ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2006 - Thèse n°

REPONSE IMMUNITAIRE LORS DE L'INFECTION DU CHIEN PAR *EHRLICHIA CANIS*: ETUDE EXPERIMENTALE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) et soutenue publiquement le 23 octobre 2006 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

NORMAND Thomas Né (e) le 31 mars 1982 à Lomme (Nord)



ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2006 - Thèse n°

REPONSE IMMUNITAIRE LORS DE L'INFECTION DU CHIEN PAR *EHRLICHIA CANIS*: ETUDE EXPERIMENTALE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) et soutenue publiquement le 23 octobre 2006 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

NORMAND Thomas Né le 31 mars 1982 à Lomme (Nord)



Mise à jour : 0504/2006

DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL. Directeur : Stéphane MARTINOT

	PR EX	PR 1	PR 2	MC	Contractuel, Associé,	AERC	Chargés de consultations et
TOTAL MICHAEL SALVEY COLOR TOTAL SALVEY					IPAC et ISPV		d'enseignement
DETARLEMENT SANTE TOBLIQUE VETENINAINE Microbiologie, Immunologie, Pathologie, Générale	Y, RICHARD		A. KOD.JO	V. GUERIN-FAUBLEE			
			A I ACUEDET7	D. GREZEL			
Pathologie Infectieuse			A. LACHERE 12 M. ARTOIS	J. VIALARD			
Parasitologie et Maladies Parasitaires	MC. CHAUVE	G. BOURDOISEAU		MP. CALLAIT CARDINAL L. ZENNER			
Qualité et Sécurité des Aliments		G. CHANTEGRELET	P. DEMONT C. VERNOZY	A. GONTHIER S. COLARDELLE			
Législation et Jurisprudence			A. LACHERETZ				
Bio-Mathématiques				P. Sabatier Ml. Delignette K. Chalvet-monfray			
DEPARTEMENT ANIMAUX DE COMPAGNIE							
Anatomie		E. CHATELAIN	T. ROGER	S. SAWAYA			K. BENREDOUANE
Chirurgie et Anesthésiologie		JP. GENEVOIS	D. FAU E. VIGUIER D. REMY		G. CHANOIIT (MCC) S. JUNOT (MCC) K. PORTIER (MCC) C. DECOSNE-JUNOT (MCC)	C. CAROZZO	N. GAY C. POUZOT
Anatomie pathologique et Dermatologie-Cancérologie		JP. MAGNOL	C. FLEURY	T. MARCHAL	C. BOULOVHER (MCC)		
Hématologie		C. FOURNEL			D. WATRELOT-VIRIEUX (MCC) P. BELLI (MCA) D. PIN (MCA)	1	POUDEROUX
Médecine Interne		JL. CADORE		L. CHABANNE E. PONCE	M. HUGONNARD (MCC)		I. BUBLOT C. ESCRIOU
Imagerie Médicale					J. SONET (MCC)		E. SEGARD
DEPARTEMENT PRODUCTIONS ANIMALES							
Zootechnie, Ethnologie et Economie Rurale		M. FRANCK		L. MOUNIER			
Nutrition et Alimentation				D. GRANCHER L. ALVES DE OLIVEIRA G. EGRON			
Biologie et Pathologie de la Reproduction		F. BADINAND	M. RACHAIL-BERTIN	S. BUFF P. GUERIN	A C. LEFRANC		
Pathologie Animaux de Production		P. BEZILLE	T. ALOGNINOUWA	R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND			G. LESOBRE P. DEBARNOT D. LAURENT
DEPARTEMENT SCIENCES BIOLOGIQUES							
Physiologie/Thérapeutique				J.J. THIEBAULT J.M. BONNET-GARIN			
Biophysique/Biochimie		E. BENOIT F. GARNIER					
Génétique et Biologie Moléculaire			F. GRAIN	V. LAMBERT			
Pharmacie/Toxicologie Législation du Médicament		G. KECK	P. JAUSSAUD P. BERNY	T. BURONFOSSE			
Langues					C. FARMER R. SULLIVAN		
DEPARTEMENT HIPPIQUE							
Pathologie équine		JL. CADORE		A. LEBLANC	M. GLANOL		E. MOREAU
Clinique equine		O. LEPAGE	\ <u>@</u>	A. BENNAMOU-SMITH			
Experise necropsique			C. FLEUN				

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements

A Monsieur le Professeur D. PEYRAMOND Professeur de la Faculté de Médecine de Lyon

Qui m'a fait l'honneur d'accepter ce jury de thèse. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur L. CHABANNE Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui a su me guider dans la réalisation de cette thèse. Qu'il voit dans ce travail mes plus chaleureux remerciements.

A Monsieur le Vétérinaire Chef des Services B. DAVOUST Chef du Bureau Vétérinaire à la Direction Régionale du Service de Santé des Armées de Toulon

Qui m'a proposé ce sujet et a su me conseiller pour finir ce travail. Qu'il voit dans cet aboutissement le témoignage de ma gratitude.

A Monsieur le Professeur G. BOURDOISEAU Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui m'a fait l'honneur d'accepter l'évaluation et la critique de ce travail.

Qu'il trouve ici ma reconnaissance pour cette participation.

Au Pharmacien Général J.-F. CHAULET

pour avoir permis la réalisation des analyses biochimiques et des électrophorèses au sein du laboratoire de biochimie, toxicologie et pharmacologie clinique de l'Hôpital d'Instruction des Armées Desgenettes à Lyon.

Au Médecin en Chef D. PARZY, Professeur agrégé de l'Ecole du Val-de-Grâce, et au Vétérinaire F. CASALI

pour avoir permis la réalisation des analyses sérologiques au sein de l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées à Marseille.

Aux différents membres de la Société Mérial

qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail :

- F. BEUGNET, Professeur agrégé des Ecoles Nationales Vétérinaires, pour ses conseils ;
- P.-M. GUIGAL, pour m'avoir accueilli au Centre de Recherches de Saint-Vulbas;
- **S. BRUN**, pour m'avoir appris à manipuler des animaux de laboratoire ;
- G. COLLOMBET, pour le suivi des manipulations réalisées à Saint-Vulbas ;
- V. JUILLARD, pour sa gentillesse et son implication dans le partage d'informations.

A Catherine, Babette et Slim

du Laboratoire d'Hématologie de l'Ecole Vétérinaire de Lyon pour leur sourire, leur bonne humeur au quotidien, et le temps passé à m'aider.

A Monsieur P. BELLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon pour son implication dans la réalisation des études anatomopathologiques et histologiques.

Aux techniciens animaliers de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon pour s'être occupés des chiens durant mon absence.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé au bon déroulement de cette étude.

... Et plus personnellement ...

A mes parents, pour leur confiance et leur soutien tout au long de ces 22 années de scolarité. Ce travail n'existerait pas sans vous ; qu'il soit le témoignage de notre réussite.

A mes frères, dont la présence dans tous les grands moments m'a toujours poussé à aller plus loin.

A Nell, Michel, Eve et Christophe, pour tous ces bons moments passés depuis que vous êtes rentrés dans ma vie.

A tous les autres membres de ma famille, et en particulier mes grands-parents, mon parrain, ma marraine, qui n'ont jamais douté de mes capacités et qui attendaient cette thèse depuis longtemps.

A ceux de l'école véto qui ont marqué les meilleurs instants de mes années à Marcy : Teddy, Francis, Kubsy, pour ces moments d'étudiants insouciants et pour l'avenir...

Mais aussi au groupe 11, à Furax II, au groupe de musique, à l'équipe de basket et à tous ceux qui ont participé à rendre agréables ces cinq années d'école.

A mes camarades de promotion de l'Ecole du Service de Santé des Armées.

		T 7.	•	•
Λ	to1	Virg	T11	110
Δ	w.	VIIE	41I	иc.
	,		_	- ,

pour tout l'amour que tu m'as apporté, que tu m'offres au quotidien et à cette vie qui nous attend à deux. Ces deux années passées ensemble ne sont que le début d'une grande aventure.

Je t'aime

SOMMAIRE

KI	EMERCIEM	ENTS	I
So	MMAIRE		8
TA	ABLE DES II	LLUSTRATIONS	13
Li	STE DES AI	BREVIATIONS	15
Pr	REAMBULE		17
1.	INTROD	OUCTION	19
	1.1 RAPP	ELS SUR L'EHRLICHIOSE MONOCYTAIRE CANINE	19
	1.1.1	Etiologie	19
	1.1.2	Mode de transmission	20
	1.1.3	Epidémiologie	20
	1.1.4	Tableau clinique	21
	1.1.5	Traitement	21
	1.1.6	Prophylaxie	22
	1.2 EPIDI	EMIOLOGIE DANS LES CHENILS MILITAIRES	22
	1.2.1	Prévalence	22
	1.2.2	Chimioprophylaxie et lutte anti-vectorielle	22
	1.2.3	Epidémiosurveillance	23
	1.3 Овје	CTIFS DE L'ETUDE	23
	1.3.1	Etude du pouvoir pathogène de la souche	23
	1.3.2	Suivi de la réponse immune induite par la souche d'Ehrlichia canis	
	Borgo 89		23
	1.3.3	Evaluation de différents protocoles de traitement	24

2.	MATE	RIELS ET METHODES	25
	2.1 MA	TERIELS	25
	2.1.1	Les chiens	25
	2.1.2	La souche d'Ehrlichia canis Borgo 89	26
	2.1.3	Les traitements	27
	2.2 ME	THODES	27
	2.2.1	Inoculations	27
	2.2.2	Suivi clinique et prélèvements	28
		2.2.2.1 Suivi clinique	28
		2.2.2.2 Prélèvements sanguins	28
	2.2.3	Analyses biologiques	30
		2.2.3.1 Hémathologie	30
		2.2.3.2 Biochimie sanguine	30
		2.2.3.3 Immunologie	31
		2.2.3.3.1 Anticorps anti-Ehrlichia canis	31
		2.2.3.3.1.1 Immunofluorescence indirecte	31
		2.2.3.3.1.2 Test rapide de dosage immuno-enzymatique	33
		2.2.3.3.2 Anticorps anti-plaquettes	35
		2.2.3.3.3 Test de Coombs direct	36
		2.2.3.3.4 Populations et sous-populations lymphocytaires	36
		2.2.3.3.5 IFNγ	36
		2.2.3.4 Bactériologie	38
		2.2.3.4.1 Cultures cellulaires	38
		2.2.3.4.2 PCR	38
	2.2.4	Traitements	39

3.	RESUL	TATS	40
	3.1 Suiv	I CLINIQUE	40
	3.1.1	Symptômes observés	40
	3.1.2	Evolution de la température rectale	40
	3.2 Suiv	I HEMATOLOGIQUE	42
	3.2.1	Hémogramme rouge	42
	3.2.2	Hémogramme blanc	
		3.2.2.1 Leucocytes	43
		3.2.2.2 Lymphocytes	44
		3.2.2.3 Granulocytes neutrophiles et éosinophiles	46
	3.2.3	Numération plaquettaire	47
	3.3 Suiv	I DE LA BIOCHIMIE SANGUINE	48
	3.3.1	Enzymes hépatiques	
	3.3.2	Biochimie rénale	51
		3.3.2.1 Créatininémie	51
		3.3.2.2 Urémie	51
	3.3.3	Electrophorèse des protéines sériques	52
	3.4 Suiv	I SEROLOGIQUE	54
	3.4.1	Immunofluorescence indirecte	54
	3.4.2	Tests rapides de dosage immuno-enzymatique	55
	3.4.3	Mise en évidence d'anticorps anti-plaquettes	56
	3.4.4	Résultats du Spot test	56
	3.5 Exam	MENS NECROPSIQUES ET ANATOMO-PATHOLOGIQUES	57
	3.5.1	Reins	57
	3.5.2	Poumons	57
	3.5.3	Foie et rate	58
	3.5.4	Nœuds lymphatiques	58
	3.6 BAC	TERIOLOGIE	58

4.	DISCU	SSION	59
	4.1 Pou	VOIR PATHOGENE DE LA SOUCHE D' <i>EHRLICHIA CANIS</i> BORGO 89	59
	4.1.1	Efficacité des inoculations expérimentales	59
	4.1.2	Tableau clinique classique d'ehrlichiose monocytaire canine aiguë	59
		4.1.2.1 Signes cliniques	59
		4.1.2.2 Anomalies hématologiques	60
		4.1.2.2.1 Thrombopénie	60
		4.1.2.2.1.1 Caractéristiques	60
		4.1.2.2.1.2 Pathogénie	61
		4.1.2.2.1.2.1 Thrombopénie et augmentation du volume plaquetta	aire
		moyen	61
		4.1.2.2.1.2.2 Origine de la thrombopénie	62
		4.1.2.2.1.2.2.1 Séquestration des plaquettes	62
		4.1.2.2.1.2.2.2 Destruction plaquettaire	63
		4.1.2.2.2 Leucopénie	64
		4.1.2.2.3 Anémie	65
		4.1.2.3 Biochimie sanguine	65
		4.1.2.3.1 Biochimie hépato-rénale	65
		4.1.2.3.2 Hypoalbuminémie	65
		4.1.2.3.3 Hyperprotéinémie	66
		4.1.2.3.4 Production de protéine C réactive	67
		4.1.2.4 Lésions anatomo-pathologiques	68
	4.2 EFF	ICACITE DU TRAITEMENT A LA DOXYCYCLINE	69
	4.2.1	Evaluation de l'efficacité	69
	4.2.2	Persistance d'anomalies après traitement	69
	4.2.3	Persistance ou élimination des bactéries	70
	4.3 DIA	GNOSTIC SEROLOGIQUE	71
	4.3.1	Immunofluorescence indirecte	71
	4.3.2	Test rapide de dosage immuno-enzymatique	71
	4.3.3	Western blot	72
		4.3.3.1 Intérêt du test	72
		4.3.3.2 Mise en évidence de la variabilité antigénique des souches d'E. a	anis 72

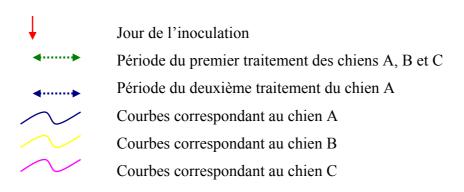
4.4 REPO	ONSE IMMUNITAIRE	73
4.4.1	Réponse humorale	73
4.4.2	Réponse cellulaire	74
	4.4.2.1 Rôle des lymphocytes T dans la réponse immunitaire à l'infecti	on par
E. can	is	74
	4.4.2.1.1 Interactions cellulaires et moléculaires lors de la réponse	
imm	unitaire à médiation cellulaire	75
	4.4.2.1.2 Cinétiques d'apparition des médiateurs solubles lors d'EMe	C aiguë
		77
	4.4.2.2 Rôle de l'IFN γ , du TNF α et de l'IL-10	77
	4.4.2.2.1 Selon les voies d'inoculation	77
	4.4.2.2.2 Sévérité des symptômes et quantité de TNFα produit par le	es CD8+
		78
	4.4.2.3 Rôle du traitement immunomodulateur	79
4.5 ECH.	APPEMENT D' <i>EHRLICHIA CANIS</i> A LA REPONSE IMMUNE DE L'HOTE	79
4.5.1	Facilitation du développement intracellulaire	79
4.5.2	Dépendance vis-à-vis du fer	80
4.5.3	Diminution de l'activation et de la différenciation leucocytaire	80
4.5.4	Echappement au rôle protecteur de l'IFN γ : la réduction du pool ferr	eux des
macropho	ages 81	
4.5.5	Inhibition de l'apoptose cellulaire	81
4.5.6	Modification de l'expression des récepteurs du CMH	82
4.5.7	Comparaison avec le mode d'échappement de Leishmania spp. : le re	
TGF β et	de l'IL-10	8 <i>3</i>
		_
NCLUSIO	N	84
BI IOCDAI	DHIE	86

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Morula d'Ehrlichia canis dans un monocyte canin	19
Figure 2 : Calendrier des prélèvements effectués sur les trois chiens A, B et C au cours de	Э
notre étude	29
Figure 3 : Protocole de confection des lames d'antigène pour l'IFI	31
Figure 4 : Protocole de dépistage qualitatif par IFI	32
Figure 5 : Protocole de titrage des sérums positifs par IFI	33
Figure 6 : Réalisation du test rapide	34
Figure 7: Utilisation et interprétation du test rapide	34
Figure 8 : Détection des anticorps anti-plaquettes par cytométrie de flux	35
Figure 9 : Protocole ELISPOT	37
Figure 10 : Principe du test ELISPOT	38
Figure 11 : Evolution de la température rectale du chien A	41
Figure 12 : Evolution de la température rectale des chiens B et C	42
Figure 13 : Evolution de la numération érythrocytaire des chiens A, B et C	43
Figure 14 : Evolution de la numération leucocytaire des chiens A, B et C	44
Figure 15: Evolution des lymphocytes chez les chiens A, B et C	45
Figure 16: Evolution du rapport CD4 / CD8 chez les chiens A, B et C	46
Figure 17: Evolution de la neutrophilie chez les chiens A, B, et C	47
Figure 18 : Evolution de la numération plaquettaire chez les chiens A, B et C	48
Figure 19 : Evolution des phosphatases alcalines sériques des chiens A, B et C	49
Figure 20 : Evolution des alanine amino-transférase sérique des chiens A, B et C	50
Figure 21 : Evolution des aspartate amino-transférase sériques des chiens A, B et C	50
Figure 22 : Evolution de la créatininémie des chiens A, B et C	51
Figure 23 : Evolution de l'urémie des chiens A, B et C	52
Figure 24 : Electrophorèse d'un chien sain (à gauche) et d'un chien ehrlichien (à droite) .	52
Figure 25 : Evolution de l'albuminémie des chiens A, B et C	53
Figure 26 : Evolution des concentrations en bêta et gamma-globulines des chiens A, B et	C54
Figure 27 : Evolution du titre en anticorps vis-à-vis d'Ehrlichia canis des chiens A. B et C	C 55

Figure 28 : Test négatif (à gauche) et test positif à la recherche d'anticorps anti-E. canis (à
droite)	55
Figure 29: Puits sur une plaque ELISPOT (x45)	56
Figure 30 : Résultats du Spot test réalisé sur du sang des chiens B et C, au 11ème jour ap	rès
l'inoculation	57
Figure 31 : Accumulation de protéines au niveau des glomérules rénaux – Grossissement	t
x100, coloration MGG	57
Figure 32 : Hypertrophie des tonsilles palatines du chien B	58
Figure 33 : Evolution du titre en anticorps et du taux de gamma-globulines sériques	67
Figure 34 : Western blots de chiens séropositifs (IFI) vis-à-vis d'Ehrlichia canis et séjour	nant
en Corse	73
Figure 35 : Schéma des interactions cellulaires et moléculaires au cours de la réponse	
immunitaire lors d'infection par Ehrlichia canis	76

LEGENDE DES FIGURES



LISTE DES ABREVIATIONS

Ac: Anticorps

ACVIM: American College of Veterinary Internal Medicine

AlAT: Alanine amino-transférase **AsAT**: Aspartate amino-transférase

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: Cellule présentatrice d'antigène

DMSO: DiMéthyl-SulfOxyde

EDTA: Ethylène-diamine-tétracétate
EMC: Ehrlichiose monocytaire canine

ENVL: Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
 γ-GT : Gamma-glutamyl-transférase
 HIA : Hôpital d'Instruction des Armées
 IFI : ImmunoFluorescence indirecte

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

IP: Interferon-inductible protein

J: Jour de l'inoculation

 J_X : Jour de l'inoculation du chien X

LPS: Lipopolysaccharide
MGG: May Grümwald Giemsa

MIP: Macrophage inflammatory protein

NK: Natural killer

PAI: Phosphatase alcaline

PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells

PBS: Tampon phosphate (Phosphate-buffered saline)

PCR: Polymerase chain reaction
PNN: Granulocyte neutrophile
SOD: Superoxyde dismutase

TCR: T-cell receptor

TfRs: Transferrin receptors
TGF: Tumor growth factor
TNF: Tumor necrosis factor

UV: Ultra-violet

VPM: Volume plaquettaire moyen

	1		
_	- 1	h	_

PREAMBULE

L'importance médicale et économique des maladies vectorielles est à souligner tant en médecine vétérinaire qu'en santé humaine. L'épidémiologie de ces maladies n'est pas figée, mais sujette à variations, évolutions, au grès du temps et de nombreux facteurs, si bien que certaines sont aujourd'hui qualifiées d'émergentes, ou plutôt réémergentes.

Traditionnellement à l'origine de graves maladies en régions tropicales et semitropicales, ces maladies sont de plus en plus décrites en régions tempérées et dans les environnements urbains. Par ailleurs, les animaux infectés qui développent des maladies subcliniques peuvent se révéler des réservoirs d'agents pathogènes d'autant plus préoccupant que certains agents sont zoonotiques. Parmi les agents affectant le chien, c'est le cas d'*Ehrlichia* chaffeensis, Ehrlichia ewingii, Rickettsia conorii, Anaplasma phagocytophilum, ou encore Ehrlichia canis, même si l'ehrlichiose monocytaire humaine à Ehrlichia canis n'a été diagnostiquée qu'exceptionnellement [79].

