ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2010 - Thèse n°



CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VIRULENCE DES SOUCHES DE CHLAMYDOPHILA PECORUM SUR LE TRACTUS UROGENITAL MALE DU KOALA

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) et soutenue publiquement le 19 mai 2010 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Alexandre David Laurent BOULLANGER

Né le 17 Septembre 1985 à CHARTRES

DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL

Directeur : Stéphane MARTINOT

Mise à jour : 24/11/2009

Nom	Prenam	Grade		
ALOGNINOUWA	Théodore	PR1	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale	
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt Production animale	
ARCANGIOLI	Marie-Anne	MC Classe Normale	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale UR UMR ENVL AFSSA Mycoplasmose des Ruminants	
ARTOIS	Marc	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Production animale UR UMR 5525 CNRS EJF EPHE INP ENVL TIMC-IMAG	
AVISON	Timothy	PCEA	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé)	
BECKER	Claire	Stagiaire	UP Pathologie du bétail UR UMR ENVL AFSSA Mycoplasmose des Ruminants	
BELLI	Patrick	MC Contractuel MC Classe Normale	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Analyses de Laboratoire	
BELLUCO	Sara	Stagiaire Stagiaire	UP Pathologie Morphologique et Clinique	
BENAMOU-SMITH	Agnès	MC Classe Normale	UP Equine - Dpt Equine UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques	
BENOIT	Etienne	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques	
BERNY	Philippe	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques	
BERTHELET	Marie-Anne	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Solns intensifs)	
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL ERI 22 (INSERM) Agression Vasculaire Réponse tissulaire PT Logistique Bureau de la Pédagogie et de la Vie Étudiante Direction Adjoint au directeur - Chargée de la Vie étudiante	
BOULOCHER	Caroline	MC Classe Normale Staglaire	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores - UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux	
BOURDOISEAU	Gilles	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Camivores UR Thématique Leishmaniose Direction Adjoint au Directeur	
BOURGOIN	Gilles	MC Classe Normale	PT Laboratoires d'analyses Parasitologie	
BRUYERE	Pierre	MC Contractuel	UP Reproduction	
BUBLOT	Isabelle	MC Contractuel	UP Médecine des Carnivores - Dpt Carnivores	
BUFF	Samuel	MC Classe Normale	UP Reproduction - Dpt Carnivores UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle PT CERREC PT Formation continue	
BURONFOSSE	Thierry	MC Hors Classe	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Analyses de Laboratoire UR UMR 271 INSERM Hépatites virales UP Médecine des Carnivores - Dpt Equine	
CADORE	Jean-Luc	PR1	UR UMR 754 INRA - UCBL - ENVL - EPHE Rétrovirus Pathologie comparée Direction Adjoint au directeur - Chargé de missions	
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 958 Protozoaires entéricoles des volailles	
CAROZZO	Claude	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dot Carniv	
CHABANNE	Luc	PR2	UP Médecine des Carnivores Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigénes	
CHALVET-MONFRAY	Karine	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Industrie UR UMR 5525 CNRS EJF EPHE INP ENVL TIMC-IMAG	
COMMUN	Loic	MC Contractuel	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) Dpt Analyses de Laboratoire	
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR CNRS 5558	
DEMONT	Pierre	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie	
DESJARDINS PESSON	Isabelle	MC Contractuel	UP Equine	
EGRON-MORAND	Germaine	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) Dpt Production animale UP Médecine des Carnivores	
ESCRIOU	Catherine	MC Classe Normale		
FAU	Didier	PR2	Dpt Carnivores - UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux	
FLEURY	Catherine	PR2	UP Equine - Dpt Equine	
FOURNEL	Corinne	PR1	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes	
FRANCK	Michel	PR1	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt Production animale -	
FRIKHA			UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale	
GANGL	Monika	MC Contractuel	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Equine	
Commence of the Commence of th	Contracto	PMPA 4	13D Dietoria fanctionnella - Dat Carriversa	
GARNIER GENEVOIS	François Jean-Pierre	PR1 PRX	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensits) - Dpt Carnivores	

DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL Mise à jour : 24/11/2009

Nom	Prenom	Grade	
GONTHIER	Alain	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Opt Industrie
GONTHIER	Aldin	MC Classe Normale	UR UMR 958 Protozoaires entéricoles des volailles UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé)
	_	000	Dpt Analyses de Laboratoire
GRAIN	Françoise	PR2	PT Logistique Bureau de la Pédagogie et de la Vie Etudiante
			Direction Adjoint au directeur - Chargée de la Pédagogie UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt
			Production animale
GRANCHER	Denis	MC Hors Classe	UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
			Direction Adjoint au directeur - Chargé des relations intérieures
GREZEL	Delphine	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
			UP Reproduction - Opt Production animale
GUERIN	Pierre	PR2	UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie fernelle
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Analyses de Laboratoire
			UR UMR CNRS 5558 UP Médecine des Carnivores - Dpt Carnivores
HUGONNARD	Marine	MC Classe Normale	UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
JAUSSAUD	Philippe	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie
	- Tong page		PT Laboratoires d'analyses Laboratoire LEPS UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Ariesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs)
JUNOT	Stéphane	MC Classe Normale	
			UR UMR UCBL ENVI, ERI 22 (INSERM) Agression Vasculaire Réponse fissulaire
	2000	004	UP Biologie fonctionnelle
KECK	Gérard	PR1	Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
			UP Santé Publique Vétérinaire
KODJO	Angeli	PR2	Dpt Industrie
			UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
LACHERETZ	Antoine	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire Dot Industrie
ALIDEDT	Manuface	MC Classa Namala	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé)
LAMBERT	Véronique	MC Classe Normale	Dpt Analyses de Laboratoire
LE-GRAND	Dominique	MC Hors Classe	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale.
EDI OND	Acres	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire Dpt Equine
LEBLOND	Agnes	rice.	UMR INRA EPIA - UR 346
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	MC Classe Normale	UP Reproduction - Opt Equine
		Marie Control of the	UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle UP Equine - Dpt Equine
LEPAGE	Olivier	PR1 ISPV	UR UPSP 5201 Microbiologie alimentaire et prévisionnelle
LOUKIADIS	Estelle	167 4	UP Biologie Fonctionnelle
LOUZIER	Vanessa		UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores
MARCHAL	Thierry	MC Hors Classe	UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigène
MARTIN	Gillian	PCEA	PT Logistique LANGUES
MIALET	Sylvie	ISPV	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UP GEGAZS (Gestion des élévages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt
MOUNIER	Luc	MC Classe Normale	Production animale
MOUNICK	Luc	NIC Classe Horridae	UR UMR INRA URH
PIN	Didier	MC Classe Normale	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores
	Estations	MC Classe Normale	UP Mèdecine des Carnivores + Dpt Carnivores
PONCE	Frédérique	production of the second	UK UFSF 5203 Fathloughe Compared des centres donumiques et presentations à amagent
PORTIER	Karine	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Equine
POUZOT	Céline	MC Contractuel	PT CHEV CHEVAC - SIAMU
Market Market State			PT CHEV UMR 1233 Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
PROUILLAC	Caroline		
REMY	Denise	PR2	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivore: UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
	Laborato Contraction of the Cont		UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
RICHARD	Yves	PRX	PT Logistique Bureau de la Recherche
			Direction Directeur scientifique
			UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Industrie
ROGER	Thierry	PR1	UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux PT ICLB
8.000017	Weat office		PT Formation continue
	D1 111	nna	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Production animale
SABATIER	Philippe	PR2	UR UMR 5525 CNRS EJF EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
NAME OF THE PARTY	0	MO Chara Name to	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgle, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs)
SAWAYA	Serge	MC Classe Normale	UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
ornora crea	Deletion	MC Classa Name I	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
SERGENTET	Delphine	MC Classe Normale	TOR OP SEVE INICIONALISE delicitatio di provinciationi
THIEBAULT	Jean-Jacques	MC Hors Classe	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt
ZIALARD	Jacquemine	MC Hors Classe	OP GEGAZS (Gestion des elevages : genetique, airmentation, zootechniqe et sante) - Opti Analyses de Laboratoire -
	-1		UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivore
VIGUIER	Eric	PR1	UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
/IRIEUX-WATRELOT	Dorothée	MC Contractuel	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Analyses de Laboratoire
		PR2	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Production animale

Remerciements

A Monsieur le Professeur Dominique Peyramond

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

Hommage respectueux.

