STEPHENSON E.H. et OSTERMAN J.V.** Somatic cell hybrids of canine peritoneal macrophages and SV-40 transformed human cells : derivation, characterization, and infection with *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.* 1980. **41** : 234-240.
126. **SUKSAWAT J. PITULLE C. ARRAGA-ALVARADO C. et al.** Coinfection with three *Ehrlichia species* in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S Ribosomal DNA secondary structure. *J. Clin. Microbiol.* 2001. **39** (1) : 90-93.
127. **SUMMER J.W. NICHOLSON W.L.** PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia species*. *J. Clin. Microbiol.* 1997 aout : 2087-2092.
128. **TRUMEL C. SCHELCHER F. BRAUN J.P. et al.** L'électrophorèse des protéines sériques : principes d'interprétation chez le chien, le chat, et le cheval. *Revue Méd. Vét.* 1996. **147** (2) : 123-130.
129. **VAN HEERDEN J.A.** retrospective study of 120 natural cases of canine Ehrlichiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 1982. **53** (1) : 17-22.
130. **VLIET A.H. JONGEJAN F. et VAN DER ZEIJST B.A.** Phylogenetic position of *Cowdria ruminantium* (rickettsiales determinated by analyses of amplified 16S ribosomal DNA sequences). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992. **42** : 494-498.

131. **WADDLE J.R. et LITTMAN M.** A retrospective study on 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1988. **24** : 615-620.
132. **WANER T. HARRUS S. BARK H. et al.** Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected Beagle dogs. *Vet. Parasitol.* 1997. **69** (3-4) : 307-317.
133. **WANER T. HARRUS S. WEISS D.J et al.** Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995. **48**: 177-182.
134. **WANER T. ROSNER M. HARRUS S. et al.** Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection. *Vet. Parasitol.* 1996. **63** (3-4): 331-335.
135. **WANER T. STRENGER C. KEYSARY A. et al.** Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infections in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998. **66** : 237-243.
136. **WARNER T.** Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12** : 240-244.
137. **WEISBURG W.G. BARNES S.M. PELLETIER D.A. et al.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Bacteriol.* 1991. **173** : 697-703.
138. **WEISER M.G. THRALL M.A. FULTON R. et al.** Granular Lymphocytosis and Hyperproteinemia in Dogs with Chronic Ehrlichiosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1991. **27** : 84-88.
139. **WELLMAN M.L. KRAKOWKA S.** A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1988. **24** : 223-229.
140. **WEN B. RIKIHISA Y.** Comparison of nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J. Clin. Microbiol.* 1997juil : 1852-1855.
141. **WILLDER AG.** Prophylactic use of tetracycline for Tropical Canine Pancytopenia. *Vet. Rec.* 1977. **101** (1) : 15.
142. **WILSON KH. BLITCHINGTON RB.** Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1990. **28** (9) : 1942-1946.
143. **WOODY B.J. et HOSKINS J.D.** Tick information sheet-The brown dog tick. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1991. **21** : 199-202.
144. **WOODY B.J. et HOSKINS J.D.** Ehrlichial diseases of dogs. *Vet Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 1991. **21** (1) : 75-98.
145. **YU X.J. MCBRIDE J.W. DIAZ C.M. et al.** Molecular cloning and characterization of the 120-Kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-Kilodalton protein for serodiagnosis of Canine Ehrlichiosi

L'EHRlichIOSE MONOCYTAIRE CANINE : ETUDE EXPERIMENTALE D'UNE NOUVELLE SOUCHE D'*Ehrlichia canis*

NOM et PRENOM : JOURET Stéphanie

RESUME :

La première partie fait le point sur l'état actuel des connaissances sur l'ehrlichiose monocyttaire canine. Il s'agit d'une maladie infectieuse grave, causée par une bactérie intramonocytaire, *Ehrlichia canis*. Découvert il y a plus de 70 ans, cet agent pathogène a une situation géographique mondiale de mieux en mieux connue, comme celle de son vecteur, la tique brune *Rhipicephalus sanguineus*. Son expression clinique est très variable, fonction de la race du chien, de son état immunitaire. La maladie peut passer inaperçue au cours de l'une de ses trois phases cliniques successives, mais elle peut aussi être fatale en phase aiguë. La précocité du diagnostic est donc fondamentale, d'autant que le traitement des symptômes, par doxycycline, est efficace.

La seconde partie correspond à un travail personnel de recherche, sur le terrain et en laboratoire, basé sur l'étude expérimentale d'une souche précise d'*Ehrlichia canis*, isolée en Corse en 1989. Un suivi clinique et biologique, notamment sérologique, est réalisé sur quatre chiens inoculés expérimentalement avec cette souche. Nos résultats contribuent à vérifier et à compléter les connaissances sur la variabilité de pathogénicité de la bactérie : augmentation de la virulence lors de passage *in vivo* successifs, influence de la voie de pénétration lors d'inoculation expérimentale, absence d'immunisation protectrice, mais relance de l'activité immunitaire lors de réinfection, importance de l'immunité cellulaire. De plus, une analyse génétique de nos prélèvements permet de comprendre la démarche d'identification des souches bactériennes par biologie moléculaire.

Mots-Clés : EHRlichIOSE MONOCYTAIRE - *Ehrlichia canis* - CHIEN - INOCULATION EXPERIMENTALE - SOUCHE BACTERIENNE – GENOTYPAGE.

Jury :

Président : Pr

Directeur : Pr CHERMETTE

Assesseur : Pr BOULOUIS

Membres invités : Dr DAVOUST et Dr PARZY

Adresse de l'auteur :

JOURET Stéphanie
5, avenue de la Cible
13100 AIX-EN-PROVENCE

**CANINE MONOCYTIC EHRLICHIOSIS :
EXPERIMENTAL STUDY OF A NEW STRAIN OF *Ehrlichia canis***

SURNAME and Name : JOURET Stéphanie

SUMMARY :

In a first part, the author assesses the current level of knowledge regarding canine monocytic ehrlichiosis (CME). CME is a serious infectious disease, caused by an intramonocytic bacterium, *Ehrlichia canis*. Discovered more than 70 years, this pathogenic agent has a world geographic situation better and better known, like that of its vector, the brown tick *Rhipicephalus sanguineus*. The clinical symptoms are very variable, depending on the race of the dog, its state of immunization. The disease can pass undetected during one of its three successive clinical phases, but it can also be fatal in acute its phase. Early diagnosis is thus fundamental, since the treatment of clinical signs, biochemical and hematologic abnormalities, by doxycycline, is effective.

The second part corresponds to a personal research work in the field and in laboratory, based on experimental study of a new strain of *Ehrlichia canis*, isolated in Corsica in 1989. A clinical and biological follow-up, in particular serologic, is carried out on four dogs inoculated experimentally with this strain. Our results confirm and supplement knowledge on the variability of pathogenicity of the bacterium : increase in virulence at the time of passage *in vivo* successive, influence of the way of penetration, absence of protective immunization , but revival of immunizing activity during reinfection, importance of cellular immunity. Moreover, one genetic analysis of our samples permits a process of identification of the bacterial strains by molecular biology.

Key Words : CANINE MONOCYTIC EHRLICHIOSIS – *Ehrlichia canis* - DOG - EXPERIMENTAL INOCULATION - BACTERIAL STRAIN - MOLECULAR BIOLOGY.

Jury :

President : Pr

Director : Pr CHERMETTE

Assessor : Pr BOULOUIS

Guests : Mr DAVOUST and Mr PARZY

Author's Address :

JOURET Stéphanie

5, avenue de la Cible

13100 AIX-EN-PROVENCE