La connaissance de la pathogénie d'*Ehrlichia canis*, agent étiologique de l'ehrlichiose monocytaire canine, de la réponse immunitaire à cette infection et des mécanismes d'échappement de la bactérie au système de défense de l'hôte pourront permettre de mieux appréhender cette maladie et de mettre en place des mesures prophylactiques adéquates.

Notre étude expérimentale, menée en collaboration entre le Service de Santé des Armées et la société Mérial, se propose de poursuivre des travaux menés depuis 1989 sur la souche Borgo 89 d'*Ehrlichia canis*, en analysant, plus particulièrement la réponse immune induite lors de la phase aiguë de l'infection.

- 1	8	_
-----	---	---

1. Introduction

1.1 Rappels sur l'ehrlichiose monocytaire canine

L'ehrlichiose monocytaire canine (EMC) est une maladie infectieuse causée par une bactérie Gram -, intracellulaire obligatoire, ayant un tropisme particulier pour les monocytes et les macrophages : *Ehrlichia canis* (cf. Figure 1) [54].



Figure 1 : *Morula* d'*Ehrlichia canis* dans un monocyte canin (x100 - coloration MGG) [cliché : B. DAVOUST]

1.1.1 Etiologie

L'agent infectieux *E. canis* a été découvert sur des chiens à Alger, en 1935, par DONATIEN et LESTOQUARD [32]. Ces deux chercheurs le mirent en évidence, aussi, en 1937 à Marseille et Montpellier.

L'espèce *E. canis* appartient, selon la classification du *NCBI Taxonomy Browser*, au genre *Ehrlichia*, de la famille des *Anaplasmataceae* dans l'ordre des *Rickettsiales*.

Le cycle de développement d'*E. canis* comporte trois stades de développement : le corps élémentaire, le corps initial et la *morula* [75]. Les *morulae* sont observables au pic de la maladie, en microscopie optique, après leucoconcentration [23, 73]. En 5 à 7 jours, les *morulae* sont séparées du cytoplasme par des vacuoles, et les corps élémentaires sont libérés par l'éclatement du monocyte [23].

E. canis ne se développe pas sur des milieux de culture usuels. La culture de l'agent pathogène s'effectue sur des monocytes du sang périphérique de chien et sur des lignées cellulaires particulières [23, 75].

1.1.2 Mode de transmission

La tique vectrice est *Rhipicephalus sanguineus*. Elle est très répandue dans le monde. Son cycle est trixène, mais les trois hôtes sont généralement de la même espèce : le chien.

C'est une tique endo-exophile, fréquemment rencontrée dans les chenils, aux abords des niches et dans les lieux à forte concentration canine.

E. canis se développe dans les cellules des glandes salivaires et de l'intestin moyen de la tique. La transmission trans-ovarienne n'a pas été mise en évidence.

Le passage de l'infection d'un chien à un autre est directement tributaire de la présence du vecteur, qui peut également transmettre d'autres agents infectieux, parfois concomitamment à *E. canis*, comme *Babesia* spp., *Hepatozoon canis*, ou *Mycoplasma* spp. [21].

1.1.3 Epidémiologie

La distribution géographique de la maladie est calquée sur celle du vecteur (entre 50° de latitude Nord et 35° de latitude Sud).

L'EMC sévit dans les pays du pourtour méditerranéen, en Afrique, en Asie du Sud-Est et sur le continent américain. En France, les cas autochtones d'ehrlichiose sont surtout constatés en région méditerranéenne [23].

Dans les régions tempérées, la maladie s'observe du printemps à l'automne, période où l'activité du vecteur est maximale. Cependant, on peut rencontrer des cas toute l'année, l'affection passant souvent à la chronicité [23].

1.1.4 Tableau clinique

La période d'incubation de la maladie est de 8 à 20 jours. La phase aiguë dure 2 à 4 semaines. L'agent pathogène se multiplie dans les cellules mononuclées du sang et dans les organes contenant des cellules phagocytaires, en particulier la rate, le foie, et les nœuds lymphatiques.

La phase aiguë de la maladie est caractérisée surtout par une hyperthermie brutale (39,5°C à 41,5°C), une anorexie, une perte de poids et de l'asthénie. En parallèle, une thrombopénie est très fréquemment observée. On note aussi souvent une leucopénie parfois suivie d'une hyperleucocytose. L'anémie n'est pas systématique.

Les examens biochimiques montrent une augmentation des β -globulines, des transaminases (AlAT) et des phosphatases alcalines (PAl). Ils indiquent que l'infection aiguë est à l'origine d'une atteinte hépatique inflammatoire.

L'électrophorèse des protéines met en évidence une hypoalbuminémie et surtout une augmentation progressive des γ -globulines [23].

Après la phase aiguë, parfois mortelle, les symptômes s'atténuent même en l'absence de traitement, et l'animal passe en phase subclinique. Celle-ci peut évoluer en phase chronique asymptomatique si les défenses immunitaires du chien sont suffisantes, ou en une nouvelle phase aiguë dans le cas contraire [23].

1.1.5 Traitement

L'efficacité thérapeutique de la doxycycline administrée *per os* à la dose de 10 mg/kg/jour pendant 28 jours est démontrée [23, 71]. La doxycycline est une tétracycline liposoluble qui atteint rapidement un pic plasmatique et tissulaire élevé, ainsi qu'une concentration cellulaire rapide [87].

D'autres molécules ont été utilisées comme l'oxytétracycline, les quinolones ou l'imidocarb.

Dans les cas graves d'ehrlichiose, le pronostic est réservé malgré le traitement [23].

1.1.6 Prophylaxie

En l'absence de vaccin, la principale mesure de prophylaxie, disponible pour le propriétaire de chien, est l'utilisation régulière d'acaricides à effet permanent, afin de lutter contre les tiques vectrices [27].

1.2 Epidémiologie dans les chenils militaires

L'ehrlichiose monocytaire canine revêt au sein des effectifs canins des armées une importance opérationnelle (pertes et indisponibilités) [26].

1.2.1 Prévalence

Déjà en 1953, des vétérinaires militaires français étudièrent un syndrome hémorragique thrombotique thrombocytopénique qui décimait les effectifs de chiens militaires stationnés en Tunisie [16].

Dans les années 1980, une épizootie d'EMC est survenue dans un chenil militaire de Corse, suite au retour d'un chien de Dakar (Sénégal), région d'enzootie [26]. En trois ans, 12 cas mortels avaient été observés dans le chenil militaire français de Dakar [26].

En France, des cas autochtones d'EMC ont été mis en évidence dans les chenils militaires situés en Corse, dans les Bouches-du-Rhône, dans le Var ainsi qu'en Guyane française et sur l'Île de la Réunion [DAVOUST, communication personnelle].

1.2.2 Chimioprophylaxie et lutte anti-vectorielle

L'utilisation d'antiparasitaire externe pour la lutte antivectorielle et la mise en place d'une chimioprophylaxie à base de doxycycline ont permis de réduire considérablement les cas cliniques d'EMC dans les effectifs canins militaires, stationnés en zone d'enzootie [25, 27]. La dose administrée est de 100 mg de doxycycline, *per os*, par jour.

1.2.3 Epidémiosurveillance

La surveillance sérologique des chiens permet d'adapter les mesures prophylactiques aux faits épidémiologiques [26]. Cette surveillance est réalisée périodiquement à l'aide d'un suivi sérologique (immunofluorescence indirecte).

Ainsi, en 1983, 38% des chiens du chenil de Solenzara (Corse) et 35% des chiens de celui d'Istres (Bouches-du-Rhône) étaient séropositifs [26]. Vingt ans plus tard, la séroprévalence dans les mêmes chenils avait nettement diminué, passant à 5% de séropositifs en Corse et à 4% dans les Bouches-du-Rhône [DAVOUST, communication personnelle].

L'EMC représente donc un risque infectieux pour les chiens militaires vivant dans le Sud-Est méditerranéen ainsi que pour les chiens séjournant en missions de courte durée dans des régions d'enzootie, particulièrement en Afrique.

Le protocole de chimioprévention (doxycycline) appliqué dans les zones à risques est associé aux traitements préventifs acaricides. Depuis peu, les services vétérinaires de l'armée américaine ont également adopté cette chimioprévention à base de doxycycline [12].

1.3 Objectifs de l'étude

1.3.1 Etude du pouvoir pathogène de la souche

Plusieurs passages sur chiens ont déjà été réalisés avec la souche d'*E. canis* Borgo 89 [55]. Dans la très grande majorité des cas, les chiens infectés ont déclaré une ehrlichiose aiguë. Dans cette étude, trois passages consécutifs sur chiens doivent permettre de confirmer la pathogénicité de la souche d'*E. canis* Borgo 89.

1.3.2 Suivi de la réponse immune induite par la souche d'*Ehrlichia canis* Borgo 89

L'étude expérimentale de la souche d'*Ehrlichia canis* Borgo 89 a pour objectif de poursuivre les premières études déjà menées sur cette souche depuis 1989 [30, 55]. Le suivi des chiens infectés expérimentalement doit permettre d'étudier la réponse immune grâce à la mise en place d'un nouveau test (Spot test).

1.3.3 Evaluation de différents protocoles de traitement

Un traitement à la doxycycline, complémenté par une molécule à visée immunomodulatrice, est comparé au traitement à la doxycycline seule.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Matériels

2.1.1 Les chiens

L'étude a été menée sur cinq chiens provenant tous du Centre d'élevage du domaine des souches (Mézille, France). Trois ont été suivis à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL) : chiens A, B et C, et deux (chiens D et E) au Centre de recherche de Mérial à Saint-Vulbas dans l'Ain.

Trois femelles Beagle (chiens A, B, et C), de dix mois, ont été suivies à l'ENVL. A leur arrivée au chenil, les chiens pesaient entre 12 et 14 kg. Ils ont été placés dans trois boxes individuels, directement ouverts sur le milieu extérieur. Deux jours après leur arrivée, ils ont été vaccinés à l'aide des vaccins Tetradog® (Mérial) et Leptodog® (Mérial). Neuf jours après leur entrée, ils étaient vermifugés à l'aide de Drontal® P (Bayer Pharma). Les trois chiens sont restés en phase d'adaptation pendant 15 jours. Tous les jours, ils étaient en contact avec le manipulateur et les animaliers, afin de les habituer au mieux au contact avec ceux-ci. Ils ont été nourris, tout au long du protocole, avec des aliments secs industriels.

Les deux autres chiens (chiens D et E) étaient des croisés Golden Retriever – Labrador, mâles, de 8 ans. A leur arrivée, ils pesaient respectivement 39 et 44 kg. Ils cohabitaient dans un chenil fermé sur le milieu extérieur, contrairement aux trois autres chiens. Ils étaient vaccinés contre la maladie de Carré, l'hépatite de Rubarth, la leptospirose et la parvovirose (Tetradog®, Mérial, et Leptodog®, Mérial). Ils ont reçu tous les ans, jusqu'à l'âge de 7 ans, une injection unique d'ivermectine. Avant leur arrivée, ils ont été vermifugés à l'aide de fébantel.

Les expérimentations pratiquées à l'ENVL et au Centre de recherche de Mérial ont été mises en œuvre selon un protocole validé par des comités d'éthique *ad hoc*. Elles se sont déroulées conformément à la réglementation en vigueur et aux bonnes pratiques de laboratoire.

2.1.2 La souche d'Ehrlichia canis Borgo 89

Cette souche d'*Ehrlichia 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.

Cet effectif canin a connu un épisode d'épizootie ehrlichienne durant l'été 1988. Celui-ci a été enrayé par la mise en place précoce du traitement, mais l'épisode s'est renouvelé l'année suivante. En effet, en mai 1989, des chiens de ce chenil ont présenté un tableau clinique d'ehrlichiose aiguë [24].

Ainsi, le chien princeps ROBY a présenté en juin 1989 un épisode d'abattement, d'anorexie et d'hyperthermie à 40.5°C, associé à une uvéite bilatérale. Il a reçu un traitement à base de doxycycline (Ronaxan®, Mérial) à la posologie de 10 mg/kg pendant 10 jours. Son état général s'est alors rapidement amélioré à l'exception de l'atteinte oculaire.

En septembre, un bilan sanguin a été réalisé montrant une pancytopénie avec leucopénie (1,5.10⁹ leucocytes/L), une anémie non régénérative (hémoglobine : 10,2 g/dL, hématocrite : 31 %), une thrombopénie (6.10⁹ thrombocytes/L), une hyperprotéinémie à 101 g/L de protéines sériques, avec un rapport albumine/globulines de 0,41, liée à une hyperglobulinémie (pic gamma : 32%). L'examen de l'urine mettait en évidence une protéinurie (++) et des traces d'hémoglobine. La sérologie ehrlichiose était positive au 1/1600 en immunofluorescence indirecte (IFI) [30].

Sur ce chien présentant les signes biologiques de l'ehrlichiose, l'isolement de l'agent infectieux a été réalisé à partir de 20 mL de sang recueillis par ponction de la veine céphalique de l'avant-bras. Des leucoconcentrés porteurs de l'agent pathogène ont été conservés depuis dans l'azote liquide.

La constitution des paillettes a nécessité la centrifugation du sang à 2000 tours/min pendant 10 minutes. Celui-ci a été ensuite récupéré sur Ficoll, puis les leucoconcentrés ont subi deux lavages sur milieu 199. Du sérum de veau fœtal (20%) a été ajouté. L'échantillon

contenait 10⁷ à 10⁸ globules blancs. La congélation a été ensuite réalisée avec 7,5% de DMSO en concentration finale.

Des études d'inoculations expérimentales ont été réalisées depuis : en 1989, 1990, 1993, 1995, 2001, et notre étude en 2003.

2.1.3 Les traitements

Les traitements qui ont été utilisés étaient les suivants :

- la doxycycline (Ronaxan®, Mérial);
- un immunomodulateur (Glisodin® 250 IU capsule, Isocell Nutra SAS, Paris, France) à base de superoxyde dismutase (SOD). Il s'agit d'une enzyme, produite naturellement par l'organisme, capable de protéger les cellules et les tissus contre l'anion superoxyde. La SOD convertit cet anion en peroxyde d'hydrogène, rapidement catabolisé en eau. Une supplémentation en SOD devrait donc, théoriquement, aider l'organisme à lutter contre le stress oxydatif et les maladies qui lui sont associées. Des études animales ont permis de démontrer les propriétés antioxydantes de la SOD, ses propriétés anti-inflammatoires et ses propriétés immunomodulatrices [67].

2.2 Méthodes

2.2.1 Inoculations

Quinze jours après son arrivée au chenil, le chien A reçoit, par voie intra-veineuse (IV), deux ampoules de cellules mononucléées infectées de sang périphérique (leucoconcentrés). La première ampoule contient un leucoconcentré du chien princeps ROBY. La seconde ampoule contient un leucoconcentré du premier chien ayant été infecté expérimentalement avec la souche isolée à partir du chien ROBY. Le chien A est inoculé à l'aide des deux paillettes diluées dans du sérum physiologique.

A l'acmé de la maladie du chien A (pic de température et thrombopénie), deux fois 5 mL de sang sont prélevés et injectés par voie IV aux chiens B et C.

Le chien D est inoculé avec du sang prélevé sur le chien A à l'acmé de la maladie. Le chien E est inoculé avec du sang du chien D, prélevé dès que sa numération plaquettaire est devenue inférieure à 50 000 plaquettes/mm³.

2.2.2 Suivi clinique et prélèvements

2.2.2.1 Suivi clinique

Afin de décider de la date à laquelle il faut prélever le chien A pour inoculer les chiens B et C, un suivi clinique quotidien est réalisé sur le chien A, ainsi qu'une courbe de température. Le suivi est d'abord réalisé une fois par jour, puis toutes les 2 heures (de 8h à 22h) à l'approche du pic d'hyperthermie théorique (J14). A J_A12, on décide de prélever le chien A afin d'inoculer les chiens B et C et de conserver du sang infectieux pour de futurs essais (mise en culture).

De même, un suivi quotidien et une courbe de température sont réalisés pour les chiens B et C afin de déterminer le pic d'hyperthermie et ainsi recueillir du sang infectieux.

Les chiens D et E ne font pas l'objet d'un suivi aussi continu. La température rectale n'est prise que si une asthénie ou une anorexie sont observées.

2.2.2.2 Prélèvements sanguins

Tous les prélèvements sanguins sur les chiens A, B et C, sont réalisés à la veine jugulaire après désinfection locale à l'alcool-éther. Chaque tube utilisé a une contenance de 5 mL.

Des tubes secs sont utilisés pour extraire les sérums destinés à la sérologie par immunofluorescence indirecte et aux électrophorèses des protéines sériques. Des tubes héparinés permettent de recueillir les prélèvements sanguins en vue des analyses biochimiques. Des tubes EDTA sont remplis pour les numérations formules sanguines, réalisées dans la journée. Enfin des prélèvements sur tubes citratés servent à la réalisation de tests de Coombs direct et à la numération des sous-populations lymphocytaires.

Les chiens D et E ont été prélevés à $J_{D,E}0$, $J_{D,E}10$, $J_{D,E}13$ et $J_{D,E}17$, de manière à mettre en évidence la thrombopénie. Des prélèvements quotidiens à partir de $J_{D,E}18$ sont prévus si aucune modification hématologique n'est observée jusque là.

Le calendrier des prélèvements des chiens A, B et C est représenté en Figure 2.

Prélèvements effectués sur le chien A

					_																				
Jours après l'inoculation	-3	-2	-1	0																					
Tube sec																									
Tube EDTA																									
Tube hépariné																									
Tube citrate ACD																									
Tube citrate ACD					L																				
		_								4.0			4.0												
Jours après l'inoculation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Tube sec																									
Tube EDTA																									
Tube hépariné																									
Tube citrate ACD																									
Jours après l'inoculation	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec						<u> </u>	0_		<u> </u>	00		٥.	-	00									<u></u>	.0	-
Tube EDTA																							H		
	lacksquare																						Н		
Tube hépariné																							Н		
Tube citrate ACD																									
Jours après l'inoculation	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
Tube sec																									
Tube EDTA																									
Tube hépariné																									
Tube citrate ACD																									П
		•												•						•					
Jours après l'inoculation	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Tube sec	Ť	•	70		-	·	- 02	- 00	<u> </u>	-	00	0.	-	00	-	0.	02	00	<u>.</u>	-	- 00	Ü,	- 00	00	100
	\vdash																						Н		
Tube EDTA	1						_																Н		
Tube hépariné																									
Tube citrate ACD																									
		Pre	élè	vei	ne	nts	ef	fec	tu	és	su	r le	s c	chi	ens	s B	et	С							
Jours après l'inoculation	-15			ve i				fec	tuo	és	su -5	r le	-3	chi	ens	8 B	et	С							
Jours après l'inoculation Tube sec																	et	С							
Tube sec Tube EDTA																	et	С							
Tube sec																	et	С							
Tube sec Tube EDTA																	et	С							
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné																	et	С							
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné										-6		-4	-3	-2		0			19	20	21	22	23	24	25
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0			19	20	21	22	23	24	25
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0			19	20	21	22	23	24	25
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0			19	20	21	22	23	24	25
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0			19	20	21	22	23	24	25
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0			19	20	21	22	23	24	25
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1	2	3	4	5	-10	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18							
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	-15	2	3	-12	5	-10	7	8	-7	10	11	-4	13	14	-1	16						22		24	25
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec	1	2	3	4	5	-10	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18							
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1	2	3	4	5	-10	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18							
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1	2	3	4	5	-10	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18							
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1	2	3	4	5	-10	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18							
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1 26	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 36	12	13	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 36	12	13	14	15	16	17	18	44	45			48		
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1 26	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 36	12	13	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1 26	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 36	12	13	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube sec Tube EDTA Tube hépariné	1 26	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 36	12	13	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1 26	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 36	12	13	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube sec Tube EDTA Tube hépariné	1 26	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 36	12	13	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1 26	2	3	4	5	-10 6 31	7	8	9	10	-5 11 36 61	12	13	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1 26	27	3 28 53	29	55	-10 6 31 56	7 32 57	8 8 58	9 34 59	-6 10 35 60	-5 11 36 61	37	-3 13 38 63	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1 26	27	3 28 53	29	55	-10 6 31 56	7 32 57	8 8 58	9 34 59	-6 10 35 60	-5 11 36 61	37	-3 13 38 63	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1 26	27	3 28 53	29	55	-10 6 31 56	7 32 57	8 8 58	9 34 59	-6 10 35 60	-5 11 36 61	37	-3 13 38 63	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50
Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD Jours après l'inoculation Tube sec Tube EDTA Tube hépariné Tube citrate ACD	1 26	27	3 28 53	29	55	-10 6 31 56	7 32 57	8 8 58	9 34 59	-6 10 35 60	-5 11 36 61	37	-3 13 38 63	14	15	16	17	18	44	45	46	47	48	49	50

Figure 2 : Calendrier des prélèvements effectués sur les trois chiens A, B et C au cours de notre étude

2.2.3 Analyses biologiques

2.2.3.1 Hémathologie

Pour chaque prélèvement sur tube EDTA, un hémogramme rouge, un hémogramme blanc et une numération plaquettaire sont réalisés. Chaque tube EDTA est centrifugé, les plasmas et les culots étant identifiés, datés puis congelés à -20°C.