A Madame Jacquemine Vialard

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, qui a dirigé ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance, pour ses compétences et sa disponibilité.

A Madame Marie-Pierre Callait-Cardinal

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, qui a accepté de juger cette thèse et de faire partie du jury,

Qu'elle trouve ici mes sincères remerciements.

A Monsieur Patrick Belli

Maître de conférences contractuel à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, qui a apporté son avis de spécialiste à mon travail, indispensable. Qu'il trouve ici mes sincères remerciements pour disponibilité et gentillesse.

A Messieurs **Nicolas Dubouloz**, Directeur de l'Enseignement supérieur et de la recherche au Conseil régional du Centre, et **Michel Khairallah**, Chargé de mission auprès de M. le Recteur de l'Académie de la Région Centre, pour leur confiance, leurs soutiens moral et financier.

Qu'ils trouvent ici ma sincère reconnaissance.

Acknowledgement

I would like to express my deep and sincere gratitude to my supervisor, **Professor Peter Timms**, director of research programs, Institute of Health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology, Brisbane, Queensland, Australia. His wide knowledge and his logical way of thinking have been of great value for me. His understanding, encouraging and personal guidance have provided a good basis for the present thesis. Nothing would have been possible without him: he enabled me to fulfill the dreams I had when I was young.

I owe my most sincere gratitude to **Charles Wan** for his patience and availability to run the PCR and to share his detailed and constructive comments.

I wish to express my warm and sincere thanks to **Melanie** for her help to obtain the material, **Adams** for his kindness and his remarkable explanations; **Helen** (you were like a mother with me), **Parissa** and **Connor** for their support during my histological work; Avinash for the time I stole you with my questions.

I wish to express my warm and sincere thanks to **Doctor Amber Gillet**, one the wildlife warriors: there are people we never forget, you belong to this category. I also wish to thank Jo and **Jon** and all the employees of the Wildlife Hospital I have collaborated with. You worked in an awesome place; hope to see you soon.

I wish to thank **Peter**, **Julia** and **Betilda** for all the Reweetr moments we had in our international hot desk area. I hope you didn't become crazy with Sydney and me, the French tourists: RTime's (never) up!r You are great.

During this work I have collaborated with many colleagues for whom I have great regard, and I wish to extend my warmest thanks to all those who have helped me with my work in the Institute of Health and Biomedical Innovation.

I warmly thank **Benita** and **Tina** for having welcomed us every morning with their bright smiles that still shine in IHBI.

Thanks to all these people and other I met I felt the spirit of Australia, the country Rdown under,... to be continued.

Table des matières

Remerciements	5
Acknowledgement	7
Table des matières	9
Table des illustrations	15
Table des abréviations	15
Introduction	19
Premier Chapitre : Le koala, espèce endémique en danger	21
I. Le koala, des origines à aujourd'hui	23
A. La place de <i>Phascolarctos cinereus</i> au sein de la classe des mammifères	23
1. Les particularités de la classe des mammifères	23
2. La classification taxonomique du koala	24
B. La séparation du continent australien à l'origine de sa biodiversité	25
1. Des premiers mammifères aux premiers marsupiaux	25
2. L'évolution des marsupiaux durant le Tertiaire	25
3. La théorie de Darwin et ses alternatives	26
C. Ecosystème et répartition des populations de koalas	27
1. Un écosystème très spécifique	27
2. La répartition des 3 sous-espèces de <i>Phascolarctos cinereus</i>	28
3. Le déclin des populations de koalas depuis leur découverte	29
II. Principales caractéristiques anatomiques, physiologiques et pathologiques du koala	30
A. Des caractéristiques singulières	30

1. Les particularités externes et internes	30
2. Le dimorphisme sexuel	31
3. La fonction de reproduction	32
B. Un animal adapté à la vie en milieu arboricole et extrême	34
1. Un appareil musculo-squelettique performant	34
2. La fourrure du koala, une protection efficace face aux conditions climatiques extrêmes	36
3. L'ouïe et l'odorat, deux sens particulièrement développés	36
4. Un métabolisme basal réduit	37
5. Un système digestif efficace	37
C. Les principales affections du koala	40
1. Un système immunitaire peu efficace.	40
2. Les affections non infectieuses	40
3. Les affections infectieuses	41
III. Le koala, une espèce en voie de disparition	44
A. L'Homme, seule menace de cette espèce vulnérable ?	44
1. Un déclin continuel des populations	44
2. Les forces d'hier sont les faiblesses d'aujourd'hui	44
3. Les causes du déclin des populations de koalas	45
B. L'importance économique du koala pour l'Australie	48
C. Les tentatives de conservation de l'espèce	48
Second Chapitre : La chlamydophilose du koala, une réelle menace	53
I. Historique de la chlamydophilose	55
II. Taxonomie	56
A. Un microorganisme difficilement identifiable	56
B. L'ancienne classification	56
C. La nouvelle classification.	57

D. Spécificités et symptomatologie des différentes espèces	58
III. Etiologie	59
A. Deux espèces infectent le koala	59
B. Morphologie	59
C. Le cycle de réplication	61
D. Le métabolisme	62
IV. Epidémiologie	63
A. Epidémiologie descriptive	63
1. Avant propos	63
2. Distribution géographique	63
3. Prévalence de <i>C. pecorum</i> et de <i>C. pneumoniae</i>	63
B. Epidémiologie analytique	64
1. Les sources de contamination	64
2. Les facteurs de réceptivité	64
3. Mode de contamination	65
C. Epidémiologie synthétique	66
V. Immunopathogénie	67
A. Cytopathogénie	67
1. Voie d'entrée et spécificité cellulaire	67
2. Phagocytose et exocytose	67
3. Régulation de l'apoptose	68
B. La défense immunitaire non spécifique	68
1. Les facteurs physiques	68
2. Les facteurs chimiques	68
3. La réaction inflammatoire	69
C. La défense immunitaire spécifique	69

1. La primo-infection	70
2. La réinfection	71
D. L'évolution de l'infection	71
1. L'élimination de l'infection	71
2. L'infection chronique	71
3. Infection aigue	
VI. Aspects cliniques de l'infection chlamydienne chez le koala	
A. L'infection de l'appareil oculaire : la kératoconjonctivite	73
B. L'infection du tractus urinaire : « dirty tail disease »	74
C. L'infection du tractus génital : infertilité	76
D. La proctitite	78
E. L'infection du tractus respiratoire : rhinite et pneumonie	78
VII. Diagnostic	79
A. Les éléments de suspicion de suspicion d'une chlamydophilose	
1. Diagnostic clinique	
2. Diagnostic paraclinique	
3. Diagnostic nécropsique	80
B. La confirmation du diagnostic	81
1. Les méthodes de diagnostic indirectes	81
2. Les méthodes de diagnostic directes	82
VIII. Le Traitement	85
IX. Prophylaxie	88
A. Sanitaire	88
B. Médicale	88
V. La notantial zoonatique de la chlamydanhilase du kaela	90

Troisième chapitre : Contribution à l'étude de la virulence de <i>Chlamydia pecorum</i> sur le tracti génital male du koala	
I. Contexte de l'étude	93
II. Objectifs	94
III. Matériels et méthodes	95
A. Animaux ante mortem	95
B. Les prélèvements	96
C. Examen anatomopathologique	97
1. Préparation des lames histologiques et coloration Hématoxyline et Eosine (H&E)	97
2. L'évaluation semi-quantitative des lésions	97
D. Les tests moléculaires	98
1. La PCR	98
2. La réalisation de la PCR	99
IV. Résultats	101
A. Aspects macroscopique et histologique du tractus urogénital mâle sain du koala	101
1. Aspect macroscopique	101
2. Aspect histologique	102
B. Aspects macroscopique et histologique du tractus orugénital mâle chez le koala atte chlamydophilose	
1. Le score général chlamydophilose	103
2. L'étude lésionnelle	103
C. Résultats de l'analyse quantitative par PCR en temps réel	106
D. Identification des souches	107
V. Discussion	108
A. L'échantillonnage testé	108
B. Nature des prélèvements effectués	109
C. Protocole d'analyse histologique	109

D. Evaluation semi-quantitative de la virulence	111
1. Analyse du score général	111
2. Analyse de la méthode d'attribution des scores	112
3. Deux schémas pathogéniques différents	113
4. Autres analyses envisageables	113
E. Analyse quantitative par PCR en temps réel et identification des souches	114
1. Analyse des résultats	114
2. Invalidité de la méthode utilisée	116
3. Autres analyses envisageables	117
Conclusion	121
Bibliographie	123
Annexe I : Classes d'usure des dents et évaluation de l'âge	133
Annexe II : Exemples du dossier d'examination du koala Copper	134
Annexe III : Grille d'évaluation du score général	140
Annexes IV : Grille d'évaluation du score « vessie »	141
Annexes V : Grille d'évaluation du score « urètre »	142
Annexes VI : Grille d'évaluation du score « uretère »	143
Annexes VII: grille d'évaluation du score « rein »	144
Annexes VIII : Grille d'évaluation du score « prostate »	145
Annexes IX : Grille d'évaluation du score « canal déférent »	146
Annexe X : Grille d'évaluation du score « épididyme »	147
Annexe XI : Grille d'évaluation du score « testicule »	148
Anneve XII : Technique d'identification des souches	140

Table des illustrations

Figure 1 : Evolution spatio-temporelle de la sous-classe Marsupialia	26
Figure 2 : Koalas du sud et koalas du nord	28
Figure 3 : Distribution des populations de koalas en Australie	30
Figure 4 : Empreintes digitales du doigt III de l'antérieur du koala et de l'homme	31
Figure 5 : Appareil urogénital femelle du koala	33
Figure 6 : Appareil urogénital mâle du koala	33
Figure 7 : Joey accroché à la mamelle peu après la mise-bas	34
Figure 8 : Patte antérieure et postérieure de koala	35
Figure 9 : Composition moyenne de la feuille d'Eucalyptus	38
Figure 10 : Etapes du processus digestif du koala	39
Figure 11: Prévalence du KoRV dans différentes populations de koalas géogr	aphiquement
distinctes	43
Figure 12 : Etude de l'évolution des populations de koalas entre 1997 et 2005 sur la Ko	oala Coast au
Sud-Est du Queensland	44
Figure 13 : Habitat potentiel du koala en Australie en 1788 et en 2008	46
Figure 14 : Intégration des différents textes relatifs au plan de conservation du koala da	ans le sud est
du Queensland sur la période 2006-2016	51
Figure 15 : Ancienne et nouvelle classification des <i>Chlamydia</i>	57
Figure 16 : Structure trilaminaire de la paroi des <i>chlamydia</i>	60
Figure 17 : Modèle d'enveloppe cellulaire du corps élémentaire des <i>chlamydia</i>	61
Figure 18 : Cycle de réplication des <i>chlamydia</i>	62
Figure 19 : Comparaison de la charge virale plasmatique en KoRV chez des koalas sain	ns et malades
	73
Figure 20 : Kératoconjonctivite sévère avec écoulement mucopurulent et pannus	74
Figure 21 : "Wet bottom" caractéristique de l'incontinence urinaire	75
Figure 22 : Œdème sévère de la vessie chez un koala atteint de chlamydophilose	75
Figure 23 : Echographie d'un kyste de la bourse ovarienne gauche (22,9 mm)	77
Figure 24 : Echographie de la prostate d'un koala atteint de chlamydophilose	77
Figure 25 : Jetage mucopurulent d'un koala atteint de chlamydophilose	78
Figure 26 : Suivi de la charge chlamydienne sur différents organes par RT-PCR chez un	koala atteint
de kératoconjonctivite bilatérale et "dirty tail" pendant le traitement complet	86

Figure 27 : Diagramme résumant la démarche de l'étude	94
Figure 28 : Tractus urogénital du koala 3	102
Figure 29 : Présence de pétéchies sur la muqueuse vésicale du koala 4	103
Figure 30 : Scores général et tissulaires obtenus par analyse nécropsique et histologique des	koalas 2
et 4	105
Figure 31 : Scores lésionnels par niveau du tractus urogénital des 4 koalas inclus dans l'étude	:106
Figure 32 : Résultats de RT-PCR réalisées sur les différents tissus des koalas 1 et 2 (1 er et 2	essai)
	106
Figure 33 : Résultats de RT-PCR réalisées sur les différents tissus et des écouvillons des koal	as 3 et 4
	107
Tableau I : Classification classique du koala	24
Tableau II : Avantages passés et inconvénients récents des particularités anatomo-physiolog	
koala	45
Tableau III : Statut et législation relative à la conservation du koala dans les 4 états d'Australia	ie49
Tableau IV : Les neuf espèces de <i>chlamydia</i> et leur modèle pathogénique	58
Tableau V : Comparaison morphologique et fonctionnelle des 2 formes de Chlamydia	60
Tableau VI : Cibles des amorces PCR utilisées pour le diagnostic de chlamydophilose	85
Tableau VII : Caractéristques des koalas inclus dans l'étude	96
Tableau VIII : description des amorces utilisées pour la RT-PCR	100
Tableau IX : Description des lésions observées à l'examen nécropsique et histologique des	4 koalas
inclus dans l'étude	104
Tableau X : Rappels des scores lésionnels par étage du tractus urogénital	113
Tableau XI : Récapitulatif des résultats de PCR	115

Table des abréviations

ADCC Antibody dependent cellular toxicity (toxicité cellulaire dépendante des anticorps)

ADN Acide désoxyribonucléique

ADP Adénosine diphosphate

ARN Acide ribonucléique

ARNm Acide ribonucléique messager

ATP Adénosine triphosphate

EB Elementary body (corps élémentaire)

ECBU Examen cytobactériologique des urines

GM-CSF Granulocyte/macrophage colony stimulation factor

Ig Immunoglobuline

IL - Interleukine

IMC Immunité à médiation cellulaire

IMH Immunité à médiation humorale

IncA Inclusion membran protein A

INF γ Interféron γ

KoRV Rétrovirus du koala

LPS Lipopolysaccharide

LT 8 Lymphocytes T 8

MOMP Major outer membran protein (protéine majeure membrane externe)

MVLST Multi-virulence locus sequence typing

NK Natural Killer

OmpA Outer membran protein A (protéine A membrane externe)

OmpB Outer membran protein B (protéine B membrane externe)

PID Pelvic Inflammatory Disease (maladie inflammatoire pelvienne)

PCR Polymerase chain reaction (réaction en chaîne de polymérases)

RB Reticular body (corps réticulé)

RFLP Restriction fragment length polymorphism (polymorphisme des longueurs de

fragments de restriction)

RT-PCR Real time polymerase chain reaction (réaction en chaîne de polymérases en temps

réel)

TFC Test de fixation du complément

Th - Lymphocytes T helper

TMS Taux métabolique standard

TUG Tractus urogénital

VD4 Variable Domain 4 (Domaine Variable 4)

WH Wildlife Hospital de Beerwah, Queensland, Australie

Introduction

La faune et la flore australienne sont probablement les plus surprenantes existantes au monde: on y trouve des forêts d'eucalyptus, des crocodiles pouvant atteindre sept mètres, des mammifères pondant des œufs ou allaitant leur petit dans une poche.