La numération est réalisée au Laboratoire d'hématologie de l'ENVL à l'aide d'un automate (Vet ABC) et contrôlé par lecture optique d'un frottis sanguin coloré au May-Grümwald-Giemsa.

Les analyses hématologiques des chiens D et E sont réalisées en interne dans les laboratoires Mérial.

2.2.3.2 Biochimie sanguine

Tous les plasmas destinés aux analyses biochimiques sont identifiés, datés et conservés à -20°C avant d'être envoyés à l'Hôpital d'Instruction des Armées (HIA) Desgenettes à Lyon où ils sont analysés au Laboratoire de biochimie, toxicologie et pharmacologie cliniques.

Pour chaque échantillon, on mesure : les phosphatases alcalines (PAI), l'alanine-aminotransférase (AIAT), l'aspartate-aminotransférase (AsAT), les gamma-glutamyl-transférase (gamma GT), l'urée et la créatinine plasmatiques. Les valeurs usuelles sont ensuite réadaptées à l'espèce canine afin d'interpréter les résultats. Les analyses sont réalisées grâce à un analyseur COBAS INTEGRA 800 (Roche Diagnostics®).

De même des électrophorèses des protéines sont réalisées au Laboratoire de biochimie, toxicologie et pharmacologie cliniques de l'HIA Desgenettes. Les échantillons sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (pH 9,2) grâce à un analyseur semi-automatisé (HYDRASYS®, SEBIA). Ces analyses permettent la mesure de la protéinémie totale, de l'albuminémie, et mettent en évidence l'importance des différentes fractions alpha 1, alpha 2, bêta et gamma. L'étude de la protéine C réactive n'est pas envisagée.

2.2.3.3 Immunologie

2.2.3.3.1 Anticorps anti-Ehrlichia canis

2.2.3.3.1.1 Immunofluorescence indirecte

Des aliquots de sérums sont également conservés à -20°C pour la réalisation de la sérologie spécifique. Un certain nombre d'entre eux sont choisis, faute de pouvoir demander la réalisation d'un trop grand nombre d'analyses. Le choix est fait de manière à avoir une ou plusieurs mesures à chaque étape de l'évolution de l'infection. Les échantillons sont ensuite envoyés à l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (IMTSSA) à Marseille. Sur chaque échantillon, une sérologie *Ehrlichia canis* est réalisée par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) (cf. Figures 3, 4 et 5).

- Peser 250 mg d'albumine (BSA : albumine sérique d'originie 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 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 à 1500 tpm pendant 10 minutes ;
- Oter le surnageant ;
- Dissocier très consciencieusement le culot à la pointe pour éviter les agrégats cellulaires ;
- Ajuster la suspension cellulaire à 10⁶ cellules/mL, par dilution au ½ en PBS-BSA (cette numération suffit à des plots interprétables, elle provient de constations empiriques);
- Déposer 10 μL 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.

Figure 3 : Protocole de confection des lames d'antigène pour l'IFI

• <u>Etape qualitative du dépistage</u> (cf. Figure 4)

La première étape du dépistage est purement qualitative. Elle permet de mettre en évidence les sérums positifs. Le seuil de positivité est fixé à 1/40. Par plot, le pourcentage de cellules infectées par *E.canis* est d'environ 70%.

- Sortir les lames du congélateur à -20°C, les sécher dans l'étuve ventilée ;
- Numéroter les sérums à tester dans les tubes Eppendorf® de 5 mL stériles, sans oublier les témoins + et − ;
- Mettre dans chaque tube stérile 450 μL de PBS et 50 μL 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 μL de PBS-lait dans chaque tube : la dilution initiale du sérum est donc de 1/20 (50/1000) ;
- Mettre à 37°C pendant 30';
- Numéroter les lames à plots sèches ;
- Mettre 10 μL de chaque tube par plot ;
- Disposer les lames dans une boîte à fond humide (fond recouvert de papier essuie-tout imbibé d'eau);
- Mettre à 37°C pendant 30';
- Mettre les lames dans un bain de PBS Tween (500 μL 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^{ème} (aliquote de 10,5 μL dilué au ½ dans 789 ,5 μL de PBS pour 80 plots);
- A partir de la solution obtenue, déposer 10 μL 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 d'intensité de fluorescence pendant 72h à 2-8°C.

Figure 4 : Protocole de dépistage qualitatif par IFI

La fluorescence en lumière ultraviolette (UV) de *morulae* dans le cytoplasme des cellules, sur plusieurs champs de vision à l'objectif 25 au microscope, témoigne d'un sérum considéré comme positif. Un sérum négatif ne présente aucune fluorescence ou une fluorescence discrète de l'ensemble du cytoplasme cellulaire.

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

Les sérums positifs subissent une quantification. Les sérums douteux sont recontrôlés.

• Etape quantitative du dépistage (cf. Figure 5)

Cette deuxième étape ne concerne que les sérums positifs. Elle permet de connaître le niveau de positivité, c'est-à-dire le titre en anticorps du sérum.

- Sortir les lames du congélateur à -20°C et les tubes contenant les sérums dilués au 1/20^{ème} (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^{ème} permettent d'obtenir une dilution au demi : 1/40^{ème}, 50 μL de cette dilution au 1/20^{ème} sont prélevés et transférés dans 150 μL de PBS pour obtenir une dilution au quart soit 1/60^{ème}, etc...);
- Déposer une lame séchée et numéroter au préalable 10 μL de 6 plots dilués (pour les faibles positifs, les dilutions au $1/20^{\text{ème}}$, $1/40^{\text{ème}}$, et $1/80^{\text{ème}}$ 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 ;
- 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 Fluorep.

Figure 5 : Protocole de titrage des sérums positifs par IFI

2.2.3.3.1.2 Test rapide de dosage immuno-enzymatique

Des tests rapides SNAP 3Dx® (IDEXX Laboratories Inc., USA) sont réalisés en parallèle avec les sérologies.

Le test rapide permet la détection simultanée de l'antigène de *Dirofilaria immitis*, de l'anticorps de *Borrelia burgdorferi*, et de l'anticorps d'*Ehrlichia canis* dans le sang total, le sérum ou le plasma canin. Un résultat positif au test *E. canis* indique un titre en anticorps

significatif de *E. canis* [63]. Pour interpréter le test, il faut observer la pastille réactive correspondant au test ehrlichiose dans la fenêtre de lecture (cf. Figures 6 et 7).









Figure 6 : Réalisation du test rapide (source : www.idexx.com)

- Utiliser la pipette fournie et déposer 3 gouttes de prélèvement dans le tube à prélèvement (bouchon bleu)
- Maintenir le flacon vertical et ajouter 4 gouttes de conjugué dans le tube à prélèvements (bouchon bleu)
- Boucher le tube à prélèvement et bien mélanger par retournement 3 à 5 fois.
- Placer le dispositif sur une surface plane. Ajouter la totalité du contenu du tube de prélèvement au puits à prélèvement en veillant à ne pas répandre le contenu hors du puits. Le prélèvement s'écoule sur la fenêtre de lecture, fait disparaître les spots colorés, et atteint le cercle d'activation en 30 à 60 secondes environ. Vérifier attentivement l'apparition du prélèvement ou d'une coloration bleue dans le cercle d'activation.
- Dès que la couleur apparaît dans le cercle d'activation, appuyer fermement sur l'activateur jusqu'à ce qu'il soit à niveau avec le corps du dispositif.
- Attendre 5 à 8 minutes avant d'interpréter le résultat.

Pour interpréter le test, observer les pastilles réactives dans la fenêtre de lecture. La variation de couleur des pastilles de prélèvement est proportionnelle à la concentration d'antigènes de la filaire des chiens, d'anticorps *B. burgdorferi* ou d'anticorps *E. canis* dans le prélèvement. Si aucune couleur n'apparaît dans la pastille de contrôle positif, refaire le test. Si seul le spot de contrôle positif change de couleur, le résultat est négatif.

Figure 7: Utilisation et interprétation du test rapide

Le test rapide a, d'après le fabricant, une sensibilité pour *E. canis*, de 99% sur sérum et une spécificité de 100%, après 244 tests (cf. notice du test).

2.2.3.3.2 Anticorps anti-plaquettes

Les anticorps anti-plaquettes sont détectés par cytométrie de flux. La méthode utilisée est celle décrite par CHABANNE *et al.* (cf. Figure 8) [15].

- Préparation des plaquettes

Au minimum, dix prises de sang sur EDTA sont effectuées sur différents chiens témoins. Les tubes sont laissés deux heures à température ambiante pour permettre la sédimentation, puis sont centrifugés 15 minutes à 1 000 tours/min. Les plasmas riches en plaquettes sont alors récupérés et poolés dans un tube de 20 mL à fond rond, puis centrifugés 10 minutes à 2 000 tours/min. Au besoin, pour éviter l'agrégation plaquettaire, on ajoute au préalable du PBS/EDTA 5%, qu'on laisse incuber 15 minutes.

Le surnageant une fois éliminé, le culot est remis en suspension puis complété avec du PBS/EDTA 0,33%. On effectue à nouveau deux centrifugations de 10 minutes à 2 000 tours/min. Le culot plaquettaire est ensuite remis en suspension dans un petit volume de PBS/EDTA 0,33% pour permettre la numération au compteur (HYCEL®). Les plaquettes sont ensuite ajustées à 400 000/μL en PBS/EDTA 0,33%. Ce test est effectué sur des plaquettes fraîches.

Préparation des sérums

Les sérums des chiens testés (chiens A, B et C) sont répartis en aliquots de $100~\mu L$ et congelés à - $20^{\circ}C$ en attendant le test. Avant le test, les sérums sont clarifiés par centrifugation à 5 000 tours/min pendant 15 minutes.

- Détection des anticorps anti-plaquettes par cytométrie de flux

On distribue $20~\mu L$ de solution plaquettaire par tube Falcon, auxquels on ajoute $20~\mu L$ de sérum à tester, et on laisse incuber 30~minutes à température ambiante. On réalise ensuite un lavage en PBS à 2~000~tours/min pendant 10~minutes, puis les culots sont rapidement agités avant l'ajout de $20~\mu L$ par tube de solution d'anti-IgG de chien couplé au FITC. Les tubes sont placés ensuite 15~minutes à l'obscurité, à température ambiante.

Après un dernier lavage en PBS à 2 000 tours/min pendant 10 minutes, on ajoute 200 µL de PBS par tube. L'acquisition au FACS (Cytomètre en flux/trieur de cellules) s'effectue dans la journée. L'analyse s'effectue par référence à un sérum de chien témoin sain et un sérum positif.

Figure 8 : Détection des anticorps anti-plaquettes par cytométrie de flux [15]

2.2.3.3.3 Test de Coombs direct

Des tests de Coombs directs sont également réalisés à partir des prélèvements sur tubes citratés.

2.2.3.3.4 Populations et sous-populations lymphocytaires

Sur chacun des échantillons sur tube citratés, un comptage lymphocytaire et une identification des lymphocytes a été réalisée au laboratoire d'hématologie de l'ENVL.

2.2.3.3.5 IFNy

Le spot test, réalisé au Centre de recherche de Mérial (Lyon, France), permet de révéler la réponse IFNγ (interféron gamma) spécifique d'*Ehrlichia canis* par les lymphocytes T, dans les cellules mononucléées de sang périphérique (PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells).

Le principe de ce test est de suivre, *ex-vivo*, la re-stimulation des PBMCs par les antigènes d'*E. canis*. Les PBMCs fraîchement isolées des chiens infectés étaient incubées avec des antigènes d'*E. canis* pendant 20 heures. Les antigènes utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir d'une lignée de macrophages (MDHSP) infectés par une souche américaine d'*E. canis* fournie à Mérial par RISTIC. L'incubation est réalisée directement sur une plaque ELISPOT (R&D Systems, Minneapolis, USA) préalablement recouverte d'anticorps anti-IFNγ. Les plaques sont ensuite lavées et les spots IFNγ sont révélés avec un second anticorps anti-IFNγ, marqué à la fluorescéine, et comptés (cf. Figures 9 et 10).

Ce test a été réalisé pour les seuls chiens B et C, après amplification de la pathogénicité de la souche sur le chien A.

- 1. Calculer le volume total d'anticorps de capture nécessaires et diluer jusqu'à la concentration voulue à l'aide de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2 7,4);
- 2. Ajouter immédiatement 100 μL de la solution diluée d'anticorps de capture par puits. Couvrir la plaque ELISPOT avec le couvercle et laisser incuber une nuit (*ici 20 heures*) entre 2 et 8°C;
- 3. Aspirer les anticorps de capture de chaque puits et laver trois fois à l'aide de la solution de lavage ou du PBS (350 μL par puits). Après le dernier lavage, retirer tout le liquide résiduel en renversant la plaque sur un papier absorbant propre ;
- 4. Bloquer les membranes en ajoutant 200 μ L de tampon bloqueur dans chaque puits. Laisser incuber pendant deus heures à température ambiante ;
- 5. Aspirer le tampon bloqueur. Rincer avec le même milieu que celui dans lequel seront cultivées les cellules ;
- 6. Aspirer le milieu de culture de la plaque et remplir immédiatement les puits avec 100 μL de milieu de culture contenant les cellules sécrétant l'INF_γ canin. Incuber à 37°C à 5% de CO₂. le temps d'incubation est déterminé de manière empirique ;
- 7. Rincer la plaque 4 fois avec le tampon de rinçage. Retirer tout le liquide résiduel en renversant la plaque sur un papier absorbant propre ;
- 8. Calculer le volume nécessaire d'anticorps de détection et diluer à la concentration nécessaire à l'aide du réactif de dilution ;
- 9. Ajouter 100 μL de la solution diluée d'anticorps de détection dans chaque puits. Couvrir la plaque avec le couvercle et laisser incuber une nuit entre 2 et 8 °C;
- 10. Aspirer la solution d'anticorps de détection et nettoyer comme indiquer à l'étape 3. Les plaques sont prêtes à être colorées ;
- 11. Après coloration le décompte des spots se fait manuellement sous un microscope, ou grâce à un lecteur ELISPOT automatique.

Figure 9: Protocole ELISPOT (R&D Systems, Minneapolis, USA)

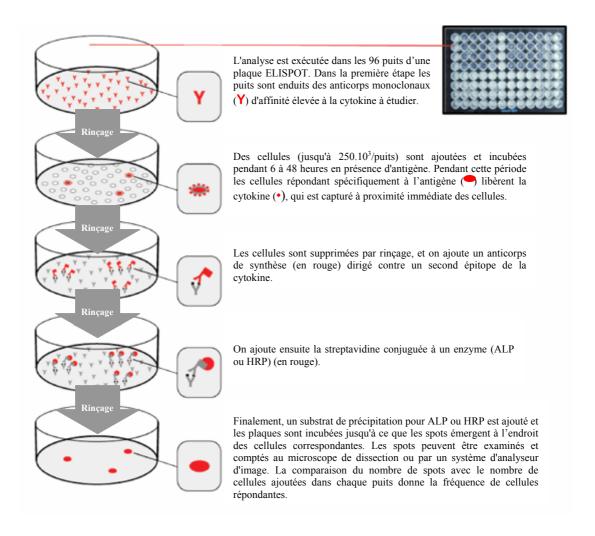


Figure 10: Principe du test ELISPOT (d'après ELISPOT – assay procedure, www.mabtech.se)

2.2.3.4 Bactériologie

2.2.3.4.1 Cultures cellulaires

Les prélèvements sanguins sur tube héparinés permettent la mise en culture sur cellules DH82 afin de restaurer un stock de matériel infectieux. Les prélèvements réalisés sur les chiens D et E ont permis ces mises en culture.

2.2.3.4.2 PCR

Des prélèvements sanguins ainsi que des échantillons de foie, de rein, de poumon, de rate et de nœuds lymphatiques sont envoyés pour la réalisation de PCR

2.2.4 Traitements

Les chiens A, B et C sont traités à la doxycycline *per os* (Ronaxan®, Mérial, Lyon) à la posologie de 10 mg/kg, matin et soir, pendant 21 jours. Le chien C a reçu en plus un nouveau traitement immunomodulateur (Glisodin® 250 IU capsules, Isocell Nutra, Paris) à raison d'une gélule par jour le temps du traitement à la doxycycline.

Les chiens D et E ne reçoivent aucun traitement et servent donc de témoins pour l'analyse des résultats.

3. RESULTATS

3.1 Suivi clinique

3.1.1 Symptômes observés

Les trois chiens A, B et C développent une ehrlichiose aiguë dans les 15 jours suivant l'inoculation ce qui confirme la virulence de la souche.

Le chien A présente des symptômes de choc quelques minutes après l'injection. On note un abattement profond, une mydriase, une tachycardie, une tachypnée, des muqueuses blanches, des vomissements. Les symptômes disparaissent après environ deux heures.

Pour les trois chiens, une légère adénomégalie ainsi qu'une pâleur des muqueuses sont mises en évidence entre J3 et J6 après inoculation. A partir de J10, on note un abattement de plus en plus prononcé avec anorexie. Les muqueuses sont pâles entre J10 et J15.

L'examen clinique général ne révèle pas d'adénomégalie abdominale interne. La palpation abdominale ne met pas en évidence de splénomégalie, ni d'hépatomégalie. Aucune trace de pétéchies n'est relevée.

De même que pour le chien A, les symptômes observés sur les chiens B et C restent très frustes. Le chien B présente un léger abattement accompagné d'anorexie entre $J_{BC}10$ et $J_{BC}13$ post-inoculation. Le reste de l'examen clinique ne révèle pas d'autres anomalies. Le chien C présente un abattement plus important et une période d'anorexie plus longue que le chien B.

Les chiens D et E, de race différente, ne présentent aucun symptôme clinique après inoculation. Cette absence de symptôme conduit à ne pas réaliser de courbe de température.

3.1.2 Evolution de la température rectale

Une courbe de température est réalisée pour chacun des trois chiens A, B et C. Un pic d'hyperthermie à 40,2°C à J12 est mis en évidence pour le chien A (cf. Figure 11). Il permet de définir la date des prélèvements sanguins destinés aux cultures et à l'inoculation des chiens B et C.

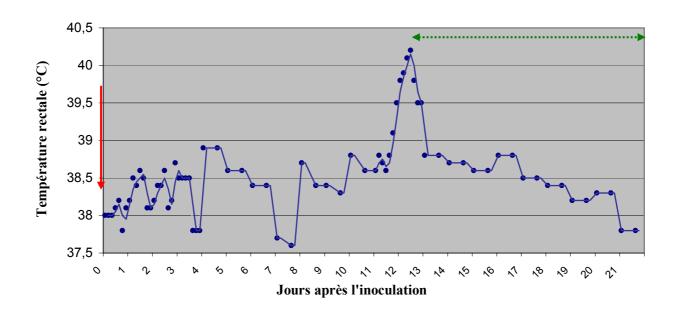


Figure 11 : Evolution de la température rectale du chien A

Pour les chiens B et C, le pic d'hyperthermie est moins prononcé que pour le chien A (cf. Figure 12). Un premier pic d'hyperthermie est mis en évidence à J11 pour les chiens B (40,2°C) et C (40,6°C). Les prélèvements sanguins destinés aux cultures cellulaires sont réalisés à cette date. Le traitement n'est pas administré à compter de cette date afin de mettre en évidence un éventuel second pic d'hyperthermie plus marqué. En effet, à J13, un pic d'hyperthermie plus important est mis en évidence pour les chiens B (40,8°C) et C (41,4°C). Un second prélèvement sanguin a été réalisé sur chacun des deux chiens afin d'obtenir du matériel infectieux.

Le traitement n'est pas mis en place immédiatement de façon à observer encore pendant 48 heures les variations de température. Un nouveau pic d'hyperthermie est noté à J17, notamment pour le chien B dont la température rectale atteint 40,6°C.

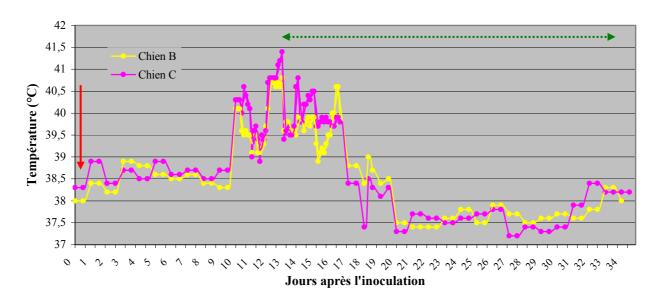


Figure 12 : Evolution de la température rectale des chiens B et C

3.2 Suivi hématologique

3.2.1 Hémogramme rouge (cf. Figure 13)

La numération-formule sanguine révèle une chute progressive du nombre d'érythrocytes dans le sang chez le chien A. Cette diminution du nombre de globules rouges s'étale de J0 (jour de l'inoculation) à J16, soit 4 jours après le début du traitement. En revanche les valeurs restent dans les limites des valeurs usuelles (> 5,5.10⁹ érythrocytes/L). Une légère baisse du nombre d'érythrocytes apparaît à J50 soit environ 30 jours après la fin du premier traitement. L'hématocrite et la concentration en hémoglobine évoluent parallèlement à la numération érythrocytaire.