Le koala fait partie de cette dernière catégorie. Cette espèce est devenue, de part ses caractéristiques physiques, un emblème de tout un pays, un continent. Parfaitement adapté à son environnement hostile, et très répandu il y a encore deux cents ans, le koala est aujourd'hui une espèce menacée. La chlamydophilose est actuellement la maladie la plus répandue dans cette espèce; associée à la perte d'habitat et à la rétrovirose, elle pourrait menée les populations du Queensland et du nord du New South Wales à une disparition prématurée. *Chlamydophila pecorum* et *Chlamydophila pneumoniae* sont les deux espèces majoritaires infectant ce marsupial. L'infection par ce « parasite » intracellulaire est à l'origine de quatre syndromes : kératoconjonctivite, maladie du tractus respiratoire, maladie du tractus génital pouvant conduire à l'infertilité et le syndrome dit de « la croupe humide » résultant d'une infection du tractus urinaire. La morbidité et la mortalité progressent au sein des populations du fait de la très forte prévalence de l'infection et des pressions liées aux modifications environnementales et à une immunité fragilisée.

Cette maladie, transmise de façon interspécifique à partir du bétail (bovins, ovins) implanté lors de la colonisation, pèse lourd dans les menaces à long terme de l'espèce : bien que sensible aux antibiotiques, leur usage chez le koala provoque des désordres digestifs incompatibles avec leur utilisation dans cette espèce, sans compter que l'antibiothérapie favorise le passage à une forme persistante des *chlamydia*. Le développement d'un vaccin apparaît comme la solution actuelle la plus réaliste. Des études menées par le professeur Peter Timms depuis une dizaine d'années ont permis de réaliser les premiers essais vaccinaux, plutôt prometteurs, mais il reste encore un long chemin à parcourir sur la question, tant le problème est complexe : aucun vaccin humain n'a pu être élaboré à l'heure actuelle.

L'étude présentée dans cette thèse s'intéresse à une étape du développement de ce vaccin : afin de comprendre pourquoi la forte prévalence est corrélée à un faible taux de morbidité, une méthode d'étude de la virulence des souches de *C. pecorum* infectant le tractus urogénital mâle du koala est présentée dans le troisième chapitre. Les résultats de cette étude pourraient permettre d'éclaircir certains aspects de la pathogénie et de l'épidémiologie de ce parasite aussi intriguant que fascinant. La mise en évidence de souches virulentes permettrait par ailleurs de cibler des antigènes plus adaptés à la conception du vaccin contre cette maladie chez le koala.

Avertissement : dans cet ouvrage seront utilisés indifféremment les termes *Chlamydia* et *Chlamydophila*

Premier Chapitre : Le koala, espèce endémique en danger

Les koalas, comme les autres animaux et plantes endémiques du continent australien, ont été séparés du reste du monde pendant une très longue période : l'œuvre de l'évolution a pu s'opérer pendant près de 45 millions d'années. Une apparence sympathique et un calme à toute épreuve ont permis d'élever cet animal au rang d'icône nationale, à la renommée internationale.

Le koala jouit d'une grande popularité mais doit faire face à de grandes menaces : son plus grand détracteur n'est autre que son plus grand admirateur, l'Homme. La survie de l'espèce dépendra de ses décisions, s'il n'est pas déjà trop tard...

I. Le koala, des origines à aujourd'hui

A. La place de *Phascolarctos cinereus* au sein de la classe des mammifères

1. <u>Les particularités de la classe des mammifères</u> (Marshall G.J.A. et al., 1990)

L'Australasie (Australie et Asie du Sud Est) est le seul continent à réunir les 3 sous-classes de mammifères :

- Les euthériens, plus communément appelés placentaires
- Les marsupiaux, dont fait partie le koala
- Les monotrèmes, comprenant seulement l'ornithorynque et 3 espèces d'échidné

Cette classification a longtemps fait débat. T.H. Huxley a d'abord proposé de les classer en euthériens, métathériens et protothériens respectivement, pensant que les monotrèmes et les marsupiaux étaient une version plus archaïque des placentaires. Le terme placentaire est par ailleurs inadapté dans la mesure où les marsupiaux disposent également d'un placenta.

Aujourd'hui, euthériens et marsupiaux sont réunis sous la même infraclasse, les **thériens**, tandis que les monotrèmes se trouvent dans une sous-classe séparée.

Marsupiaux et monotrèmes, tout comme les euthériens, possèdent d'une part une fourrure de poils, et d'autre part des glandes mammaires pour allaiter leur petit. La séparation au sein de la classe des mammifères est basée sur leur mode de reproduction et leur moyen de mettre au monde leur progéniture :

- La vie intra-utérine est prolongée chez les euthériens
- L'embryogenèse est intra-utérine et l'organogénèse est extra-utérine, accrochée à une tétine dans une poche ventrale chez les marsupiaux
- Se caractérise par une ponte d'œufs chez les monotrèmes.

2. La classification taxonomique du koala

	Caractéristiques	
REGNE	Animalia	Hétérotrophie
EMBRANCHEMENT	Chordata	Notochorde lors de l'embryogénèse
CLASSE	Mammalia	Allaitement et poils
SOUS-CLASSE	Marsupialia	Fin de gestation dans poche extra-utérine Os épipubien
ORDRE	Diprodontia	Une paire d'incisives sur mâchoire inférieure Fusion 2° et 3° doigts du membre postérieur
SOUS-ORDRE	Vombatiformes	Une paire d'incisives sur mâchoire supérieure
FAMILLE	Phascolarctidae	Arboricole
GENRE	Phascolarctos	
ESPECE	Cinereus	Couleur cendrée

Tableau I : Classification classique du koala (Wikipedia, 2009)

Principales caractéristiques définissant les taxons auxquels appartient le koala.

Le groupe des marsupiaux comptent 16 familles et plus de 230 espèces, réparties en Amérique du Sud et en Australie (Kirsch J.A., 1977). La classification classique (tableau I) est basée sur des critères anatomiques (dents, membres, cerveau...), mais grâce aux nouvelles techniques d'analyse biomoléculaire et génétique, elle est régulièrement sujette à d'importantes modifications (Tyndale-Biscoe H., 2005).

Les marsupiaux peuvent être séparés en deux catégories : les carnivores comprenant les opossums américains, les marsupiaux prédateurs australiens et les bandicoots ; et les herbivores comprenant essentiellement les opossums australiens, les kangourous, les koalas et les wombats. Selon la classification classique, fondée sur la dentition, les opossums appartiennent au groupe *Polyprodontia*, et les wombats au groupe des *Diprodontia*.

Le koala, comme les autres membres de cet ordre, possède une paire de larges incisives sur la mâchoire inférieure. Par ailleurs, la fusion des doigts II et III du membre postérieur est l'autre caractéristique des *Diprodontia*.

Le sous-ordre des *Vombatiformes* regroupent les koalas et les wombats, taxon basé sur des critères anatomiques. Cette si grande promiscuité laisse penser que le koala serait un wombat, marsupial adapté à la vie au sol, ayant développé la faculté de grimper aux arbres. Cette adaptation à la vie arboricole l'a totalement dissocié au sein d'une famille, *Phascolarctidae*.

L'actuel koala, *Phascolarctos cinereus*, est le seul représentant vivant de sa famille. De nombreux fossiles d'espèces éteintes, datant de - 25 Ma (millions d'années), appartenant à la famille

des *Phasolarctidae* ont été retrouvés, et ceux-ci suggèrent l'existence de 3 autres genres au sein de cette famille, tous arboricoles et semblables au koala : *Litokoala, Madakoala* et *Perikoala* (Sharp A., 1997).