L'anémie observable sur le chien A est également visible chez les chiens B et C, mais de façon plus prononcée. Le taux d'hématocrite du chien C chute d'ailleurs jusqu'à 24%, pour des valeurs usuelles comprises entre 37 et 54%, à J17 post-inoculation.

Contrairement à ce qui est observé pour le chien A, la quantité d'hématies présentes dans le sang cesse de décroître dès la prise du traitement. Cependant, la correction de l'anémie apparaît plus marquée chez le chien C pour lequel elle est la plus prononcée (3,7.10⁹ érythrocytes/L).

Après 20 jours de traitement, une très légère anémie est observée chez les chiens B et C comme elle avait été observée chez le chien A.



Figure 13 : Evolution de la numération érythrocytaire des chiens A, B et C

3.2.2 Hémogramme blanc

3.2.2.1 Leucocytes (cf. Figure 14)

Le chien A est arrivé à l'ENVL avec une leucopénie mesurée à 4,8.10⁹ leucocytes/L. La numération leucocytaire présente une chute progressive du nombre de leucocytes sanguins au cours de la période d'incubation, jusqu'à atteindre une valeur de 4,5.10⁹ leucocytes/L à J_A12. Après le début du traitement, les valeurs reviennent dans les limites de la normale (aux alentours de 8,5.10⁹ leucocytes/L). Après 5 jours de traitement, on note une nouvelle chute du nombre de leucocytes dans le sang (jusqu'à 4,10⁹ leucocytes/L) qui se prolonge jusqu'à la fin du premier traitement, et est corrigée par le second traitement.

Pour les chiens B et C, la chute des leucocytes est observable dès les 72 premières heures post-inoculation. Les valeurs minimales atteignent 5.10^9 leucocytes/L pour le chien B et 7.10^9 leucocytes/L pour le chien C. Ces valeurs sont observées respectivement à $J_{BC}14$ et $J_{BC}9$ post-inoculation.

Dès la mise en place du traitement, la leucopénie est corrigée pour chacun des deux individus, mais 4 jours après le début du traitement on peut mettre en évidence une chute

progressive du nombre de leucocytes. Cette chute est continue jusqu'à l'arrêt du traitement de 21 jours. Au dernier jour du traitement, la numération leucocytaire des chiens B et C est de 6.10⁹ leucocytes/L. Dès l'arrêt du traitement, on observe une correction de la leucopénie.

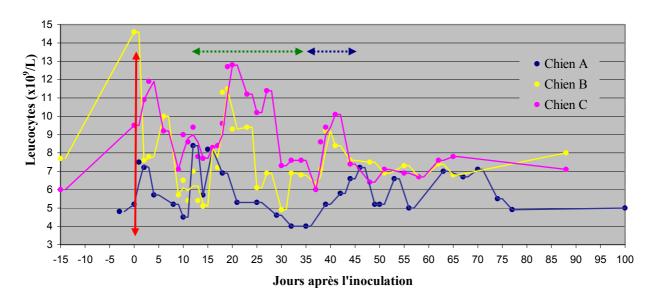


Figure 14 : Evolution de la numération leucocytaire des chiens A, B et C

3.2.2.2 Lymphocytes (cf. Figure 15)

Au cours de la phase d'incubation clinique, chez le chien A, on note une lymphopénie assez précoce. En effet, à J8, le taux de lymphocytes du chien A a atteint son minimum : 416 lymphocytes/mm³. Au pic d'hyperthermie (J12), le taux de lymphocyte est déjà dans une phase ascendante. On note également une chute transitoire du taux de lymphocytes à J50, en même temps que la légère anémie décrite précédemment. A l'acmé de la maladie, on note, chez les chiens B et C, en parallèle de la leucopénie, une lymphopénie atteignant 415 lymphocytes/mm³ de sang, à J16, c'est-à-dire au premier jour de la thérapie.

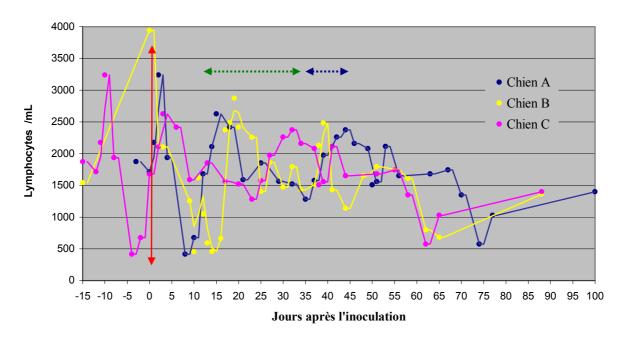


Figure 15: Evolution des lymphocytes chez les chiens A, B et C

La fraction de lymphocytes T CD_5 atteint un optimum (84%) à J_A50 pour le chien A (cf. Figure 16). De même, le rapport CD_4/CD_8 est maximum vers J_A50 soit 38 jours après le pic de température et le début du traitement, à l'arrêt du second traitement (cf. Figure 16). La fraction de lymphocytes T CD5, pour les chiens B et C, est décroissante jusqu'au début du traitement, puis réaugmente pour atteindre un maximum à J_B39 pour le chien B, soit 3 semaines après le début du traitement à la doxycycline seule, et à J_C25 pour le chien C, soit une dizaine de jour après le début du traitement complémenté en immunomodulateur. Pour ces deux chiens, le rapport CD4/CD8 décroît jusqu'à J25 et atteint son maximum à $J_{BC}39$, comme pour le chien A.

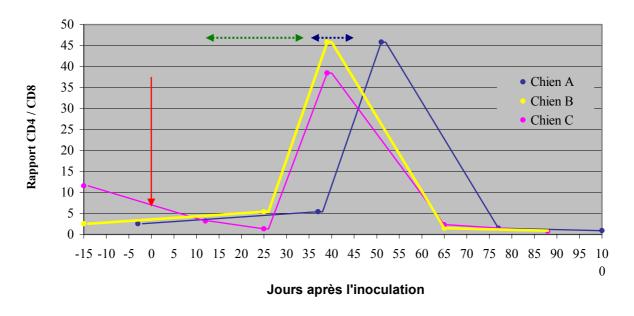


Figure 16: Evolution du rapport CD4 / CD8 chez les chiens A, B et C

3.2.2.3 Granulocytes neutrophiles et éosinophiles (cf. Figure 17)

Pour le premier chien inoculé, un pic de la fraction des polynucléaires neutrophiles (PNN) est visible à J_A8 (90% de PNN) alors que la neutrophilie n'est présente qu'à J_A12 (6,63.10³ PNN/mm³).

Une très légère éosinophilie est observée à J18, soit 6 jours après le pic d'hyperthermie et le début du traitement. Le retour aux valeurs usuelles se fait en une dizaine de jours.

Pour les chiens B et C, la lymphopénie est accompagnée d'une neutrophilie dont la valeur maximale (8,28.10³ PNN/mm³ et 10,50.10³ PNN/mm³) est mesurée à J16 pour chacun des deux chiens. La fraction de granulocytes basophiles n'évolue pas de manière significative. En revanche, on note une légère réaction éosinophilique vers J20 soit 4 jours après le début du traitement. Pour chacun des cas B et C, on observe un second pic d'éosinophiles entre J30 et J38, jour de l'arrêt du traitement à la doxycycline.

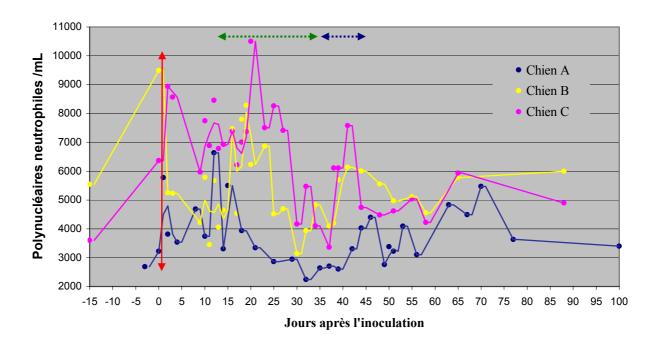


Figure 17: Evolution de la neutrophilie chez les chiens A, B, et C

3.2.3 Numération plaquettaire (cf. Figure 18)

La thrombopénie attendue survient à J12 chez le chien A (64.10⁹ plaquettes/L), en même temps que le pic d'hyperthermie. Cette thrombopénie est précédée d'un autre épisode de chute des plaquettes (92.10⁹ plaquettes/L) deux jours après l'inoculation. Cette première thrombopénie s'est résolue naturellement en 4 jours.

La numération plaquettaire atteint des valeurs dans les limites des valeurs usuelles dans les 3 à 4 jours qui ont suivi le début du traitement.

On met en évidence une nouvelle thrombopénie en fin de traitement (après 18 jours de traitement), avec une numération plaquettaire de 85.10⁹ plaquettes/L, le jour suivant la fin du traitement. A la suite de ce nouvel épisode de thrombopénie, il est décidé de replacer le chien A sous doxycycline à raison de 20 mg/kg pendant 10 jours qui sont suivis d'un retour aux valeurs usuelles de la numération plaquettaire.

De même que pour le chien A, pour chacun des chiens B et C, on observe une chute des plaquettes dès les 6^{ème}-8^{ème} jour post-inoculation. Cette thrombopénie s'accroît de manière régulière jusqu'à la date de début de traitement. Au pic d'hyperthermie, la numération plaquettaire est inférieure à 100.10⁹ plaquettes/L pour les deux chiens. Après le début du

traitement, les valeurs reviennent rapidement dans les limites des valeurs usuelles. Vers $J_{BC}39$, à l'arrêt du traitement, on observe un nouvel épisode thrombopénique, mais moins prononcé que celui observé à l'acmé de la maladie. Soixante-douze heures après l'arrêt du traitement, la numération plaquettaire est naturellement redevenue normale.

De même, les chiens D et E développent une thrombopénie. Celle-ci est maximale à J18 (34.10⁹ plaquettes/L) pour le chien D, et à J13 (7.10⁹ plaquettes/L) pour le chien E. Cette thrombopénie se résout naturellement en l'absence de traitement. Aucune rechute n'est observée dans le mois suivant l'acmé de la maladie.

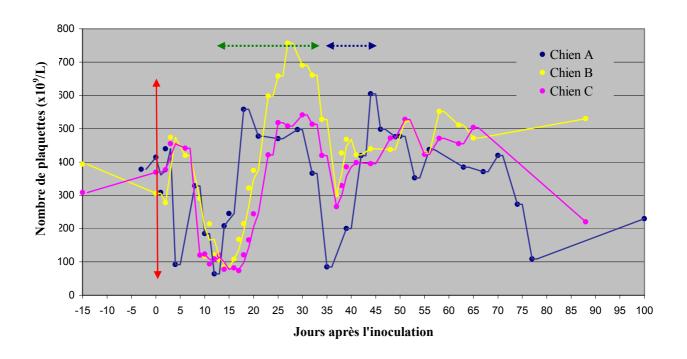


Figure 18: Evolution de la numération plaquettaire chez les chiens A, B et C

3.3 Suivi de la biochimie sanguine

3.3.1 Enzymes hépatiques

Le suivi des valeurs des phosphatases alcalines (PAI) du chien A montre deux pics au cours de l'expérimentation (cf. Figure 19). Le premier débute au pic d'hyperthermie et atteint 80 UI/L deux jours après le début du traitement. Les valeurs se stabilisent ensuite autour de 65 UI/L et on observe un second pic, plus important, qui débute avec la seconde phase de thrombopénie observée. Cette augmentation des PAI est corrigée par le second traitement.

Le chien A a été inoculé avec des valeurs sériques en alanine amino-transférase (AlAT) supérieures à 300 UI/L (cf. Figure 20). Ces valeurs ont rapidement diminué au cours de la période d'incubation de la maladie. Elles ont continué à décroître de manière moins prononcée jusqu'à la fin du premier traitement. Après le début du second traitement, on observe un léger pic à J_A49 (67 UI/L), atteint à l'arrêt de la thérapie. Les valeurs se sont ensuite stabilisées autour de 30-35 UI/L.

Le suivi de l'aspartate amino-transférase (AsAT) révèle une très légère augmentation des valeurs deux jours après le début du premier traitement (cf. Figure 21). On observe également une augmentation, moins brutale, après le début du second traitement.

Les teneurs en PAI et AIAT (cf. Figure 19-20) évoluent parallèlement pour les chiens B et C. Les valeurs augmentent continuellement de J0 à J20 (4 jours après le début du traitement). Le pic est mesuré, pour les PAI, à 153 UI/L pour le chien B, et 258 UI/L pour le chien C. Les valeurs sont ensuite décroissantes.

La courbe de suivi des AsAT (cf. Figure 21) est similaire à celles des deux paramètres précédents. En revanche le pic se produit à J16, quatre jours avant celui des PAI et AlAT, simultanément au pic d'hyperthermie. Les valeurs atteignent au maximum 139 UI/L pour le chien C. En outre, on observe un second pic, plus faible que le premier, aux alentours de J20-22, correspondant au deuxième épisode de thrombopénie.

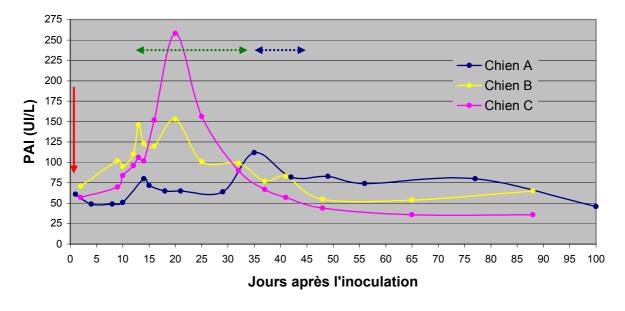


Figure 19 : Evolution des phosphatases alcalines sériques des chiens A, B et C

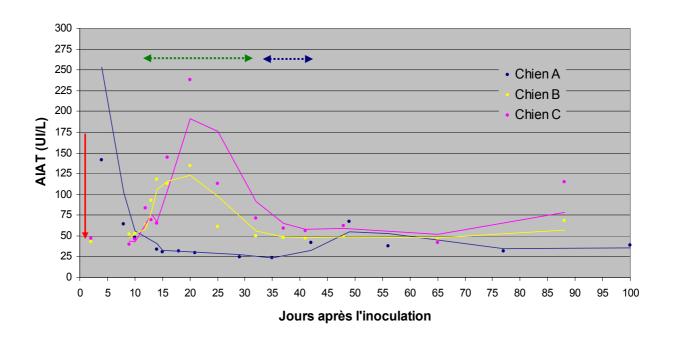


Figure 20 : Evolution des alanine amino-transférase sérique des chiens A, B et C

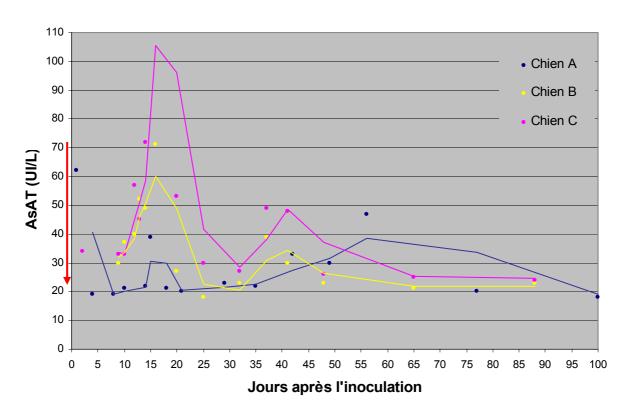


Figure 21 : Evolution des aspartate amino-transférase sériques des chiens A, B et C

3.3.2 Biochimie rénale

3.3.2.1 Créatininémie (cf. Figure 22)

La créatininémie du chien A décroît de manière régulière et constante de J0 à J35 (début du second traitement). Les valeurs sont proches de celles de J0, six jours après la fin du second traitement.

La créatininémie des chiens B et C est continuellement décroissante de J0 à J13 (second pic d'hyperthermie), mais la décroissance est plus importante à partir de J10. La mise en place du traitement ne permet de corriger les valeurs qu'à partir du quatrième jour. On observe une très légère chute de la créatininémie à J41, soit 25 jours après le début du traitement, et 4 jours après l'arrêt de celui-ci.

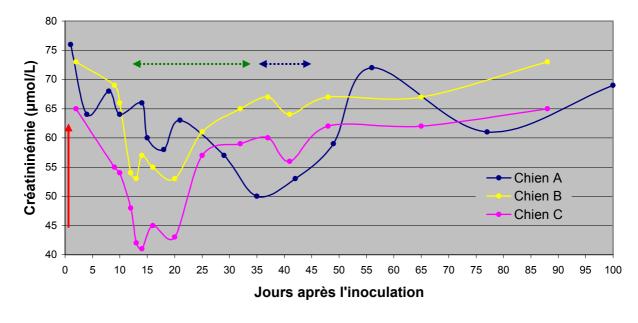


Figure 22 : Evolution de la créatininémie des chiens A, B et C

3.3.2.2 Urémie (cf. Figure 23)

L'urémie du chien A est croissante de J4 au pic d'hyperthermie, puis de J21 (9 jours après le début du premier traitement) à J35 (début du second traitement). Les valeurs augmentent à nouveau à la fin du second traitement et se stabilisent autour de 9 mmol/L.

Pour le chien B, l'urémie est décroissante de J0 à J20. Pour le chien C, la mise en place du traitement permet de corriger immédiatement (dès J16) cette chute. A J37, soit le

jour de l'arrêt du traitement pour les chiens B et C, on observe à nouveau une chute de la teneur du sang en urée, spontanément résolue.

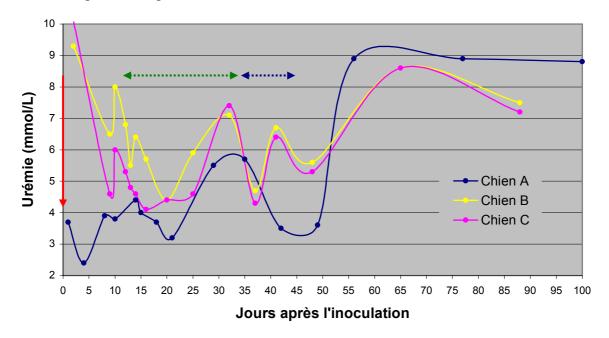


Figure 23 : Evolution de l'urémie des chiens A, B et C

3.3.3 Electrophorèse des protéines sériques

L'électrophorèse des protéines n'est réalisée que sur certains échantillons choisis de manière à être les plus représentatifs possibles de l'évolution des paramètres mesurés au cours de la maladie.

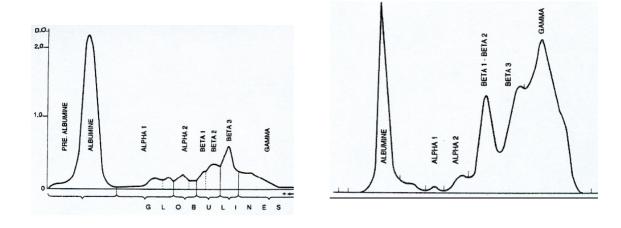


Figure 24 : Electrophorèse d'un chien sain (à gauche) et d'un chien ehrlichien (à droite) [55]

On met en évidence une hypoprotéinémie (valeurs usuelles : 60-67 g/L) accompagnée d'une hypoalbuminémie (valeurs usuelles : 39 g/L) à J_A12 (albumine : 55,7 % soit 34g/L) et J39 (albumine : 54,7 % soit 34,5g/L) chez le chien A. Ces deux phases correspondent aux deux épisodes de thrombopénie décrits précédemment. Associée à ces deux pics, on peut décrire alors une légère augmentation des fractions β et γ . La deuxième augmentation de la fraction β -globulines se prolonge d'ailleurs jusqu'à J_A100 , date de l'euthanasie. La fraction γ -globulines a tendance à augmenter progressivement jusqu'à J_A100 , pour atteindre 8,8 % soit 5,5g/L.

Chez les chiens B et C, on note une hypoprotéinémie (cf. Figure 25) qui débute vers $J_{BC}10$ et se poursuit jusque $J_{BC}16$ (deux jours avant le début du traitement). Celle-ci correspond à une hypoalbuminémie qui atteint 26g/L pour le chien B et 18g/L pour le chien C. De même que pour le chien A, cette hypoprotéinémie est observée simultanément au pic de température et à la thrombopénie.