B. La séparation du continent australien à l'origine de sa biodiversité

1. Des premiers mammifères aux premiers marsupiaux

Les premiers mammifères sont apparus il y a 220 Ma avant l'ère des dinosaures : ils ont occupé une part insignifiante de la faune pendant les 100 millions d'années suivantes. Durant cette période, les continents ne formaient qu'un, la Pangée (Woodburne M.O.et Case J.A., 1996).

A l'époque du Jurassique (-200 à -140 Ma), le super continent s'est séparé en deux :

- Le Laurasia, comprenant l'Europe, l'Asie et l'Amérique du Nord
- Le Gondwana comprenant l'Amérique du Sud, l'Afrique, l'Inde, l'Australie et l'Antarctique

C'est après cette séparation qu'est apparue le premier marsupial, il y a environ 120 millions d'années, et étonnamment dans l'hémisphère Nord : en effet, le plus ancien squelette de marsupial (identifié comme tel sur des critères anatomiques, notamment la présence d'un os épipubien) a été retrouvé en Chine, sur le même site qu'un autre squelette de petit mammifère, celui-ci considéré comme placentaire (Luo Z.X., 2003). Un nombre important de fossiles de marsupiaux datant de la période du Crétacé (-110 à -65 Ma) ont été découverts en Asie et en Amérique du Nord : la première moitié de l'histoire des marsupiaux s'est faite dans l'hémisphère Nord, particulièrement en Amérique (Cifelli R.L.et Davis B.M., 2003).

Il n'y a pas de preuve de l'existence de marsupiaux dans l'hémisphère sud avant le Tertiaire.

2. L'évolution des marsupiaux durant le Tertiaire

Suite à l'impact d'un astéroïde il y a 65 millions d'années, les dinosaures ont laissé la place aux mammifères. Ceux-ci, encore restés petits et primitifs, ont connu une importante radiation évolutive. Les marsupiaux, moins bien adaptés au milieu ont progressivement disparu de l'hémisphère nord, sous la pression écologique des placentaires.

Ainsi la deuxième moitié de l'histoire des marsupiaux s'est faite sur les 3 continents de l'hémisphère sud encore reliés à cette époque : l'Amérique du Sud, l'Antarctique et l'Australie. Ceux-ci se sont progressivement séparés, et ont ainsi vu une importante radiation évolutive des marsupiaux (Tyndale-Biscoe H., 2005). :

- Ceux d'Amérique du Sud se sont retrouvés en compétition avec les prédateurs, placentaires, venus du Nord lors de la connexion des 2 continents
- L'Antarctique s'est retrouvé sous une importante calotte de glace, incompatible avec la vie des marsupiaux
- En Australie, sans prédateur, les marsupiaux ont pu se développer, générant plus de 200 espèces adaptées au climat chaud et humide.

La figure 2 résume ce parcours atypique à travers les âges et les continents.

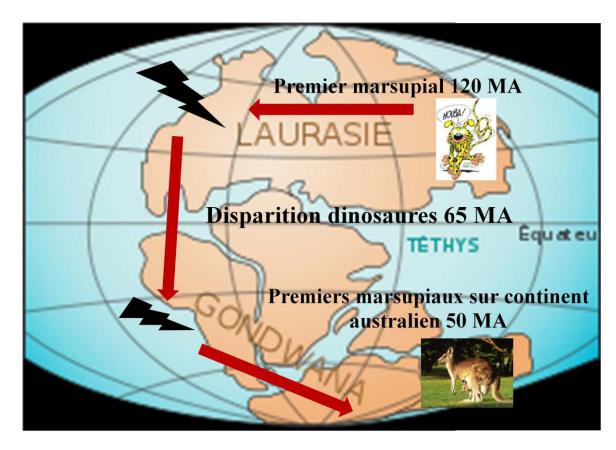


Figure 1 : Evolution spatio-temporelle de la sous-classe Marsupialia

Les flèches représentent les migrations des marsupiaux, d'abord dans l'hémisphère nord (Laurasia), puis à travers le Gondwana. L'histoire des marsupiaux est marquée par leur disparition en Laurasia puis en Amérique (symboles en forme de « foudre ») il y a 60 Ma. Elle s'achève par l'arrivée sur le continent australien, véritable niche écologique.

Au Miocène (-25 Ma), la plupart des espèces de marsupiaux actuels existaient déjà, représentées dans des zones humides ; le climat est devenu progressivement plus sec, modifiant la flore (Kemp, E.M., 1981). Les forêts d'*Eucalyptus* ont alors dominé le continent, et les premiers animaux *koala-like* ont vu leur apparition, adaptés à l'ingestion de ces feuilles.

Seuls quelques fossiles d'un placentaire, *Tingamara porteorum*, ont été découverts à Murgon en Australie datant de 30 Ma (Godthelp H. et al., 1992), mais il semblerait que les seuls placentaires à avoir pu coloniser ce continent seraient des chauves souris provenant de Papouasie. Ainsi, le placentaire de Murgon n'aurait il pas laissé de descendants ou serait-ce un marsupial aberrant?

3. La théorie de Darwin et ses alternatives (Tyndale-Biscoe H., 2005)

Darwin en 1859) soutenait la théorie de la radiation évolutive des marsupiaux par l'absence de compétition des placentaires depuis le début du Tertiaire. Mais la découverte d'un fossile de placentaire, *Tingamara porteorum*, datant de 30 millions d'années, fait perdre de la valeur à cet argument ; la question se pose alors de comprendre pourquoi les marsupiaux ont survécu, et pas les placentaires ? Il n'est pas impossible que les marsupiaux aient été pré-adaptés aux conditions

extrêmes (sols peu fertiles et climats incertains), de part leur métabolisme et/ou leur mode de reproduction.

Si l'une ou l'autre de ces caractéristiques se révèlent importantes dans la survie des marsupiaux en Australie, ceci suggèrerait que la théorie Darwin n'est pas fondée et que ces animaux auraient été pré-adaptés à leur milieu.

C. Ecosystème et répartition des populations de koalas

1. Un écosystème très spécifique

Le continent australien n'a pas toujours été une terre aride. Des forêts tropicales le recouvraient, c'est à ce moment que l'ancêtre du koala est apparu. Or, il semblerait qu'il se soit rapidement spécialisé dans l'ingestion de feuilles d'arbres du genre *Eucalyptus*, encore peu présents dans les forêts, ce qui explique qu'il y ait peu de fossiles datant de cette époque (Martin H., 1981).

Progressivement, le climat est devenu plus sec et les *Eucalyptus* ont alors dominés les forêts australiennes. D'un point de vue évolutif, les koalas étaient alors très bien placés pour coloniser ces forêts (Flannery T.F., 1994).

On trouve plus de koalas dans les forêts poussant sur des sols fertiles. Dans les régions les plus arides, l'hydrographie semble jouer un rôle important dans l'écosystème du koala : ils sont en effet plus nombreux près des cours d'eau et des plaines inondables (Melzer A., 1994).

Deux critères importants sont à prendre en compte pour caractériser leur habitat (Australian Koala Foundation, 2009b) (AKF, Koala habitat 2009) :

- L'association appropriée de certaines espèces d'arbres (*Eucalyptus* ou non), poussant sur des sols particuliers, soumis à des précipitations adéquates
- La présence d'autres koalas : bien qu'étant un animal solitaire, les notions de territorialité et de socialisation sont très présentes dans cette espèce. Chaque koala possède son propre territoire (appelé « home range »), mais ceux-ci sont disposés de telle sorte qu'ils forment une communauté d'individus permettant les interactions sociales, à la saison de reproduction notamment (Mitchell P., 1990).

Les koalas sont largement dépendants des *Eucalyptus*, à la fois pour leur alimentation, mais également pour leur habitat. Il existe sur le territoire d'un koala des arbres qualifiés de « home range tree », définissant l'appartenance au territoire, et des arbres qualifiés de « food tree ». Seules quelques espèces d'Eucalyptus sont sélectionnées pour l'alimentation (Ulrey D.E. et al., 1981). La sélection est poussée à l'extrême : en effet, la sélection ne tient pas compte uniquement de l'espèce d'Eucalyptus mais également de la fertilité des sols et des conditions climatiques. Ainsi pour deux arbres de la même espèce poussant à proximité l'un de l'autre, le koala pourra se désintéresser complètement de l'un des deux. La raison d'une telle spécificité dans la sélection des arbres est d'abord alimentaire : le koala est capable grâce à son odorat d'analyser la composition en éléments nutritifs et toxiques d'une feuille ; il permet également aux koalas d'une population de structurer leur relation sociale, de définir des territoires propres à chaque individu (Sharp A., 1995).

Ainsi, on comprend que l'écosystème du koala est très simple, mais très spécifique. C'est sur ces fondements qu'est né le célèbre slogan des associations de protection des koalas : « No tree, No me » (« Pas d'arbre, pas de koalas »).

2. <u>La répartition des 3 sous-espèces de *Phascolarctos cinereus* (Australian Koala Foundation, 2009e)</u>

Les scientifiques distinguent 3 sous-espèces de koalas, mais le débat fait rage pour savoir s'il y aurait finalement que deux sous-espèces voire aucune. Celles-ci sont réparties de façon homogène sur la côte Est du continent australien :

- Phascolarctos cinereus adustus, présente dans le Territoire du Nord et dans le Queensland
- Phascolarctos cinereus cinereus, répartie entre le Queensland et la Nouvelle Galles du Sud
- Phascolarctos cinereus victor, présente dans l'Etat de Victoria et le Territoire du Sud

Les critères principaux de distinction sont basés sur leur physionomie (figure 2). Les koalas du Sud sont plus grands que ceux du Nord, leurs pouces sont plus petits et leur fourrure est plus foncée, voire brune. Ces distinctions sont probablement apparues par adaptation au climat très différent entre le Nord et le Sud : hivers plus froids dans le Sud que dans le Nord (fourrure plus réfléchissante).

Bien que ces distinctions ne soient pas prises en compte lors de l'évaluation des populations, chaque sous espèce est adaptée à un écosystème particulier, qui diffère légèrement selon la latitude.

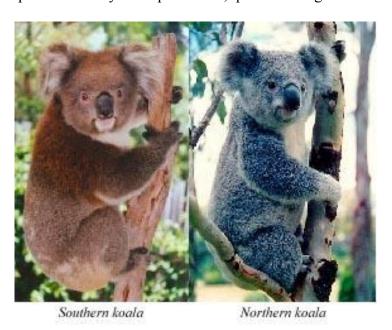


Figure 2 : Koalas du sud et koalas du nord (crédit Australian Koala Foundation)
Les deux sous espèces se distinguent principalement par leur taille et leur couleur de fourrure

3. Le déclin des populations de koalas depuis leur découverte

La première description d'un koala date de 1798, dix ans après l'arrivée des européens sur le continent austral. La population estimée à ce moment là est de 10 millions d'individus, répartis comme décrit précédemment sur la côte Est (Sharp, A., 1995).

Certains scientifiques pensent que la population de koalas aurait augmenté durant cette période, conséquence de l'élimination de populations aborigènes par les colons européens. Cet argument ne fait pas l'unanimité au sein de la communauté scientifique, bien au contraire.

Le profond déclin prend origine avec la colonisation du continent au XIXème siècle : la déforestation pour les besoins de l'agriculture et des habitations réduit petit à petit les territoires des koalas. Le processus s'accélère avec l'avènement du commerce des fourrures : les prospecteurs voient dans le koala une importante source de revenus. Un véritable massacre se met en place à la fin du XIXème et au début du XXème siècle (Australian Koala Foundation, 2009a). Quelques chiffres permettent de se rendre compte de l'importance de ce commerce :

- 1 million de koalas tués sur 6 mois dans l'état du Queensland en 1919 ayant conduit à la fermeture provisoire de la chasse
 - 3 millions de fourrures ont été vendues au début des années 1920
- 800 000 koalas tués lors de la réouverture de la chasse en 1927 dans le Queensland en moins de 30 jours.

L'effet combiné de la destruction de l'habitat et de la chasse a réduit la population de 99% en moins de deux siècles.

Selon l'Australian Koala Foundation (AKF), la population actuelle est comprise entre 45.000 et 80.000 individus. Les plus optimistes pensent qu'il en resterait près de 100.000, répartis de façon hétérogène sur la côte est australienne (figure 3).

La population du Queensland est estimée entre 25.000 et 50.000 individus, soit 60% de la population totale. Bien qu'il s'agisse de la région comptant le plus d'individus, elle est également la plus soumise à la destruction de l'habitat du fait de l'important développement des activités humaines. On recense les plus grandes concentrations dans le Sud Est de l'état et plus précisément sur la côte.

En New South Wales, il ne resterait que 15.000 individus (20%) dans tout l'état. Ceci s'explique par le fait que cet état ait été le premier colonisé et le plus soumis aux activités humaines. Les koalas ont notamment disparu de la région de Sydney au Sud Est de l'état.

La population du Victoria comprend un nombre équivalent d'individus à celle présente en New South Wales mais ce chiffre est à nuancer. En effet, on estime qu'il ne restait que 500 individus après la période de commerce des fourrures ; des koalas, introduits par l'homme au début du XXème siècle sur des îles vierges d'activités humaines au Sud de l'état (French et Phillip Islands), se sont parfaitement adaptés à leur nouveau milieu. Ces populations se sont ensuite rapidement retrouvées en surpopulation autorisant la réintroduction d'individus sur le continent. Ces populations insulaires ont l'avantage d'être isolées épidémiologiquement, mais la surpopulation et la consanguinité posent problème actuellement.

On ne recense aucun individu dans les territoires du nord et de l'ouest (disparu depuis 10.000 ans dans ce dernier). En Australie du Sud, le commerce des fourrures a provoqué l'extinction de l'espèce. Des individus indemnes de maladies contagieuses ont été introduits sur Kangaroo Island en 1923, ayant eu les mêmes conséquences que celles rencontrées sur French et Phillip Islands. Une récente étude estime la population sur cette île à 27.000 individus (Masters P.T. et al., 2004)



Figure 3 : Distribution des populations de koalas en Australie (Melzer A. et al., 2000)

II. <u>Principales caractéristiques anatomiques, physiologiques et</u> pathologiques du koala

Les koalas ont d'abord été décrits comme des « ours arboricoles » par les premiers colons au XVIIIème siècle. D'autres noms lui ont été donnés comme le « paresseux australien », basé sur son métabolisme lent, ou encore « singe australien », du fait de sa facilité à grimper aux arbres.

A. Des caractéristiques singulières

1. Les particularités externes et internes

Etonnamment, le koala est le seul occupant australien, mis à part l'homme à être un mammifère dit « frontal », c'est à dire à posséder une face plutôt qu'une gueule. La position des yeux permet une vision binoculaire, et le « rhinarium » est large, glabre, de couleur noire, orienté

verticalement. Sa forme robuste, sa fourrure épaisse et laineuse, ses larges oreilles poilues et sa queue rudimentaire sont les éléments le caractérisant le mieux.

Les « Southern koalas » mesurent environ 80 cm pour un poids variant de 9 à 15 kg, alors que les « Northern koalas » mesurent en moyenne 10 cm de moins pour un poids plus faible variant de 4 à 9 kg (Australian Koala Foundation, 2009d).

Le système cardio-vasculaire présente quelques particularités. Le cœur mesure environ 50 mm, est arrondi à son apex situé au bord caudal de la quatrième côte. Comme tous les marsupiaux, l'auricule droite englobe l'aorte. Il ne possède pas de *fossa ovalis*. Le péricarde est par ailleurs directement relié au diaphragme du fait de l'absence du ligament phrénicopéricardique. La fréquence cardiaque est d'environ 60 à 90 battements par minute. Une différence significative est à noter concernant le trajet de la veine cave caudale, à droite de l'aorte abdominale, à la différence des autres marsupiaux, pour lesquels elle couvre l'aorte ventralement (Pye G., 2006).