En parallèle de l'hypoalbuminémie, on note une augmentation simultanée des fractions β et γ jusqu'à $J_{BC}20$, deux jours après la mise en place de la thérapie (cf. Figure 26). Chez le chien C, on observe un léger pic d' α 1-globulines à $J_{BC}16$. Après la fin du traitement ($J_{BC}39$), on peut remarquer une légère augmentation de la fraction γ -globulines jusqu'au jour des euthanasies. La fraction β -globulines ne réaugmente que vers $J_{BC}60$ et cela jusqu'à l'euthanasie des chiens.

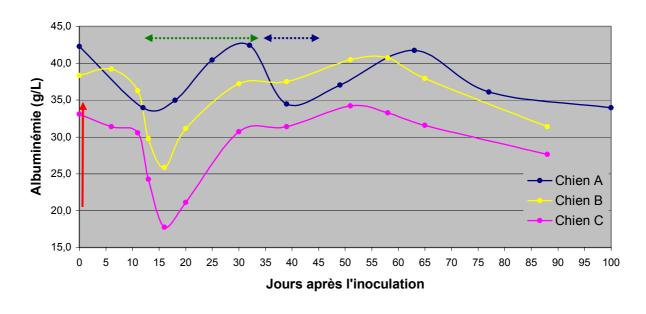


Figure 25 : Evolution de l'albuminémie des chiens A, B et C

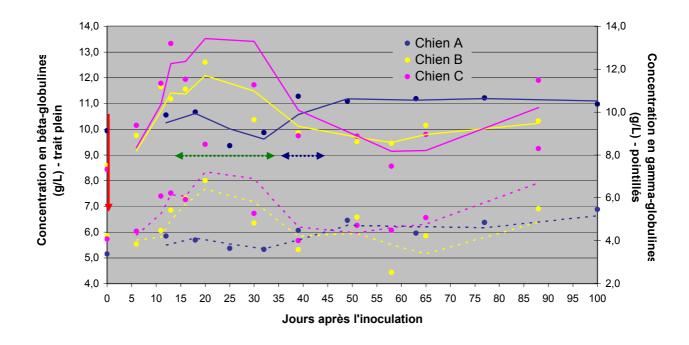


Figure 26: Evolution des concentrations en bêta et gamma-globulines des chiens A, B et C

3.4 Suivi sérologique

3.4.1 Immunofluorescence indirecte (cf. Figure 27)

Dès J10, avant l'apparition des premiers symptômes, les trois chiens A, B et C sont détectés positifs au test d'immunofluorescence indirecte.

A l'acmé de la maladie du chien A (J_A12), la fluorescence est décelable au $1/160^{\rm ème}$. A l'arrêt du traitement, une dilution au $1/5120^{\rm ème}$ permet encore de détecter une positivité au test. Quatre jours après la mise en place du second traitement, le chien A est positif au $1/10240^{\rm ème}$. Le jour de l'euthanasie, il est encore positif au $1/1280^{\rm ème}$.

La séropositivité du chien B est croissante jusqu'à J20 (positif au 1/5120^{ème}) soit 4 jours après le début du traitement. A l'arrêt du traitement, le chien B est toujours positif mais pour une dilution maximum au 1/640^{ème}. A partir de J65 la détectabilité des anticorps dans le sérum du chien B augmente à nouveau et le jour des euthanasies (J_B88), la fluorescence est détectable au 1/1280^{ème}.

Le titre le plus élevé en anticorps pour le chien C est noté à J_C17 (le lendemain de la mise en place du traitement) avec une fluorescence détectée pour une dilution au $1/5120^{\text{ème}}$.

Après le traitement, le chien C reste positif mais pour une dilution maximum au $1/640^{\text{ème}}$. Le jour de l'euthanasie (J_C88), le chien C est séropositif au $1/5120^{\text{ème}}$.

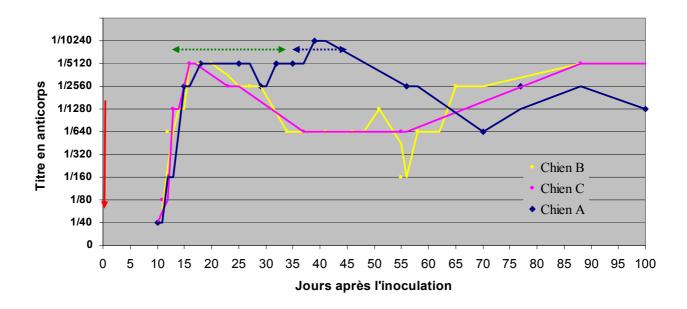


Figure 27 : Evolution du titre en anticorps vis-à-vis d'Ehrlichia canis des chiens A, B et C

3.4.2 Tests rapides de dosage immuno-enzymatique

Le premier résultat positif du test SNAP 3Dx est lu avec certitude à J_A32 (cf. Figure 28) pour le chien A (IFI positive au $1/5120^{\rm ème}$). Des résultats douteux sont obtenus à partir de J_A15 et jusqu'à J_A29 .



Figure 28 : Test négatif (à gauche - source : www.idexx.com) et test positif à la recherche d'anticorps anti-E. canis (à droite)

Avec l'utilisation du test rapide, le chien B est négatif jusqu'à J_B14 alors que l'IFI est positive au $1/1280^{\grave{e}me}$. A J_B20 , l'IFI est positive au $1/5120^{\grave{e}me}$, mais le résultat du test rapide est douteux. A J_B27 , on lit le premier résultat positif avec certitude.

Jusqu'à J_C24 , malgré une IFI positive au $1/5120^{\rm ème}$ une semaine auparavant, le test rapide sur le sang du chien C donne des résultats négatifs. Le premier résultat positif est lu à J_C34 alors que la séropositivité détectée par IFI est dans une phase décroissante.

3.4.3 Mise en évidence d'anticorps anti-plaquettes

La recherche d'anticorps anti-plaquettes a permis d'en déceler chez le chien B, à partir du 14^{ème} jour après l'inoculation, au moment où la thrombopénie était maximale. La détection de ces anticorps était maximale à J22, et on en retrouvait à J36, au moment du second épisode thrombopénique.

Ces anticorps n'ont pas pu être mis en évidence chez les chiens A et C.

3.4.4 Résultats du Spot test (cf. Figure 29)

Le nombre de spots spécifiques à l'IFNγ, donnés pour 5.10⁵ cellules mononuclées de sang périphérique, était déterminé par la soustraction du nombre de spots obtenus après stimulation avec des macrophages MDHSP non infectés au nombre de spots obtenus après stimulation par des macrophages MDHSP infectés par *E. canis*. Après stimulation par des macrophages MDHSP non infectés, on n'obtenait que 0 à 5 spots.

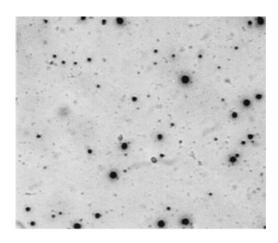


Figure 29 : Puits sur une plaque ELISPOT (x45) d'après ASAI et al. [1]

Les deux chiens ont apparemment développé une réponse IFN γ spécifique d'*E. canis* par les cellules T, dès le $11^{\text{ème}}$ jour post-inoculation (cf. Figure 30). Les réponses IFN γ au $13^{\text{ème}}$ et $32^{\text{ème}}$ jour post-inoculation ont été également analysées. Dans chaque cas, la réponse observée était moindre.

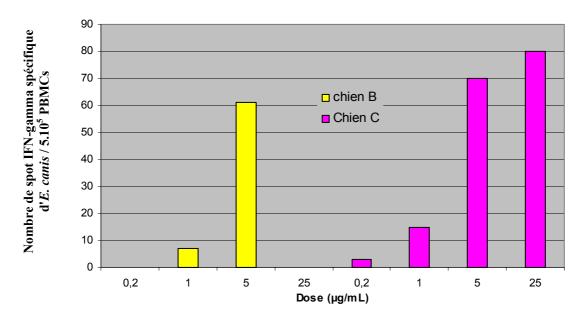


Figure 30 : Résultats du Spot test réalisé sur du sang des chiens B et C, au 11ème jour après l'inoculation

3.5 Examens nécropsiques et anatomo-pathologiques

3.5.1 **Reins**

Aucune lésion significative des reins n'est observée chez les chiens A, B et C lors de l'autopsie. Seuls quelques foyers d'accumulation de protéines sont observables au microscope optique au niveau des glomérules rénaux (cf. Figure 31).

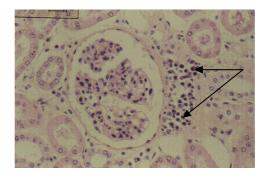


Figure 31 : Accumulation de protéines au niveau des glomérules rénaux – Grossissement x100, coloration MGG (cliché S. Jouret) [55]

3.5.2 Poumons

L'aspect macroscopique des poumons ne révèle aucune anomalie lors de l'autopsie hormis la présence d'un léger œdème. A l'examen histologique, on distingue, chez les trois chiens, quelques foyers inflammatoires péri-vasculaires. Les trois chiens présentent le jour de l'autopsie une légère pneumonie de type interstitielle.

3.5.3 Foie et rate

A l'autopsie, ni le foie ni la rate de chacun des chiens ne présente d'anomalies. Microscopiquement, on observe de gros follicules lymphoïdes secondaires réactionnels dans la corticale des rates des chiens A et C. On note également une hypertrophie plus ou moins marquée de la pulpe blanche chez ces deux chiens.

3.5.4 Nœuds lymphatiques

L'exploration des nœuds lymphatiques met en évidence une hypertrophie des nœuds lymphatiques mandibulaires chez le chien A, et des tonsilles palatines chez le chien B (cf. Figure 32). Quelques noeuds lymphatiques intestinaux sont également réactionnels. En coupe, ces différents organes présentent de nombreux follicules lymphoïdes avec une majorité de lymphoblastes.

On observe également un grand nombre de plasmocytes, c'est-à-dire des lymphocytes B activés. La réaction immunitaire observée est donc plus importante que celle mise en évidence au niveau de la rate.

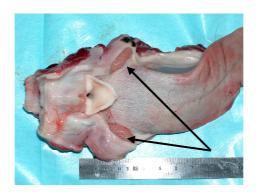


Figure 32: Hypertrophie des tonsilles palatines du chien B

3.6 Bactériologie

Les mises en cultures ont permis de restaurer un stock de matériel infectieux de la souche d'*Ehrlichia canis* Borgo 89.

Les PCR n'ont pas pu être réalisées du fait d'une décongélation des prélèvements lors du transport.

4. DISCUSSION

4.1 Pouvoir pathogène de la souche d'Ehrlichia canis Borgo 89

4.1.1 Efficacité des inoculations expérimentales

Les inoculations expérimentales menées sur chacun des cinq chiens ont permis de confirmer la pathogénicité de la souche Borgo 89 d'*E. canis*. En effet, tous les chiens ont développé une forme aiguë de la maladie. Ils ont présenté des symptômes cliniques, plus ou moins frustres, ainsi que des modifications hématologiques et biochimiques.

4.1.2 Tableau clinique classique d'ehrlichiose monocytaire canine aiguë

4.1.2.1 Signes cliniques

Les symptômes majeurs observés au cours de cette expérimentation sont ceux les plus fréquemment décrits lors d'infection naturelle ou expérimentale par *E. canis*. En effet, l'ehrlichiose canine se manifeste lors de la phase aiguë par un épisode fébrile survenant entre 11 et 20 jours après l'infection. Cet épisode fébrile se caractérise par une brusque hyperthermie atteignant jusqu'à 41,5°C. Une anorexie transitoire ainsi qu'une asthénie sont fréquemment décrites concomitamment à l'hyperthermie [6, 54, 71, 94, 96]. Dans notre étude, le pic d'hyperthermie est observé entre 11 et 13 jours après l'inoculation, et atteint 41,4°C pour le chien C. Il s'agit du seul critère clinique diagnostic réellement apparent pour confirmer le développement de la maladie. Les chiens malades ont tous présenté un épisode d'abattement et d'anorexie. Une perte de poids est quasiment systématiquement décrite, faisant suite à l'anorexie. Aucune courbe de suivi tendant à la confirmer n'a été réalisée dans cette étude.

En règle générale, l'examen clinique approfondi permet de mettre en évidence une adénopathie des nœuds lymphatiques mandibulaires et parfois des ganglions préscapulaires [54, 71, 94, 96]. Mais dans notre étude, seule une induration sans véritable hypertrophie des nœuds lymphatiques était présente.

En phase aiguë d'EMC, il est parfois également possible de mettre en évidence une hépatomégalie ainsi qu'une splénomégalie à la palpation abdominale [54, 94, 96]. Cette observation n'a été confirmée sur aucun des cinq chiens infectés expérimentalement. La mise

en place précoce d'un traitement sur les chiens A, B et C a certainement limité l'apparition de ces symptômes qui sont plutôt décrits lors des phases subclinique et chronique de la maladie [38, 54, 63, 97]. En revanche, les chiens D et E, n'ayant reçu aucun traitement, n'ont pas non plus développé de splénomégalie, ni d'hépatomégalie. La sensibilité individuelle des chiens peut expliquer ce phénomène. Par ailleurs, il a été avancé que les chiens de race Berger allemand développent des symptômes cliniques très prononcés contrairement aux chiens de race Beagle ou Labrador qui sont utilisés ici [57]. Les mêmes inoculations réalisées sur des chiens très sensibles à l'infection par *E. canis*, comme les Bergers allemands, auraient pu permettre l'observation d'un plus grand nombre de symptômes, alors qu'ils se révélaient frustres dans notre étude.

De même, l'apparition de pétéchies ou d'épistaxis lors de la phase aiguë de l'EMC est plus fréquemment décrite chez certaines races [57]. Dans notre étude, ces symptômes n'ont pas été mis en évidence.

D'autres symptômes ont été décrits de manière moins fréquente. Ont ainsi été mis en évidence, des polyarthrites [6, 17, 71], des atteintes neurologiques telles que des ataxies ou des syndromes vestibulaires centraux [51], ou encore des uvéites et des polymyosites [71].

4.1.2.2 Anomalies hématologiques

4.1.2.2.1 Thrombopénie

4.1.2.2.1.1 Caractéristiques

L'EMC est caractérisée par une thrombopénie majeure observée concomitamment au pic d'hyperthermie. Selon les différentes études, elle est retrouvée dans 70 à 100% des cas d'EMC aiguë [29, 94]. Cette thrombopénie est plus ou moins importante selon l'individu considéré [11, 14, 20, 57, 62, 71, 77, 89]. Ainsi, le chien E présentait une numération plaquettaire de 7.10⁹ plaquettes/L au pic d'hyperthermie.

Lorsque la thrombopénie est très marquée (< 10.10⁹ plaquettes/L), on ne trouve quasiment aucune plaquette sur le frottis sanguin, et les rares que l'on peut observer sont souvent de grande taille [5].

La thrombopénie est l'anomalie plaquettaire la plus souvent décrite chez les animaux de compagnie. Elle est facilement mise en évidence par la numération plaquettaire, réalisée soit par une méthode manuelle, soit à l'aide d'un automate. Les causes en sont multiples mais les maladies parasitaires, infectieuses (telles que l'EMC) ainsi que les troubles accompagnés de coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) restent les plus courantes [2].

Pour NORTHERN *et al.* [74], la thrombopénie est l'une des causes les plus fréquentes de saignement chez le chien. D'autres auteurs mentionnent que l'intensité de la thrombopénie n'est pas toujours en rapport avec les signes cliniques mais que les animaux dont le nombre de plaquettes est inférieur à 30.10⁹ plaquettes/L peuvent présenter de graves hémorragies [2].

4.1.2.2.1.2 Pathogénie

4.1.2.2.1.2.1 Thrombopénie et augmentation du volume plaquettaire moyen

Pour NORTHERN *et al.*, le volume plaquettaire moyen du chien sain est compris entre 5,4 et 9,4 fL [74]. Les mêmes auteurs indiquent qu'une macrothrombocytose démontre une thrombopoïèse active. Au cours de la phase aiguë de l'ehrlichiose canine, le volume plaquettaire moyen (VPM) est de 9,5 à 13 fL selon SMITH *et al.* [89]. Dans notre étude, le VPM n'a pas été quantifié, mais la lecture des frottis sanguins a mis en évidence la présence de macrothrombocytes en grande quantité entre J12 et J17 post-inoculation pour chacun des trois chiens A, B et C ce qui tend à montrer l'existence d'une thrombopoïèse active.

Dans notre étude, le pic d'hyperthermie et la thrombopénie ont été observés de manière synchrone, à J12 pour le chien A et entre J11 et J13 pour les chiens B et C. Ces deux manifestations, clinique et biologique, sont les deux le plus fréquemment rapportées lors de phase aiguë EMC. Ces signes apparaissent entre J10 et J14 post-inoculation lors d'infection expérimentale. Le diagnostic peut être renforcé vers J12 par l'observation de *morulae* d'*Ehrlichia canis* dans les cellules monocytaires sanguines [9]. En zone d'enzootie, la numération plaquettaire est un bon indicateur de la maladie et l'accentuation de la thrombopénie peut accroître la fiabilité du diagnostic [14].

4.1.2.2.1.2.2 Origine de la thrombopénie

Les mécanismes de la thrombopénie lors de la phase aiguë de la maladie ne sont pas encore totalement élucidés, mais celle-ci semble multifactorielle [63].

La thrombopénie est attribuée à différents mécanismes, selon les stades de la maladie. Au cours de la phase aiguë, observée lors de notre étude, les principales hypothèses sont :

- l'augmentation de la consommation plaquettaire du fait de phénomènes inflammatoires vasculaires ;
- l'augmentation de la séquestration splénique des plaquettes ;
- une destruction plaquettaire d'origine immunologique entraînant une diminution du temps de vie plaquettaire [43].

4.1.2.2.1.2.2.1 Séquestration des plaquettes

Dès 1975, une étude, menée par SMITH *et al.*, basée sur le marquage des plaquettes au Phosphore 32, a montré que leur durée de vie diminue de 9 à 4 jours, dès le deuxième jour de l'infection par *Ehrlichia canis* [89]. De la même façon, LOVERING *et al.* ont montré qu'il existait une diminution de l'adhésion plaquettaire lors d'ehrlichiose aiguë [62]. Ce phénomène est dû à la production par les plasmocytes d'un *Platelet Migration Inhibiting Factor* (PMIF) qui inhibe la formation de pseudopodes et favoriserait la séquestration des plaquettes dans divers organes dont la rate [63].

La rate a non seulement un rôle dans la défense de l'organisme, mais c'est également un réservoir de plaquettes et d'érythrocytes. La splénomégalie décrite lors d'ehrlichiose monocytaire canine, mais non détectée lors de notre étude, entraîne une augmentation de la séquestration et de la destruction des plaquettes par les macrophages spléniques [77]. L'étude de SMITH *et al.* a d'ailleurs montré que la rate est le premier site de destruction des plaquettes [89]. La splénomégalie provoque la diminution du nombre de thrombocytes circulants. En médecine humaine, il a été démontré que la splénomégalie pouvait entraîner la séquestration de près de 90% du pool plaquettaire [77]. Une étude menée par HARRUS *et al.* établit d'ailleurs que les paramètres hématologiques de chiens splénectomisés, infectés expérimentalement par *Ehrlichia canis*, subissent moins de modifications que ceux des chiens non splénectomisés infectés avec la même souche. Les résultats de cette étude renforcent l'hypothèse du rôle prépondérant de la rate dans la pathogénie de l'ehrlichiose monocytaire

canine. Les auteurs soulignent également la possibilité du rôle de médiateurs inflammatoires ou d'autres substances d'origine splénique dans la pathogénie de la maladie [45].

Dans notre étude, aucune splénomégalie n'a été détectée à la palpation abdominale au moment de la thrombopénie ce qui nous permet de discuter du rôle de la rate dans la phase aiguë de l'EMC. Une splénomégalie présente en phase chronique peut expliquer la thrombopénie persistante, mais sans augmentation du volume de la rate dans les premiers jours de la phase aiguë, on peut penser que la thrombopénie n'est pas due uniquement à une séquestration splénique des plaquettes. Par ailleurs, l'observation de macrothrombocytes signale une thrombopoïèse active, ce qui signifie qu'il y a une forte consommation des plaquettes. Si le rôle de la rate est écarté à ce moment de la maladie, il doit exister un autre phénomène responsable de la consommation plaquettaire.

4.1.2.2.1.2.2.2 Destruction plaquettaire

L'origine immune de la destruction plaquettaire a depuis longtemps été évoquée. Cependant, la précocité de la thrombopénie, observée en moyenne 14 jours après l'infection, semblait incompatible avec une réponse immunitaire.

Or certaines expérimentations ont montré l'existence d'anticorps anti-plaquettes chez le chien après une infection expérimentale à *E. canis*. Ceci renforce l'hypothèse qu'il existe un phénomène immunitaire contribuant à la thrombopénie observée dans la phase aiguë de la maladie [48, 98]. Dans notre étude, la mise en évidence la plus précoce de ces anticorps a été réalisée à J7 post-inoculation. Sur les 6 chiens présents dans le protocole de HARRUS *et al.*, la détection la plus tardive des anticorps anti-plaquettes a été réalisée à J17 après inoculation [48].

L'intervention d'une destruction plaquettaire d'origine immune lors de la phase aiguë de l'ehrlichiose monocytaire canine a donc été démontrée, mais l'origine de ces anticorps n'est pas entièrement comprise. Deux hypothèses ont, dès lors, été posées :

- Les lymphocytes B, porteurs de récepteurs à auto-anticorps anti-plaquettes, se multiplieraient du fait de l'existence d'antigènes bactériens proches des antigènes plaquettaires du chien [63].
- WANER *et al.* évoquent la possibilité que l'augmentation d'anticorps antiplaquettes soit due à la destruction massive de plaquettes, par des phénomènes

non immunologiques, dans les premiers temps de l'infection, et à une surproduction de ces auto-anticorps en réponse à la libération massive de constituants plaquettaires dans le torrent circulatoire [98].

Dans notre étude, on a pu mettre en évidence l'existence probable d'anticorps antiplaquettes, chez le chien B, au pic d'hyperthermie (J_B13). La présence de ces anticorps confirme l'intervention d'un phénomène immun dans la thrombopénie observée lors de la phase aiguë de la maladie. L'apparition précoce de ces anticorps conforte l'hypothèse de leur rôle dans la phase aiguë de l'EMC.

D'autres données viennent encore renforcer l'hypothèse d'une destruction plaquettaire d'origine immune. L'injection d'une substance, permettant de consommer le complément (*Cobra Venom Factor*), avant l'infection par *E. canis* permet d'obtenir une thrombopénie moins marquée que lors d'une infection sans manipulation préalable. Il existe donc une consommation du complément concomitamment à la thrombopénie ce qui renforce l'idée d'une destruction à médiation immune [44, 48].

La thrombopathie, décrite par LOVERING *et al.*, contribuerait aux phénomènes de saignements observés lors de la phase aiguë de la maladie. La diminution de l'agrégation plaquettaire serait due aux anticorps anti-plaquettes qui interagiraient avec des glycoprotéines de la membrane plaquettaire [62].

4.1.2.2.2 Leucopénie

Le suivi de cas cliniques, mené par DAVOUST *et al.* en 1996, a permis de montrer l'existence d'une leucopénie, parfois suivie d'une leucocytose, lors d'EMC [29].

En phase aiguë de la maladie, la leucopénie est moins souvent décrite que l'anémie ou la thrombopénie. En revanche, lors de la phase chronique, elle prend une valeur pronostique [55]. La leucocytose constitue un signe de l'inflammation [28].

4.1.2.2.3 Anémie

L'anémie observée lors d'EMC est une anémie normocytaire normochrome, le plus souvent arégénérative (aplasie médullaire au myélogramme). Parfois, à la suite d'une hémolyse ou de saignements, elle devient régénérative. On note alors sur le frottis une polychromatophilie, une anisocytose et la présence d'érythroblastes [5].

L'anémie régénérative hémolytique de la phase aiguë de l'EMC peut être mise en évidence par une hémoglobinurie, signe d'une hémolyse intravasculaire [29].

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer l'anémie. L'hémolyse peut être due à une destruction des globules rouges par la bactérie, ou à une réaction immunologique secondaire : un test de Coombs positif, rapporté dans 30% des cas d'ehrlichiose par plusieurs auteurs, bien que négatif dans notre étude, permet de supposer une anémie hémolytique à médiation immune [98].

4.1.2.3 Biochimie sanguine

4.1.2.3.1 Biochimie hépato-rénale

L'élévation des enzymes hépatiques, observée chez chacun des sujets étudiés, et classiquement décrite dans les diverses publications, est transitoire. Elle est due à des troubles hépatiques de faible gravité. Elle est le signe que l'infection aiguë est à l'origine d'une atteinte hépatique inflammatoire [30].

La protéinurie, non observée lors de notre étude, peut intervenir indépendamment ou concomitamment à une glomérulonéphrite [18]. Au cours des autopsies, nous n'avons cependant pas observé de lésions rénales, que ce soit à l'examen macroscopique ou à l'examen histologique.

4.1.2.3.2 Hypoalbuminémie

Les causes d'hypoalbuminémie chez le chien sont multiples : malnutrition protéique, néphropathie (albuminurie sans lésions rénales associées), pertes sanguines importantes, maladie hépatique (infiltration plasmocytaire péri-vasculaire) voire pertes périphériques à la suite d'oedèmes dus à une vascularite [42, 55].

Certains auteurs pensent également qu'elle est purement physiologique et en partie régulée par la pression oncotique. Faisant suite à la synthèse massive de globulines ($\alpha 2$, β et γ -globulines) dans les premiers jours de la maladie, l'augmentation de la pression oncotique entraînerait, par compensation, une diminution de la synthèse hépatique d'albumine. Ceci permettrait d'éviter l'apparition d'une hyperviscosité sanguine [63].

Dans notre étude, l'hypoalbuminémie est observée chez les trois chiens vers J10 après l'inoculation. Aucune analyse anatomopathologique n'a été réalisée à ce stade de la maladie, mais les observations microscopiques réalisées à l'autopsie montrent effectivement l'absence de lésion rénale en dehors d'une accumulation de protéines autour des glomérules rénaux ; ceci tend à suspecter l'existence d'une albuminurie bien qu'aucune analyse urinaire n'ait été réalisée au cours du suivi clinique. En revanche, aucune lésion hépatique n'était décelable à l'examen microscopique. Les seules infiltrations lymphoblastiques étaient observées au niveau des nœuds lymphatiques.

4.1.2.3.3 Hyperprotéinémie

L'hyperprotéinémie s'explique par l'augmentation des globulines. Cette hyperglobulinémie suggère une augmentation de la réponse immune. Cette réponse immune semble cependant inefficace puisqu'il n'existe aucune relation entre le taux de globulines sériques et les anticorps spécifiques [55].

L'augmentation des α 2-globulines, décrite dans la littérature, est la conséquence de la synthèse hépatique de protéines de l'inflammation. Paradoxalement, dans notre étude, on observe une nette augmentation des α 1-globulines à partir de J10, mais en parallèle, on observe plutôt une diminution du taux d' α 2-globulines. Ceci a d'ailleurs été décrit chez 69% (11 sur 16) de chiens infectés naturellement par *E. canis* [38].

La production précoce d'IgM et d'IgA explique la montée rapide des β-globulines [42].

La production de γ -globulines correspond à la production d'immunoglobulines G. Dans la littérature, il est dit que ces immunoglobulines ne présentent aucun pouvoir protecteur. Il n'y aurait d'ailleurs aucune corrélation entre le titre en anticorps anti-*Ehrlichia*

canis et l'hypergammaglobulinémie [42, 81, 99]. Or, dans notre étude, si on compare les courbes obtenues après titrage des anticorps par IFI et celles obtenues pour les γ-globulines par électrophorèse, on se rend compte que, pour des chiens B et C, ces courbes évoluent de manière sensiblement identique. Cette observation tendrait à réfuter l'hypothèse habituellement avancée et à montrer l'existence d'une relation entre la production d'anticorps et l'hyperglobulinémie. Ceci ne suffit cependant pas à montrer l'efficacité de ces anticorps.

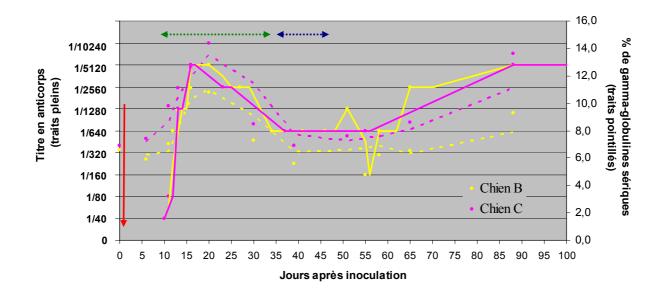


Figure 33 : Evolution du titre en anticorps et du taux de gamma-globulines sériques

Il semblerait que les chiens pancytopéniques aient des concentrations totales en protéines plus faibles que les chiens non pancytopéniques. Ceci suggère que l'état immunitaire des chiens ehrlichiens pancytopéniques est plus compromis, et que ces chiens sont par conséquent plus sensibles aux infections secondaires [97].

4.1.2.3.4 Production de protéine C réactive

La protéine C-réactive (CRP) est une protéine de la phase aiguë. Elle est secrétée par le foie en conséquence des dommages causés, sur les tissus, par une infection, une inflammation ou un traumatisme. En médecine humaine, des mesures quantitatives de CRP sont de plus en plus utilisées pour établir un diagnostic rapide de maladies infectieuses graves comme les sepsis, les méningites et les pneumonies [61, 69]. Les mesures quantitatives ont également été utilisées pour détecter les phénomènes inflammatoires qui n'auraient pas pu

être mis en évidence autrement, et pour suivre la progression de la réponse à un traitement antibactérien. La concentration en CRP décroît rapidement à la suite d'une thérapie [86].

Le suivi de la protéine C réactive (CRP) a été réalisée par RIKIHISA *et al.* en 1994. Elle a pu montrer une augmentation de CRP 4 à 6 jours post-inoculation [84]. L'augmentation de ce paramètre signe la présence d'une réponse inflammatoire. L'optimum du pic de CRP est observé entre J15 et J42 post-inoculation, ce qui serait concomitant à une multiplication intense de la bactérie (révélée par PCR) dans l'organisme [88]. Cette concentration est revenue à la valeur initiale après 34 jours.

Dans notre étude, le recours à un laboratoire d'analyses médicales humaines n'a pas permis de doser les concentrations en CRP dans les échantillons prélevés.

4.1.2.4 Lésions anatomo-pathologiques

Les autopsies menées sur les trois chiens A, B et C n'ont pas mis en évidence de lésions macroscopiques. Cette absence de lésion est certainement à corréler avec la mise en place d'un protocole thérapeutique précoce.

Lors d'EMC sévère, plusieurs types de lésions sont observables. Macroscopiquement, les lésions principales sont une splénomégalie avec une décoloration de la rate, 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 [55].

L'étude histopathologique des nœuds lymphatiques permet de réveler une légère hyperplasie folliculaire avec présence de macrophages. Parfois, la zone folliculaire et la corticale deviennent indiscernables. Un grand nombre d'histiocytes est observé en zone médullaire. Dans la rate, les lésions majeures observables sont des hémorragies folliculaires multifocales et une congestion de la pulpe blanche. Il est également possible de noter une augmentation des gaines lymphoïdes périartériolaires. L'étude histologique des reins permet de mettre ne évidence des lésions de glomérulonéphrite et de vasculite caractérisée par une

infiltration de cellules mononuclées. Des infiltrations de cellules mononuclées dans les septa alvéolaires sont visibles dans les poumons des animaux infectés [9].

4.2 Efficacité du traitement à la doxycycline

4.2.1 Evaluation de l'efficacité

Selon un consensus établit par l'*American College of Veterinary Internal Medicine* (ACVIM), le traitement le plus efficace pour lutter contre l'ehrlichiose monocytaire canine est l'emploi de doxycycline à 10 mg/kg/jour, *per os*, pendant 28 jours [71]. Ce protocole est considéré comme le traitement de choix par une majorité d'auteurs [7, 18, 71, 80, 95]. En effet, la résolution des signes cliniques et la normalisation de la numération plaquettaire sont effectives dans les 24 à 72 heures suivant la mise en place du traitement lors de cas d'ehrlichiose aiguë ou subchronique [80, 97]. Dans notre étude nous n'avons utilisé cette molécule que pendant 21 jours à la posologie de 10 mg/kg deux fois par jour. En 48 heures, les signes cliniques ont effectivement disparu.

4.2.2 Persistance d'anomalies après traitement

Cependant, 20 à 25 jours après la mise en place du traitement, on a pu observer un nouvel épisode thrombopénique, résolu en 72 heures, par la mise en place d'un second traitement à base de doxycycline à 20 mg/kg/j pendant 10 jours pour le chien A, et résolu naturellement en deux jours pour les chiens B et C. Cette observation pose la question de l'efficacité bactéricide du traitement mis en place ou de la survenue d'un phénomène biologique indépendant du traitement.

Même si on observe de rapides améliorations cliniques avec le traitement, certaines études ont montré que la numération plaquettaire pouvait chuter à nouveau après le traitement à la doxycycline, que le titre en anticorps pouvait augmenter à nouveau et que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pouvaient donner des résultats positifs [80]. Deux études de HARRUS *et al.* ont mis en évidence, la persistance d'ADN bactérien dans l'organisme : l'une de ces études a été menées après 6 semaines de traitement à la doxycycline administrée *per os,* à la posologie de 10 mg/kg/jour et a montré qu'un chien (de race Beagle) sur six était encore positif au test PCR après le traitement [40]. Une autre étude a été menée 34 mois après l'infection expérimentale de 6 chiens (de race Beagle) et a montré que même cliniquement sain, ou cliniquement guéri, un chien peut être porteur d'ADN d'*E. canis* [41].

Tenant compte des résultats de ces études, l'ACVIM a estimé qu'il est possible que de l'ADN d'*Ehrlichia canis* persiste dans l'organisme bien que l'agent pathogène ne soit plus vivant, ce qui n'est donc pas représentatif d'une infection persistante. Selon ces experts, les chiens traités ont éliminé le microorganisme dès lors que l'hyperglobulinémie et les autres signes cliniques et biologiques sont progressivement résolus, même si une séropositivité réapparaît après le traitement [71].

4.2.3 Persistance ou élimination des bactéries

Dans notre étude, aucun test PCR n'a pu être pratiqué. En revanche, les signes cliniques ont progressivement disparus tout comme les signes hématologiques, malgré un deuxième épisode pancytopénique en fin de traitement. Une hyperglobulinémie a été détectée vers J16 chez les chiens A et B, et J20 pour le chien C. On observait alors un pic de β et γ-globulines, résolu après le traitement. A l'acmé de la maladie, les trois chiens étaient séropositifs, mais le titre en anticorps a rapidement chuté après le traitement, au moins pour les chiens B et C. Pour ces deux chiens, la séropositivité est réapparue après la fin du traitement, et le jour des autopsies le chien C était positif au 1/5120ème. Selon la conférence de consensus, cela ne signifie pas que les chiens soient encore porteurs du microorganisme [71]. En effet, même si certains chiens semblent avoir éliminé *E. canis* du sang périphérique, leur titre en anticorps n'est pas significativement différent des chiens encore porteurs du microorganisme [50]. Les anticorps produits lors de l'infection par *E. canis* ne joueraient donc aucun rôle dans l'élimination de l'agent infectieux.

Cependant, l'étude des courbes de β et γ -globulines montre une croissance progressive du taux de ces globulines, depuis J60 jusqu'à l'euthanasie des animaux. Le jour de l'autopsie, les valeurs en γ -globuline sont d'ailleurs proches de ce qu'elles étaient à J16 ou J20. Ces faits vont à l'encontre de l'hypothèse de non persistance des bactéries dans l'organisme. On peut donc penser, même sans confirmation par PCR, que les bactéries persistaient chez les trois chiens.

4.3 Diagnostic sérologique

4.3.1 Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte est la méthode de référence pour le diagnostic de l'ehrlichiose monocytaire canine, compte tenu de sa grande sensibilité et de sa bonne spécificité [63, 71].

La précision du résultat de ce test diagnostic dépend du lecteur et nécessite un équipement de laboratoire important [63].

La comparaison des différentes études expérimentales est rendue difficile puisque les seuils de positivité ne sont pas définis de la même façon d'un laboratoire à l'autre. Le titre en anticorps le plus approprié, pour affirmer la séropositivité d'un animal, n'est donc toujours pas fixé. En conséquence, la conférence de consensus propose de considérer suspect tout titre en anticorps inférieur à 1/80^{ème} et de renouveler le test deux à trois semaines plus tard lors de suspicion d'infection naturelle [71]. Dans notre étude, nous avons défini le seuil de séropositivité au 1/40^{ème}, seuil fréquemment rencontré dans la littérature.

L'IFI permet de détecter des anticorps dès le septième jour après l'infection, mais certains chiens ne se séropositivent qu'à J28. D'autres ne développent pas de réponse anticorps lors de la phase aiguë de la maladie [71]. Dans notre étude, nous avons choisi de suivre la cinétique de la réponse anticorps à partir de J10 après l'inoculation de manière à comparer cette cinétique aux symptômes observés. On a ainsi pu observer que le pic d'hyperthermie intervient avant le pic de la réponse anticorps et que le traitement à la doxycycline n'a pas d'influence sur la séropositivité.

4.3.2 Test rapide de dosage immuno-enzymatique

Le test rapide utilisé lors de notre étude est un test dont l'avantage est de fournir une réponse plus rapide et plus facilement lisible que l'IFI. Ce test utilise deux protéines recombinantes p30 et p30-1 comme base antigénique [63].

Les résultats obtenus étaient différents de ceux obtenus par IFI. Un résultat positif n'a pas été obtenu tant que l'IFI était inférieure à 1/1280^{ème}. Par ailleurs, on ne pouvait détecter avec certitude les anticorps sériques que vingt jours après l'inoculation. L'IFI a donc donné,

dans notre étude, des résultats beaucoup plus sensibles que le test rapide. O'CONNOR *et al.* a montré l'existence d'une corrélation entre les résultats obtenus par IFI, Western blot et test rapide ELISA. Seules quelques différences étaient observables lorsque les titres en anticorps étaient compris entre 1/80 et 1/160 [76].

On peut expliquer les résultats de notre étude par le manque de spécificité entre les protéines recombinantes p30 et p30-1 du test avec les anticorps produits en réponse à une infection par la souche Borgo 89. Cela sous-entendrait que les protéines d'enveloppes de la souche d'*E. canis* Borgo 89 sont différentes de celles habituellement rencontrées. La mise en œuvre du séquençage ou d'un test Western Blot permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

4.3.3 Western blot

4.3.3.1 Intérêt du test

Ce test consiste en une électrophorèse des peptides obtenus après dénaturation des antigènes d'un agent infectieux. Cette technique permet une analyse plus fine de la réponse immunitaire de l'hôte et est au moins aussi précise que l'IFI [63].

4.3.3.2 Mise en évidence de la variabilité antigénique des souches d'*E. canis*

Le Western blot permet de mettre en évidence des variations mineures entre les différentes souches, au sein d'une même espèce. Ce test a déjà permis de mettre en évidence une relative homogénéité des souches impliquées dans des ehrlichioses chroniques en Arizona, en France, en Israël, en Caroline du Nord, au Texas et aux Iles Vierges [49]. Au contraire, une protéine majeure unique a été observée sur des sérums canins provenant d'Italie et du Zimbabwe [49].

Un test Western blot a déjà été effectué sur des chiens militaires stationnés en Afrique. L'étude n'a pas révélé de différence significative avec la souche Borgo 89 (cf. Figure 34) [78].

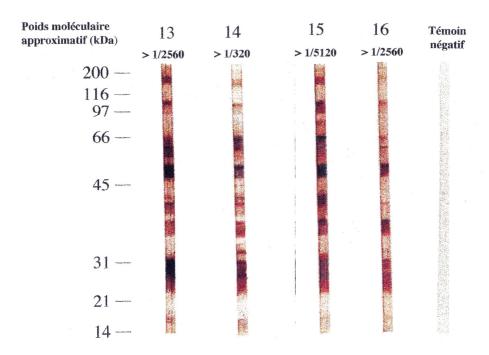


Figure 34 : Western blots de chiens séropositifs (IFI) vis-à-vis d'*Ehrlichia canis* et séjournant en Corse [78]

4.4 Réponse immunitaire

4.4.1 Réponse humorale

Chez des chiens infectés expérimentalement, les immunoglobulines IgA et les IgM apparaissent dès le $7^{\text{ème}}$ jour après l'infection. D'autres travaux mettent en évidence une réponse IgM dès le $4^{\text{ème}}$ jour après une infection par *E. ruminantium* [72].

A partir du 10^{ème} jour, on peut détecter les IgG dont la quantité est maximale vers le 80^{ème} jour [22, 26, 30]. Dans notre étude, le titre maximal en anticorps est atteint dès le 20^{ème} jour après l'inoculation.

Les anticorps des chiens traités diminuent et disparaissent 6 à 12 mois après la guérison [13].

Des études ont permis d'identifier plus précisément les IgG impliquées dans la réponse humorale. Il s'agit d'IgG2, spécifiques d'*E. canis*, détectées une semaine après l'inoculation chez des chiens infectés expérimentalement ou naturellement [46, 66, 92]. En effet, les IgG de type 1, détectable lors de l'infection par *E. canis* ne sont pas produites de manière significativement plus importante que chez le chien sain [92].

Par ailleurs, d'après une étude de McBRIDE *et al.*, la réponse IgM à l'infection par *E. canis* n'a pas pu être mise en évidence après 14 jours d'incubation sur la plupart des chiens inoculés [66]. La première détection d'IgM a été réalisée par ELISA au 28^{ème} jour après infection. Ces données ont été confirmées par Western blot.

Certains auteurs attestent que les anticorps produits n'assurent aucune fonction protectrice, puisque des chiens séropositifs sont sensibles à la réinfection [30, 54]. Ces anticorps pourraient même favoriser la multiplication de l'agent chez l'hôte en participant à l'inhibition de la fusion phagolysosomiale [43].