Le système respiratoire du koala se distingue surtout de celui des autres espèces par le fait qu'il ne permet pas une régulation efficace de la température corporelle. En effet, la muqueuse respiratoire est dépourvue de tissu glandulaire sécrétoire, susceptible de modifier la température et l'humidité de l'air inspiré. Ainsi, une hyperventilation à plus de 230 mouvements par minute, au lieu de 15 en condition optimale, est observable en réponse à de fortes températures. Par ailleurs, la cage thoracique n'est composée que de 11 côtes et son volume est relativement faible comparée a l'abdomen (Pye G., 2006).

Le koala est un des rares animaux, avec les primates, à posséder des empreintes digitales individuelles. Celles-ci présentent de grandes similarités avec celles des hommes (figure 4). Il est pourtant difficile d'expliquer l'apparition de cette particularité chez ce marsupial arboricole, qu'on ne retrouve pas chez d'autres, tel le sugar-glider ou le dendrolague. Il semblerait que les contraintes biomécaniques générées par le mode de vie du koala en soit à l'origine (Henneberg 1997).





Figure 4 : Empreintes digitales du doigt III de l'antérieur du koala (gauche) et de l'homme (droite) (Henneberg M, 1997)

2. Le dimorphisme sexuel

Sur le plan de la taille, les mâles adultes sont en moyenne 20% plus lourds que les femelles, et mesurent environ 10 cm de plus. Ces proportions sont assez variables, elles peuvent s'élever à plus de 50% selon les individus

Seuls les mâles possèdent une glande sternale, elle se situe au niveau sternal et mesure 85 mm sur 50 mm en moyenne. Elle contient des éléments sudorifères et sébacés. Celle-ci est sous contrôle hormonal. Elle permet le marquage du territoire (Pye G., 2006).

Chez la femelle, on note la présence d'une poche maternelle qui correspond à une invagination de la peau à travers la musculeuse, pour lesquels les fibres forment un sphincter. Une seule paire de mamelles est présente à l'intérieur.

3. La fonction de reproduction

La maturité sexuelle aussi bien chez le mâle que la femelle est atteinte vers l'âge de 2 ans mais la naissance des premiers petits, appelés joeys, intervient vers l'âge de 3 ans, au printemps. La saison d'accouplement dure d'août à février, et la femelle ne peut s'accoupler qu'après s'être séparée de sa progéniture précédente. L'accouplement n'intervient pas chaque année, une femelle peut attendre 2, voire 3 ans, entre 2 naissances (Martin R.W. et Lee A.K., 1984). Ceci dépend de facteurs comme l'âge ou la qualité de l'habitat. En moyenne, une femelle donne naissance à 6 joeys durant toute sa vie.

Un seul ovule est expulsé à la fois, l'ovulation étant déclenchée par l'accouplement. La gestation dure entre 34 et 36 jours, alors que le cycle ovulatoire dure 35 jours, et celui-ci n'est pas interrompu par la gestation.

L'appareil reproducteur femelle (figure 5) se distingue par l'existence de deux utérus totalement séparés, le long desquels circulent les uretères. Chaque utérus débouche sur un cul-de-sac vaginal séparé par un septum médian. Deux vagins latéraux permettent de connecter ce cul-de-sac vaginal au sinus urogénital, où s'abouche l'urètre. Il existe un troisième vagin, médian, non connecté au sinus urogénital mis à part lors de la parturition, au cours de laquelle un canal pseudovaginal se forme entre le cul-de-sac vaginal et le sinus urogénital. Celui disparait par la suite et réapparait à la mise bas suivante (phénomène physiologique douloureux) (Martin R.W. et Lee A.K., 1988).

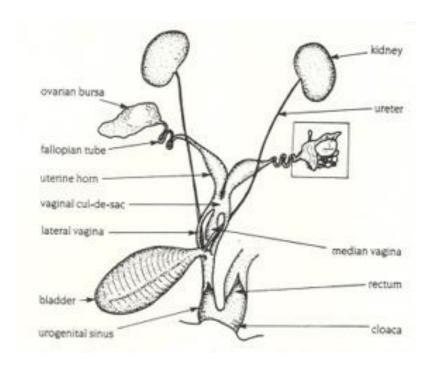


Figure 5 : Appareil urogénital femelle du koala (Martin R.W. et Lee A.K., 1988)

L'appareil reproducteur mâle (Figure 6) est relativement classique. Il est à noter la présence de 3 paires de glandes de Cowper et un pénis bifide. Les rugosités au niveau du pénis permettent la stimulation de l'ovulation.

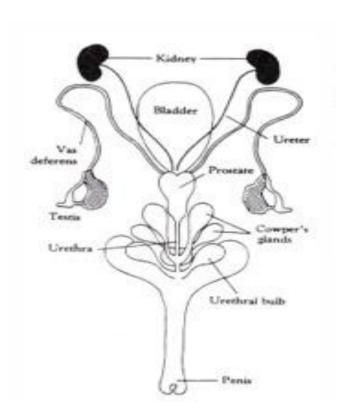


Figure 6 : Appareil urogénital mâle du koala (Martin R.W. et Lee A.K., 1988) L'extrémité bifide du pénis et la prostate en forme de cœur sont deux spécificités du koala

Le joey nait immature (figure 7); il doit rejoindre sans aucune aide extérieure la poche maternelle depuis le cloaque : ceci est rendu possible grâce aux sens très développés du toucher et de l'odorat (odeur du lait), à de puissants avant bras dotés de griffes et à un sens inné de l'orientation. Le joey mesure près de 2 cm, pèse moins d'un gramme et est aveugle : il correspond a l'état fœtal des placentaires, seule l'étape d'embryogenèse est achevée au niveau intra-utérin. En effet, il n'existe pas chez le koala de relais hormonal placentaire pour le maintien de la progestéronémie, ainsi, l'organogenèse se réalise à l'extérieur de l'utérus. Le sphincter de la poche marsupiale se contracte en présence du nouveau né afin d'éviter toute chute accidentelle.



Figure 7 : Joey accroché à la mamelle peu après la mise-bas (crédit Australian Koala Foundation)

Le joey reste accroché à la mamelle, à se nourrir du lait maternel, pendant les 5 premiers mois, période à partir de laquelle il commence à se nourrir du pap, substance liquide verte produite par la mère sous forme de gouttelettes au niveau du cloaque. Il correspond à un résidu de contenu caecalique maternel qui permet l'ensemencement bactérien du caecum du jeune koala. Ce diverticule digestif, encore de taille réduite, va augmenter son volume de façon considérable, permettant le passage d'une alimentation lactée stricte à une alimentation feuillée stricte. Le pap permet par ailleurs un apport en protéines d'origine bactérienne que seul le jeune koala peut digérer au niveau de l'estomac (Osawa R. et al., 1993). L'ingestion du pap coïncide avec la période de croissance exponentielle, l'apparition des premières dents et l'ingestion des premières feuilles d'eucalyptus (période de transition alimentaire)

Jusqu'à ses 11 mois, le joey se nourrit conjointement de lait, de pap et de feuilles d'eucalyptus. Il sort progressivement de la poche à partir du septième mois mais reste accroché généralement au ventre ou au dos de la mère. Il peut rester aux côtés de sa mère ainsi jusqu'à ses 24 mois dans certains cas, mais la séparation intervient généralement vers les 12 mois, lorsque le joey a achevé la moitié de sa croissance (Australian Koala Foundation, 2009c).