Toutefois, *in vitro*, il a été démontré qu'un sérum immun inhibe la croissance d'*E. canis* dans les macrophages canins [58]. Par ailleurs, une infection de souris SCID par *E. chaffeensis* a permis de mettre en évidence le rôle majeur des anticorps lors d'infections par *Ehrlichia* [46].

4.4.2 Réponse cellulaire

4.4.2.1 Rôle des lymphocytes T dans la réponse immunitaire à l'infection par E. canis

Des études menées sur l'infection par *E. chaffeensis* et *E. muris* sur des souris montrent que les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ constituent le composant critique de la réponse à médiation cellulaire en assurant la clearance des bactéries et la résistance aux infections létales pour les animaux témoins [35, 101].

HESS *et al.* n'ont pas mis en évidence de variation de la réponse TCD4+ lors de l'infection expérimentale par *E. canis*. En revanche, six semaines après l'inoculation, les chiens infectés ont développé une lymphocytose à TCD8+. Cette lymphocytose a régressé quatre semaines plus tard.

Dans notre étude, il semble y avoir une augmentation de la population des CD8+ jusqu'à 10 jours après le pic d'hyperthermie, notamment pour les chiens B et C (deuxième passage sur chien), alors que la population de CD4+ évolue à l'inverse. Vers J25, on observe une inversion des courbes c'est-à-dire une diminution des CD8+ et une augmentation des

CD4+. De J40 à l'euthanasie des animaux, on remarque à nouveau une inversion des courbes. La diminution de la population des CD8+ est accompagnée d'une rechute clinique. Or les CD8+ produisent le TNFα qui participe au contrôle de la charge bactérienne [53]. On peut donc penser que la rechute clinique est liée à une prolifération bactérienne induite par une baisse de la production de TNFα. D'autre part, l'association d'une augmentation des CD8+ et d'une diminution de CD4+ (phénomène observé quelques jours avant la rechute clinique) traduirait une dysimmunité et empêcherait l'élimination de la bactérie [52].

A titre de comparaison, chez des chiens leishmaniens, au cours de la maladie, le nombre de CD4+ circulants diminue [10]. Cette décroissance, ainsi que la diminution du rapport CD4+/CD8+ est clairement associée aux signes cliniques. Au cours du traitement, on observe une augmentation significative du nombre de lymphocytes CD4+ circulants [68].

Lors d'EMC, l'augmentation du nombre de CD4+ survient 10 à 12 jours après la mise en place du traitement. L'ajout d'un immunomodulateur ne semble pas influer sur cette cinétique.

En conséquence, le dénombrement des CD4+ et le suivi du rapport CD4+/CD8+ semblent être de bons indicateurs du pronostic de la maladie [36].

4.4.2.1.1 Interactions cellulaires et moléculaires lors de la réponse immunitaire à médiation cellulaire

Ces interactions sont résumées dans la figure 35 :

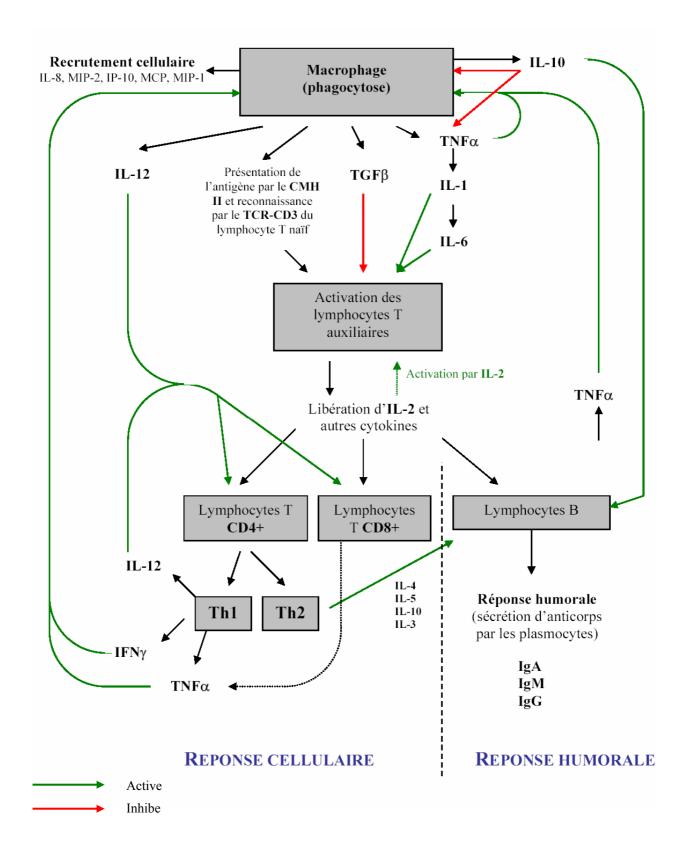


Figure 35 : Schéma des interactions cellulaires et moléculaires au cours de la réponse immunitaire lors d'infection par *Ehrlichia canis*

4.4.2.1.2 Cinétiques d'apparition des médiateurs solubles lors d'EMC aiguë

Lors d'infection par *Ehrlichia* spp., il a été montré que l'IL-8 est la chimiokine inflammatoire la plus précocement produite, et en grande quantité [65, 83, 93]. En effet, lors d'infection par *E. chaffeensis*, l'IL-8 est détectée dès 18 heures après l'inoculation [65].

De même, il semble que l'IL-1b intervienne rapidement lors d'ehrlichiose, mais en plus ou moins grande quantité, bien que McBRIDE *et al.* ne l'ait pas observée lors de l'infection expérimentale du chien par *E. chaffeensis* [65, 83, 92, 93].

A contrario, les interleukines IL-2 et IL-6 apparaissent plus tardivement et en quantité très faible [65, 83, 92, 93]. L'IL-4 semble avoir une cinétique d'apparition identique [92].

Selon McBRIDE *et al.*, la production d'IL-10 n'est jamais induite *in vitro* par *E. chaffeensis* [65].

L'IFN γ et le TNF α ne sont pas systématiquement détectés lors d'inoculation expérimentale par *Ehrlichia* spp. [93]. Lorsqu'ils le sont, il semble qu'ils soient produits plus tardivement que les interleukines IL-8 et IL-1 β [83]. Leur production débute dès J2 après l'inoculation et se poursuit au moins jusque J56 [92]. Dans notre étude, nous n'avons recherché l'IFN γ qu'à partir de J13, au pic d'hyperthermie.

4.4.2.2 Rôle de l'IFNγ, du TNFα et de l'IL-10

4.4.2.2.1 Selon les voies d'inoculation

Selon la voie d'inoculation, la production des différents médiateurs cellulaires solubles n'est pas la même. En effet, l'étude d'un modèle murin d'infection par *Ehrlichia* montre que lors d'inoculation par voie intradermique, on observe une forte production d'IFNγ par les lymphocytes Th1 CD4+ dans la rate, alors que par voie intrapéritonéale, la réponse cellulaire est beaucoup plus faible et est suivie d'une forte production de TNFα et d'IL-10, incapable de diminuer la production de TNFα comme cela est observé lors d'infection par des bactéries possédant un LPS (lipopolysaccharide). L'inoculation par voie intrapéritonéale induit en outre

des symptômes cliniques et une nécrose hépatique beaucoup plus importants que l'inoculation par voie intradermique. Le TNF α et l'IL-10 semble donc jouer un rôle dans la pathogénie d'une ehrlichiose sévère [90].

4.4.2.2.2 Sévérité des symptômes et quantité de TNF α produit par les CD8+

De même, une étude de laboratoire menée sur des souris a montré que la sévérité des symptômes au cours de l'ehrlichiose est liée à la quantité de TNF α produit par les CD8+ [53]. En effet, les souris ne possédant pas de récepteurs au TNF α sont plus résistantes à une inoculation par voie intraveineuse d'une forte dose d'une souche très virulente d'*Ehrlichia* spp. Chez ces souris, on observe une augmentation rapide de la production d'IL-10, et une production plus importante d'IFN γ que chez les souris témoins. Le TNF α et ses récepteurs participent donc à la sévérité des lésions tissulaires, au contrôle de la charge bactérienne, et à la régulation des facteurs anti-inflammatoires tels que l'IFN γ [53].

Une seconde étude confirme le rôle aggravant du TNFα contrairement à l'IFNγ et à l'IL-10 lors d'infection expérimentale par *Ehrlichia* spp. [100].

L'augmentation des lymphocytes T CD8+, responsables de la production de TNF α , est donc liée à l'apparition des symptômes et des lésions observées notamment au niveau du foie.

L'IFN γ stimule la production d'anticorps en mettant au repos ou en activant les lymphocytes B. Il est capable de stimuler la production de TNF α et de TGF β . Au contraire, les IFN α et β inhibent la sécrétion des principales cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF α et IL-8) et stimulent la sécrétion de deux cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF β) [4].

L'IFN γ et le TNF α exercent également un effet anti-bactérien en induisant la synthèse de monoxyde d'azote (NO) [34].

4.4.2.3 Rôle du traitement immunomodulateur

Le Glisodin® augmente les activités des enzymes SOD, catalase et Gpx circulantes. Il augmente également la production spécifique de lymphocytes T helpers de type 1 (Th1) ainsi que l'expression de l'INFγ et de l'IL-4, et stimule la réponse en IgG. En revanche, la production d'IgE (allergiques) reste marginale et la production d'IgA n'est pas modifiée, ce qui renforce l'hypothèse d'une action immunomodulatrice de Glisodin®. Cette action pourrait résulter d'une activation des cellules de présentation de l'antigène (CPA) par la combinaison gliadine-SOD. Cette activation entraînerait une libération d'oxyde nitrique (NO) et de H2O2, qui entraînerait à son tour une activation de la catalase et de la Gpx, suivie d'une activation de l'expression des cytokines INFγ et IL-4. La réponse immunitaire serait alors polarisée par les CPA activées vers une réponse de type Th1 [67].

En conséquence, le chien C aurait donc du produire une réponse immune cellulaire plus importante, et une réponse immune à médiation humorale plus précoce que les chiens A et B, mais ceci n'a pas été vérifié lors de notre étude. En revanche, les résultats du Spot test confirment l'augmentation de production de l'IFNγ chez le chien C (cf. Figure 30).

4.5 Echappement d'Ehrlichia canis à la réponse immune de l'hôte

4.5.1 Facilitation du développement intracellulaire

Les monocytes/macrophages sont capables de reconnaître certaines protéines de la membrane bactérienne, tels que le lipopolysaccharide (LPS) ou les peptidoglycanes, et sont ainsi susceptibles, par un phénomène de réponse immune innée, d'éliminer les microorganismes envahissants [83]. *A. phagocytophilum* et *E. chaffeensis* ont perdus tous les gènes requis pour la synthèse du LPS, et la plupart des gènes nécessaires à la biosynthèse des peptidoglycanes [59].

Cette évolution permet à ces bactéries de pénétrer plus facilement à l'intérieur des cellules cibles, sans être reconnues. *E. canis* possède ces mêmes caractéristiques [64].

Une fois à l'intérieur des cellules hôtes, *E. chaffeensis* et *A. phagocytophilum* modifient activement les protéines de l'hôte nécessaires à leur réplication. Elles peuvent également moduler le trafic vésiculaire de la cellule hôte et ainsi échapper à la fusion

lysosomiale [70, 82]. Ceci est particulièrement important pour ces bactéries qui se développent exclusivement dans des cellules contenant de nombreux lysosomes.

4.5.2 Dépendance vis-à-vis du fer

Des études ont montré que les *Ehrlichiae* ont accès à un pool de fer cytoplasmique sans toutefois produire de sidérophores à forte affinité pour le fer intracellulaire [3].

Les *Ehrlichiae*, telles que *E. chaffeensis*, accumulent des récepteurs à la transferrine (TfRs) [70]. Ces récepteurs ne sont pas présents au moment de l'entrée des bactéries dans les cellules, mais sont progressivement détournés et accumulés au niveau des corps d'inclusion jusqu'à ce que la plupart des TfRs cytoplasmiques soient localisés à cet endroit [59, 82]. En effet, trois heures après l'infection, on ne retrouve pas de TfRs dans la plupart des corps d'inclusion, mais six heures après l'infection, toutes les inclusions possèdent des TfRs dont le nombre augmente pendant les trois premiers jours. Cette accumulation sélective des TfRs au niveau des inclusions est due à une augmentation de l'expression de leur ARNm par les bactéries [3].

L'entrée des *Ehrlichiae* dans la cellule cible, leur prolifération et la production de protéines spécifiques, nécessitent l'augmentation de l'expression de l'ARNm des TfRs de la cellule hôte [3].

4.5.3 Diminution de l'activation et de la différenciation leucocytaire

E. chaffeensis active la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 et l'IL-1b, et entraîne une augmentation retardée de l'expression des gènes du TNF α , de l'IL1 β et de l'IL-6 dans les neutrophiles infectés [83].

Par ailleurs, l'infection par E. chaffeensis provoque une diminution de l'activité du facteur de transcription spécifique du système hématopoïétique (PU.1) qui agit spécifiquement pour la différenciation des promyélocytes en neutrophiles et monocytes [60]. L'induction de la différenciation des cellules myéloïdes immatures vers la voie monocytaire est stimulée par l'IFN γ seul ou associé au TNF α [4].

Les *Ehrlichiae* semblent donc capables d'empêcher ou de retarder la signalisation cruciale des voies d'activation et de différenciation des phagocytes de l'hôte [83].

4.5.4 Echappement au rôle protecteur de l'IFNy : la réduction du pool ferreux des macrophages

L'IFNγ a un rôle protecteur lors d'infection par *Ehrlichia* spp. chez la souris [52].

En médecine humaine, un traitement à bas d'IFNγ permet de réduire considérablement le pool ferreux disponible dans les monocytes en diminuant le nombre de TfRs de surface. Ceci permet une inhibition d'*E. chaffeensis* [3]. Ce traitement est efficace si l'IFNγ est administré avant ou au tout début de l'infection, mais si celui-ci est administré après l'établissement de l'infection, le traitement devient inefficace [3]. Or, après six heures, toutes les inclusions intracellulaires sont dotées de TfRs et sont capables de spolier le fer cellulaire (cf. 4.5.2).

E. chaffeensis et A. phagocytophilum sont capables de stabiliser les récepteurs à la transferrine par un facteur de réponse au fer, de manière à contrer l'effet de l'IFNγ [83].

4.5.5 Inhibition de l'apoptose cellulaire

L'apoptose est un mécanisme important pour la destruction des organismes pathogènes intracellulaires [83].

A. phagocytophilum est capable d'inhiber l'apoptose des neutrophiles humains, ce qui lui laisse le temps de se multiplier et de former des *morulae* [102]. Ce phénomène est induit par l'inhibition de l'expression de la famille de gène anti-apoptose de la cellule [39].

Les agents granulocytaires et monocytaires inhibent l'apoptose de leurs cellules hôtes respectives pour prolonger leur survie et celle de la cellule hôte [83].

4.5.6 Modification de l'expression des récepteurs du CMH

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sont des glycoprotéines membranaires capables de présenter des antigènes aux cellules T. Les récepteurs du CMH I sont présents sur toutes les cellules nucléées et interagissent avec les CD8+ (lymphocytes T cytotoxiques). Les récepteurs du CMH II se trouvent sur les cellules du système immunitaire (lymphocytes B, macrophages, cellules dendritiques) mais peuvent être exprimés par d'autres types de cellules (cellules épithéliales ou endothéliales) dans les lésions inflammatoires [31]. Contrairement à l'homme et à la souris, les récepteurs du CMH II sont présents sur presque tous les lymphocytes canins [33].

Les molécules du CMH II interagissent avec les Th1 et Th2 et sont reconnus comme des molécules de transduction du signal qui régulent les fonctions des macrophages [31].

Une étude menée par HARRUS *et al.*, *in vitro*, sur des cellules DH82 infectées par *E. canis*, a montré une diminution importante des récepteurs du CMH II ce qui suggère que la présentation des antigènes d'*E. canis* aux cellules CD4+ est compromise. Une plus faible diminution des récepteurs du CMH I a été observée ce qui montre que la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques est également affectée mais de façon moindre [47].

Au contraire, l'IFNγ est capable d'induire une augmentation de l'expression du CMH II dans les monocytes/macrophages [85].

En conclusion, ces données suggèrent l'existence de nombreux mécanismes de survie, de persistance et d'évasion d'*E. canis* au système immunitaire.

4.5.7 Comparaison avec le mode d'échappement de *Leishmania* spp. : le rôle du TGFβ et de l'IL-10

Leishmania spp. a la grande capacité d'inactiver sa cellule hôte, le macrophage. Une des façons que le parasite utilise pour y parvenir est l'induction de molécules immunosuppressives telles le TGFβ, l'IL-10 et les métabolites de l'acide arachidonique.

La production du TGF β est induite par plusieurs espèces de parasite *in vitro* (chez les macrophages) et *in vivo* [8].

Cette cytokine semble inhiber l'action microbicide du macrophage et probablement la production d'IFNγ par les cellules NK.

L'IL-10, une autre cytokine anti-inflammatoire, est aussi produite par les macrophages infectés par *Leishmania* spp. *in vitro*. Cette production serait responsable de la suppression de l'activité microbicide du macrophage, de la production de cytokines (IL-1, IL-12, TNF) et de l'expression de molécules de co-stimulation (B7.1/2) [19]. La liaison du parasite au récepteur de la portion Fc des immunoglobulines G pourrait causer cette induction [91]. L'IL-10 semble essentielle à la survie des parasites chez la souris. En effet, des souris transgéniques dont les cellules présentatrices d'antigènes surexprimaient l'IL-10 étaient incapables de contrôler l'infection par *Leishmania* spp. [56].

Leishmania spp. est responsable de l'inhibition de plusieurs fonctions du macrophage dépendantes de l'IFNγ de même que de plusieurs voies de signalisation dépendantes de la phosphorylation de résidus tyrosines [37].

Il s'avère donc que la comparaison des modes d'échappement mis en œuvre par *Leishmania* spp. et *Ehrlichia* spp. pourrait permettre d'émettre de nouvelles hypothèses quant à la survie d'*E. canis* dans les monocytes canins.

CONCLUSION

La pathogénicité d'*Ehrlichia canis*, agent de l'ehrlichiose monocytaire canine, reste encore mal définie. Les études récentes, mettant en application les nouvelles techniques de la biologie moléculaire et de l'immunologie, permettent de préciser certaines hypothèses et ouvrent la voie à de nouvelles investigations.

Notre étude avait pour objectifs de confirmer la pathogénicité de la souche Borgo 89 d'*Ehrlichia canis*, d'étudier certains aspects de la réponse immunitaire induite par l'infection, et enfin d'évaluer l'efficacité de la mise en place d'un traitement à visée immunomodulatrice associé au traitement habituel à base de doxycycline.

Quatre passages successifs sur chiens confirment la pathogénicité de la souche étudiée. En effet, tous les chiens ont développé une ehrlichiose aiguë, en moyenne douze jours après l'inoculation, associée à une réponse anticorps dont l'optimum était atteint 15 à 20 jours après l'inoculation

L'efficacité du traitement à base de doxycycline, complété ou non de l'adjonction d'un anti-oxydant (superoxyde dismutase), est restée très difficile à évaluer en raison du faible nombre d'animaux traités. Aucune différence significative dans le développement de la maladie et dans la phase de guérison clinique n'a été observée. La poursuite de cette étude sur un nombre plus important de chiens pourrait permettre d'obtenir des informations complémentaires. Par ailleurs, il pourrait être intéressant d'évaluer le rôle de l'immunomodulateur sur des chiens non traités à la doxycycline et susceptibles de développer une ehrlichiose chronique.

Enfin, une production d'IFN γ a été mise en évidence dès le onzième jour post-inoculation. Ce résultat confirme l'existence d'une réponse immune de type Th1 qui intervient très tôt dans la maladie.

Au cours de ce travail, la pathogénie de la thrombopénie a également été abordée. Les recherches d'anticorps anti-plaquettes réalisées sur plusieurs échantillons des trois premiers chiens ont permis de confirmer l'existence d'un phénomène immunologique dans la destruction plaquettaire dès le dixième jour post-inoculation.

Le Professeur responsable de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon Lyon Vu : Le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de

Luc CHABANNE Doeteur Véterinaire

Le Président de la thèse

Pour le Directeur empêché Le Directeur adjoint

Pr Gilles HOUR DOISEAU

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 2 5 SEP. 2006

Le Président du Comité de Coord

Pour Le Président de l'Université
Le Président du Comité de Coordination

Des Etudes Médicales Professeur F.N GILLY

BIBLIOGRAPHIE

[1] ASAI T., STORKUS W.J., WHITESIDE T.L. (2000)

Evaluation of the modified ELISPOT assay for gamma interferon production in cancer patients receiving antitumo vaccines.

Clin. Diag. Lab. Immunol., 7, 2, 145-154.

[2] BARIC RAFAJ R. (2005)

Nombre de plaquettes et volume moyen plaquettaire dans la babésiose du chien. *Rev. Med. Vet.*, **156**, 2, 95-98.

[3] BARNEWALL R.E., RIKIHISA Y. (1994)

Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron transferrin. *Infect. Immun.*, **62**, 4804-4810.

[4] BAUVOIS B., WIETZERBIN J. (2002)

Interférons : propriétés biologiques et applications cliniques.

In: Virbac santé animale, Les interférons en thérapeutique canine et féline., 67

[5] BEAUFILS J.P., MARTIN-GRANEL J., JUMELLE P. (1995)

Diagnostic cytologique des ehrlichioses canines. Prat. Med. Chir. Anim. Comp., 30, 189-195.

[6] BELLACH J.R., SHULL R.M., SELCER E.V.S. (1992)

Ehrlichia canis related polyarthritis in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 27, 8, 922-923.

[7] **BOCKINO L.**, *An overview of canine ehrlichiosis*. 2003. www.vet.uga.edu/vpp/clerk/Bockino

[8] **BODGAN C. R.M.** (1998)

The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Intern. J. Exp. Med.*, **191**, 121-134.

[9] BOTELHO DE CASTRO M., MACHADO R.Z., DE AQUINO L.P., ALESSI A.C., COSTA M.T. (2004)

Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis : clinicopathological and immunopathological findings.

Vet. Parasitol., 119, 73-86.

[10] BOURDOISEAU G., BONNEFONT C., MAGNOL J.P., SAINT-ANDRE I, CHABANNE L. (1997)

Lymphocytes subset abnormalities in canine leishmaniasis.

Vet. Immunol. Immunopathol., 56, 345-351.

[11] BRANDAO L.P., HASEGAWA M.Y., HAGIWARA M.K., KOHAYAGAWA A. (2006)

Platelet aggregation studies in acute experimental canine ehrlichiosis. *Vet. Clin. Pathol.*, *35*, *1*, 78-81.

[12] **BROSSEY B.** (2004)

Prophylactic therapy for vecto-borne and parasitic diseases. *In: New Letter of US Army Veterinary Service, Dec. 2004*,

[13] BUHLES W.C., HUXSOLL D.L., RISTIC M. (1974)

Tropical Canine pancytopenia: clinical, hematologic and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy and challenge inoculation. *J. Infect. Dis.*, *130*, *357-367*.

[14] BULLA C., KIOMI TAKAHIRA R., PESSOA ARAUJO J.Jr., APARECIDA TRINCA L., SOUZA LOPES R., WIEDMEYER C.E. (2004)

The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area.

Vet. Res., 35, 141-146.

[15] CHABANNE L., BONNEFONT C., BERNAUD J., RIGAL D. (2000)

Clinical applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to companion animals (dog and cat).

Meth. Cell Sci., 22, 199-207.

[16] CHABASSOL C., MICHEL C. (1972)

Syndrome hémorragique thrombotique thrombocytopénique du chien en Tunisie : comparaison avec la pancytopénie canine tropicale récemment décrite au Sud-Vietnam.

Bull. Soc. Med. Chir. Hôp. Form. Mil. Arm., 3, 189-195.

[17] CODNER E.C., ROBERTS R.E., AINSWORTH A.G. (1985)

Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis.

J. Am. Vet. Med. Assoc., 186, 2, 166-169.

[18] **COHN L.A.** (2003)

Ehrlichiosis and related infections.

Vet. Clin. Small Anim., 33, 863-884.

[19] **CUNNINGHAM A.C.** (2002)

Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*.

Exp. Mol. Pathol., 72, 132-141.

[20] DAGNONE A.S., DE MORAIS H.S., VIDOTTO M.C., JOJIMA F.S., VIDOTTO O. (2003)

Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil.

Vet. Parasitol., 117, 285-290.

DAVOUST B. (1993) [21]

L'ehrlichiose canine.

Point Vet., 25, 151, 43-51.

DAVOUST B. (1994) [22]

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. Med. Vet., 145, 4, 249-256.

DAVOUST B. (2001) [23]

Ehrlichiose monocytaire canine.

Prat. Med. Chir. Anim. Comp., 36, 553-564.

DAVOUST B., BROUQUI P., RAFFI A., RAOULT D. (1990) [24]

L'ehrlichiose canine dans les chenils militaires du Sud-Est : à propose de 14 cas. Point Vet., 21, 125, 63-67.

DAVOUST B., KEUNDJAN A., ROUS V., MAURIZI L., PARZY D. (2005) [25]

Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. Vet. Parasitol., 107, 279-283.

[26] DAVOUST B., MACKOWIAK M., MOREAU Y. (1986)

Ehrlichiose canine, enquête épidémiologique.

Rec. Med. Vet., 162, 4, 471-475.

DAVOUST B., MARIE J.L., MERCIER S., BONI M., VANDEWEGHE A., [27] PARZY D., BEUGNET F. (2003)

Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. Vet. Parasitol., 112, 91-100.

DAVOUST B., PARZY D. (1991) [28]

Ehrlichiose canine chronique : Intérêt de la numération plaquettaire.

Rev. Med. Vet., 142, 4, 287-292.

[29] DAVOUST B., PARZY D., PUBERT D. (1996)

Signes hématologiques de l'ehrlichiose canine aiguë.

Rec. Med. Vet., 147, 1, 69-74.

DAVOUST B., PARZY D., VIDOR E., HASSELOT N., MARTET G. (1991) [30]

Ehrlichiose canine expérimentale. Etude clinique et thérapeutique.

Rec. Med. Vet., 33-40.

[31] **DAY M.J.** (1999)

The major histocompatibility complex.

In: DAY MJ. (Ed). Clinical immunology of the dog and cat, Manson publishing, London, 32-33

[32] **DONATIEN A., LESTOQUARD F.** (1935)

Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien.

Bull. Soc. Path. Exot., 28, 418-419.

[33] DOXIADIS I. K.K., REIN R., NEEFJES J.J., DOXIADIS G., SCHOEN W., PLOEGH H.L., GROSSE-WILDE H. (1986)

Canine MHC biochemical definition of class I, class II and class III determinants, similarities and differencies to the human and murine systems. *Immunobiol.*, 173, 264-265.

[34] FENG H.M., WALKER D.H. (1993)

Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha exert their antirickettsial effect via induction of synthesis of nitric oxyde. *A. J. Pathol.*, *143*, *1016-1023*.

[35] FENG H.M., WALKER D.H. (2004)

Mechanisms of immunity to *Ehrlichia muris*: a model of monocytotropic ehrlichiosis. *Infect. Immun.*, 72, 966-971.

[36] FERRER L. (2002)

Canine leishmaniosis: evaluation of the immunocompromised patient. 27th World Small Anim. Vet. Assoc., Grenade, Spain, 2 oct. 2002.

[37] **FORGET G.** (2004)

Etude des mécanismes de régulation négative utilisés par *Leishmania* pour contrer la réponse immune innée.

Thèse de doctorat en microbiologie-immunologie, Faculté de médecine de Laval.

[38] GAVAZZA A., BIZZETI M., PAPINI R. (2003)

Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Rev. Med. Vet.*, **154**, 8-9, 565-571.

[39] GE Y. Y.K., LIM M., RIKIHISA Y. (2005)

Anaplasma phagocytophilum inhibits human neutrophil apoptosis via upregulation of bfl-1, maintenance of mitochondrial potential, and prevention of caspase 3 activation. *Cell. Microbiol.*, 7, 29-38.

[40] HARRUS S., WANER T., AIZENBERG I., BARK H. (1998)

Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 7, 2140-2142.

[41] HARRUS S., WANER T., AIZENBERG I., FOLEY J.E., POLAND AM., BARK H. (1998)

Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*.

J. Clin. Microbiol., 36, 1, 73-76.

[42] HARRUS S., WANER T., AVIDAR Y., BOGIN E., PEH H., BARK H. (1996)

Serum protein alterations in canine ehrlichiosis.

Vet. Parasitol., 66, 3-4, 241-249.

[43] HARRUS S., WANER T., BARK H., JONGEJAN F., CORNELISSEN A.W. (1999)

Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.*, *37*, *9*, *2745-2749*.

[44] HARRUS S., WANER T., ELDOR A., ZWANG E., BARK H. (1996) Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Res.*, 139, 12, 290-293.

[45] HARRUS S., WANER T., KEYSARY A., AROCH I., VOET H., BARK H. (1998) Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 62, 1, 15-27.

[46] HARRUS S., WANER T., STRAUSS-AYALI D., BARK H., JONGEJAN F., HECHT G., BANETH G. (2001)

Dynamics of IgG1 and IgG2 subclass response in dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.*, *99*, *1*, *63-71*.

[47] HARRUS S. W.T., FRIEDMANN-MORVINSKI D., FISHMAN Z., BARK H., HARMELIN A. (2003)

Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*.

Vet. Immunol. Immunopathol., 96, 239-243.

[48] HARRUS S. W.T., WEISS D.J., KEYSARY A., BARK H. (1996) Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. Vet. Immunol. Immunopathol., 51, 1-2, 13-20.

[49] HEGARTY B.C., LEVY M.G., GAGER R.F. (1997)

Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs : an international survey.

J. Vet. Diagn. Invest., 9, 32-38.

[50] HESS P.R. E.R.V., HEGARTY B.C., BROWN G.D., BREITSCHWERDT E.B. (2004)

Experimental *ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.*,

[51] HONGO I., BLOCH K.C. (2006)

Ehrlichia infection of the central nervous system.

Curr. Treat. Op. Neurol., 8, 3, 179-184.

[52] ISMAIL N., SOONG L., McBRIDE J.W., VALBUENA G., OLANO J.P., FENG H.M., WALKER D.H. (2004)

Overproduction of TNF-a by CD8+ type 1 cells and down-regulation of IFN-g production by CD4+ Th1 cells contribute to toxic shock-like syndrome in an animal model of fatal monocytotropic ehrlichiosis.

J. Immunol., 172, 1786-1800.

[53] ISMAIL N., STEVENSON H.L., WALKER D.H. (2006)

Role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin-10 in the pathogenesis of severe murine monocytotropic ehrlichiosis: increased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to fatal ehrlichial infection. *Infect. Immun.*, 74, 3, 1846-1856.

[54] JOURET-GOURJAULT S., PARZY D., DAVOUST B. (2005)

Experimental infections in dogs with Ehrlichia canis strain Borgo 89. *Annal. Acad. N.Y. Sci., in press.*

[55] **JOURET S.** (2001)

L'ehrlichiose monocytaire canine : étude expérimentale d'une nouvelle souche d'*Ehrlichia canis*.

Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine de Créteil, Alfort, 141 pages.

[56] KANE M.M. M.D.M. (2000)

Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Cur. Op. Microbiol.*, *7*, *26-31*.

[57] LAKKAWAR A.W., NAIR M.G., VARSHNEY K.C., SREEKRISHNAN R., RAO V.N. (2003)

Pathology of canine monocytic ehrlichiosis in a german shepherd dog. *Slov. Vet. Res.*, 40, 2, 119-128.

[58] LEWIS G.E., RISTIC M., SMITH R.D. (1978)

Effect of canine immune serum on the growth of *Ehrlichia canis* within non immune canine macrophages.

Am. J. Vet. Res., 39, 1, 71-75.

[59] LIN M., RIKIHISA Y. (2003)

Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma phagocytophilum lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. Infect. Immun., 71, 5324-5331.

[60] LIN M., RIKIHISA Y. (2004)

Ehrlichia chaffeensis downregulates surface Toll-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors PU.1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF-kappa B, ERK 1/2 and p38 MAPK in host monocytes.

Cell. Microbiol., 6, 175-186,

[61] LINDBACK S., HELLGREN U., JULANDER I., HANSSON LO. (1989)

The value of C-reactive protein as a marker of bacterial infection in patients with septicemia/endocarditis and influenza.

Scand. J. Infect. Dis., 21, 5, 543-549.

[62] LOVERING S.L., PIERCE K.R., ADAMS L.G. (1980)

Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.*, 41, 8, 1266-1271.

[63] MARTIN C. (2004)

Les ehrlichioses du chien : étude bibliographique, diagnostic et comparaison de trois kits de diagnostic sérologique rapide de l'ehrlichiose monocytaire.

Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 179 pages.

[64] MAVROMATIS K., DOYLE C.K., LYKIDIS A., IVANOVA N., FRANCINO M.P., CHAIN P., SHIN M., MALFATTI S., LARIMER F., COPELAND A., DETTER J.C., LAND M., RICHARDSON P.M., YU X.J., WALKER D.H., McBRIDE J.W., KYRPRIDES N.C. (2006)

The genome of the obligatory intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *J. Bacteriol.*, **188**, 11, 4015-4023.

0. Bucter tot., 100, 11, 7010 7020.

[65] Mc BRIDE JW. Y.X., WALKER DH. (2000)

A conserve transcriptionally active p28 multigene locus of Ehrlichia canis. *Gene*, **254**, *1-2*, *245-252*.

[66] McBRIDE J.W., CORSTVET R.E., GAUND S.D., BOUDREAUX C., GUEDRY T., WALKER D.H. (2003)

Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect. Immun.*, 71, 5, 2516-2524.

[67] MENVIELLE-BOURG F.J. (2005)

La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale.

Phytoth., 3, 1-3.

[68] MORENO J.N., CHAMIZO C., GONZALES F., BLANCO F., BARKER D.C., ALVAR J. (1999)

The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy.

Vet. Immunol. Immunopathol., 71, 181-195.

[69] MORLEY J., KUSHNER I. (1982)

C-reactive protein levels in disease.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 329, 406-418.

[70] MOTT J., BARNEWALL R., RIKIHISA Y. (1999)

Human granulocytic ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells.

Infect. Immun., 67, 1368-1378.

[71] NEER T.M., BREITSCHWERDT E.B., GREENE R.T., LAPPIN M.R. (2002)

Consensus statement on ehrlichial of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM.

J. Vet. Intern. Med., 16, 309-315.

[72] NEITZ A.W., VILJOEN G.J., BEZUIDENHOUT J.D., OBEREM P.T., VISSER L., VERMEULEN N.M. (1986)

Detection of *Cowdria ruminantium* antigen and antibody during the course of heartwater disease in sheep by means of an enzyme-liked immunosorbent assay. *J. Vet. Res.*, *53*, 205-207.

[73] NORMAND T., CHABANNE L. (2005)

Technique de leucoconcentration chez le chien et le chat.

Nouv. Prat. Vet., 303, 35-36.

[74] NORTHERN J., TVEDTEN H.W. (1992)

diagnosis of microthrombocytosis and immune-mediated thrombocytopenia in dogs with thrombocytopenia.

J. Am. Vet. Med. Assoc., 200, 368-372.

[75] NYINDO M.B.A., RISTIC M., HUXOLL D.L., SMITH A.R. (1971)

Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent - Ehrlichia canis.

Am. J. Vet. Res., 32, 1651-1658.

[76] O'CONNOR T.P., HANSCOM J.L., HEGARTY B.C., GROAT R.G., BREITSCHWERDT E.B. (2006)

Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera.

Am. J. Vet. Res., 67, 2, 206-210.

[77] PANTANOWITZ L. (2003)

Mecanisms of thrombocytopenia in tick-borne diseases.

Int. J. Infect. Dis., 2, 2,

[78] PARZY D., DAVOUST B., BONI M., LETERME S. (1997)

Apport de la technique d'immunotransfert (Western blot) dans le diagnostic de l'infection à *Ehrlichia canis*. Comparaison des souches sénégalaises, ivoiriennes, diiboutiennes et corses.

Med. Trop., 57, 3, 93.

[79] PEREZ M. R.Y., WEN B. (1996)

Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in venezuela : antigenic and genetic characterization.

J. Clin. Microbiol., 2133-2139.

[80] PREZIOSI D.E., COHN L.A. (2002)

The increasingly complicated story of *Ehrlichia*.

Compend. Contin. Educ. Pract. Vet., 24, 4, 227-289.

[81] REARDON M., PIERCE K.R. (1981)

Acute experimental canine ehrlichiosis: I. sequential reaction of the hemic and reticular system.

Vet. Parasitol., 18, 48-61.

[82] RIKIHISA Y. (2003)

Mechanisms to create a safe haven by members of the family *Anaplasmataceae*. *Annal. N.Y. Acad. Sci.*, **990**, 548-555.

[83] **RIKIHISA Y.** (2006)

Ehrlichia subversion of host innate responses.

Cur. Op. Microbiol., 9, 95-101.

[84] RIKIHISA Y., YAMAMOTO S., KWAK I. (1994)

C-reactive protein and alpha-1-acid glicoprotein alterations levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*.

Vet. Parasitol., 66, 241-249.

[85] ROSA F. C.M., FELLOUS M. (1986)

Interferon and major histocompatibility complex genes: a model to analyse eukaryotic gene regulation?

Interferon, 7, 48-87.

[86] SCHOFIELD K., VOULGARI F., GOZZARD D., LEGLAND M., BEECHING N., STUART G. (1982)

C-reactive protein concentration as a guide to antibiotic therapy in acute leukemia. *J. Clin. Pathol.*, *35*, 866-869.

[87] SHAW D.H., RUBIN S.I. (1986)

Pharmacologic activity of doxycycline.

J. Am. Vet. Med. Assoc., 189, 7, 808-809.

[88] SHIMADA T., ISHIDA Y., SHIMIZU M., NOMURA M., KAWATO K., IGUCHI K., JINBO T. (2002)

Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia*

Vet. Res. Comm., 26, 3, 171-177.

[89] SMITH R.D., RISTIC M., HUXSOLL D.L., BAYLOR R.A. (1975)

Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia.

Infect. Immun., 11, 6, 1216-1221.

[90] STEVENSON H.L., ISMAIL N., WALKER D.H. (2006)

Route of inoculation influences T cell priming : an intradermal environment promotes a strong protective type-1 response against monocytotropic ehrlichia.

Annal. Acad. N.Y. Sci., in Press.

[91] SUTTERWALA F.S. N.G.J., SALGAME P., MOSSER D.M. (1998)

Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fegamma receptor type I.

J. Exp. Med., 188, 217-222.

[92] TAJIMA T., RIKIHISA Y. (2006)

Cytokine response in *Ehrlichia canis*-infected dogs. *Annal. Acad. N.Y. Sci., in Press.*

[93] UNVER A. (2005)

Molecular detection and characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in turkey. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, **118**, 300-304.

[94] VAN HEERDEN J. (1982)

A retrospective study on 120 natural cases of canine ehrlichiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, *53*, *1*, *17-22*.

[95] VARELA A.S. (2003)

Tick-borne erlichiae and rickettsiae of dogs. *In: D.D.B. (Ed.), Companion and exotic animal parasitolgy,*

[96] WADDLE J.R., LITTMAN M. (1988)

A retrospective study of naturally occurring canine ehrlichiosis. J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 24, 615-620.

[97] WANER T. H.S. (2000)

Canine monocytic ehrlichiosis (CME). *Cell. Microbiol.*, *4*, *93-96*.

[98] WANER T. H.S., WEISS D.J., BARK H., KEYSARY A. (1995)

Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis.

Vet. Immunol. Immunopathol., 48, 177-182.

[99] WEISIGER R.M., RISTIC M., HUXSOLL D.L. (1975)

Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method.

Am. J. Vet. Res., 36, 5, 689-694.

[100] WINSLOW G., BITSAKTSIS C. (2006)

Immunity and immunopathology during ehrlichia infection.

Annal. Acad. N.Y. Sci., in Press.

[101] WINSLOW G.M., YAGER E., SHILO K., VOLK E., REILLY A., CHU F.K. (2000)

Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection.

Infect. Immun., 68, 2187-2195.

[102] YOSHIIE K. K.H.Y., MOTT J., RIKIHISA Y. (2000)

Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis.

Infect. Immun., 68, 1125-1133.

NORMAND Thomas

REPONSE IMMUNITAIRE LORS DE L'INFECTION DU CHIEN PAR *EHRLICHIA CANIS* : ETUDE EXPERIMENTALE

Thèse Vétérinaire: Lyon, 23 octobre 2006

RESUME:

Notre étude avait pour objectifs de confirmer la pathogénicité de la souche Borgo 89 d'*Ehrlichia canis*, d'étudier certains aspects de la réponse immunitaire induite par l'infection, et enfin d'évaluer l'efficacité de la mise en place d'un traitement à visée immunomodulatrice associé au traitement habituel à base de doxycycline.

Quatre passages successifs sur chiens confirment la pathogénicité de la souche étudiée. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux types de traitements. L'existence d'une réponse immune à médiation cellulaire et la présence d'anticorps anti-plaquettes ont été confirmées.

MOTS CLES:

- Ehrlichia canis
- Réponse immune
- IFN gamma

JURY:

Président : Monsieur le Professeur D. PEYRAMOND

1er Assesseur : Monsieur le Professeur L. CHABANNE 2ème Assesseur : Monsieur le Professeur G. BOURDOISEAU

Membre invité : Monsieur le Vétérinaire Chef des Services B. DAVOUST

DATE DE SOUTENANCE : 23 octobre 2006

ADRESSE DE L'AUTEUR :

947 rue Fernand Macquart 59184 SAINGHIN ENWEPPES