B. <u>Un animal adapté à la vie en milieu arboricole et extrême</u>

1. Un appareil musculo-squelettique performant (Young A.H., 1981)

Le koala est particulièrement bien adapté à la vie en milieu arboricole. Pourtant, à la différence d'autres marsupiaux arboricoles tels que le kangourou arboricole (genre *Dendrolagus*), les

koalas sont dépourvus de queue préhensile, bien qu'il en existe une vestigiale (6 ou 7 vertèbres caudales). Ce critère est partagé avec le wombat, son plus proche cousin.

Malgré l'absence de queue, le koala a un excellent sens de l'équilibre. Son corps est allongé et musclé, de puissants membres lui permettent de supporter leur poids lors de l'ascension. Les membres antérieurs et postérieurs sont d'une longueur équivalente, plus importante en proportion que la plupart des autres mammifères. Certaines particularités anatomiques permettent d'augmenter la force sans augmenter la masse musculaire : par exemple, l'insertion du quadriceps se fait plus distalement sur la crête tibiale.

Les membres du koala sont dotés (photos 8a & b) : de rugueux coussinets palmaires et plantaires associés à de longues griffes incurvées et acérées qui confèrent au koala un parfait accrochage au tronc et aux branches.

Chaque patte possède 5 doigts mais leur disposition diffère :

- Au niveau des antérieurs, les doigts I et II sont opposés aux autres permettant une préhension plus efficace des prises (photo 8a)
- Au niveau des postérieurs, le doigt I est opposable et ne possède pas de griffes, tandis que les doigts II et III, sont syndactyles conférant plus de force à leur niveau (photo 8b).





Figure 8 a & b : Patte antérieure (à gauche) et postérieure (à droite) de koala (photos personnelles)

Les articulations sont relativement souples, les angles d'extension des articulations de l'appareil appendiculaire sont augmentés de plus de 20 % par rapport aux autres espèces de mammifères. Ceci leur confère une très grande souplesse dans l'exécution de leur mouvement (Pye G., 2006).

D'autres particularités anatomiques sont à relever :

- L'absence complète de patella
- L'absence complète de scission du muscle deltoïde
- L'absence du muscle cléido-occipital
- L'insertion unique du muscle omo-atlantique sur la partie dorsale de l'épine scapulaire

Pour grimper aux arbres, les quatre membres sont sollicités : les antérieurs alternativement permettent de le maintenir au tronc ou aux branches tandis que les puissants postérieurs le hissent à l'étage supérieur où il peut à nouveau saisir une prise.

Son système locomoteur présente en revanche un handicap pour la marche (membres diamétralement opposés ensemble) ou la course (antérieurs puis postérieurs). Il est ainsi difficile pour lui de fuir une zone sinistrée ou un prédateur.

2. <u>La fourrure du koala, une protection efficace face aux conditions climatiques extrêmes</u> (Pye G., 2006)

La fourrure du koala est épaisse et laineuse conférant une protection à la fois contre les températures extrêmes et contre l'humidité.

Il s'agit en effet de la fourrure la plus isolante connue parmi les marsupiaux. On compte environ 55 poils/mm² au niveau du dos et moitié moins au niveau ventral. Par ailleurs, il existe un contraste de couleur entre la partie ventrale et dorsale, la première étant près de 2 fois plus réfléchissante que la seconde. Ceci permet d'ajuster l'équilibre thermique en changeant de position. Cette différence de couleur se retrouve entre koalas du nord, plus clairs, et ceux du sud, plus foncés, du fait des différences de climat existant entre ces régions (plus ensoleillée au Nord qu'au Sud)

La parfaite imperméabilité est de rigueur dans un environnement tropical où la saison des pluies peut être longue et intense.

Au niveau de la croupe, la densité de poils est considérablement augmentée ce qui leur confère plus de confort : ceci leur permet une station assise sur des branches exigües pendant plusieurs heures.

3. <u>L'ouïe et l'odorat, deux sens particulièrement développés</u> (Australian Koala Foundation, 2009d)

Le naseau du koala, large et glabre de couleur foncée, et ses larges oreilles sont deux caractéristiques importantes de leur apparence. Leur puissant odorat leur permet à la fois de sélectionner précisément les feuilles d'eucalyptus, selon leur qualité nutritive et leur composition en éléments toxiques (phénols, huiles essentielles...). Ces caractéristiques varient selon le climat et le sol. L'odorat joue également un rôle dans la sociabilisation : il permet de détecter les marques odorantes laissées par les autres koalas sur les arbres. Il est admis que ce puissant sens de l'odorat intervient dès la naissance, lorsque le nouveau né doit rejoindre la poche maternelle, attiré par l'odeur du lait. Il est toutefois étonnant de constater que la muqueuse olfactive du koala n'est pas aussi étendue que celle des autres marsupiaux.

L'ouïe a, quant à elle, un grand rôle dans la socialisation des koalas : en effet, les individus d'une même communauté peuvent vivre de façon très distante les uns des autres tout en pouvant communiquer entre eux.

Les autres sens sont relativement peu développés.

4. Un métabolisme basal réduit

La température corporelle du koala est environ 2.5°C plus basse que celle des placentaires (35.5 contre 38). Etant donné que l'activité métabolique double pour une augmentation de température corporelle de 10°C, on peut s'attendre a une réduction de 25% de cette activité chez le koala. Le taux métabolique standard (TMS) du koala est de 161 kj/kg^{0.75} alors que celui des placentaires est en moyenne de 289 kj/kg^{0.75}, traduisant ainsi une réduction réelle du métabolisme basal de près de 55%. Ce TMS représente l'énergie requise au maintien des fonctions vitales à une température constante (Degabriele R. et Dawson T.J., 1979).

Il est suspecté qu'une composition des membranes mitochondriales et cellulaires soient à l'origine d'un tel métabolisme : celles du koala, comme pour les autres marsupiaux, seraient composées d'une grande proportion de lipides monoinsaturés (Hulbert A.J. et Else P.L., 1999. Cette différence fondamentale de composition des membranes a des répercussions à tous les niveaux : respiratoire, excrétoire, vitesse de l'influx nerveux, reproduction, croissance, immunité... Le koala dort ainsi plus de 85% de son temps et se déplace peu ; c'est la raison pour laquelle le surnom de « paresseux australien » lui a été donné.

Ce système est particulièrement bien adapté à un environnement hostile et un climat extrême. Il est ainsi possible pour les koalas de puiser toute leur énergie dans la consommation de feuilles d'eucalyptus au rapport énergétique très faible. Par ailleurs, la période de lactation est une période critique pour la femelle qui doit augmenter son apport quotidien en énergie de 400 joules, sans pour autant modifier son régime alimentaire (Krockenberg A.K. et al., 1998) : pour cela elle augmente son apport énergétique et utilise la chaleur produite par lactogenèse pour sa thermorégulation.

Une caractéristique remarquable du koala est à relier à son métabolisme : la taille de son cerveau est extrêmement réduite. En effet, seulement 61% du volume de la boite crânienne est occupée par le cerveau (contre plus de 95% pour les autres mammifères). Par ailleurs, à la différence de la plupart des mammifères, et notamment de son plus proche cousin, le wombat, le koala est doté d'un lissencéphale (Haight J.R. et Nelson J.E., 1987). Cette différence anatomique majeure aurait pour intérêt d'économiser de l'énergie : le cerveau en est le plus gros consommateur de l'organisme (Flannery T.F., 1994). Cette particularité n'est pas sans conséquence : les capacités d'analyse et les coordinations des mouvements sont profondément réduites. Pour exemple, le comportement alimentaire est stéréotypé ; il n'est pas possible pour le koala de manger des feuilles autrement que sur une branche d'eucalyptus dressée : la même branche posée sur le sol représente un obstacle insurmontable. Cependant le gain apporté par l'économie d'énergie est supérieur aux limites occasionnées par la réduction de la taille du cerveau.

5. Un système digestif efficace

Le régime alimentaire du koala est strict. Ils se nourrissent essentiellement de feuilles du genre *Eucalyptus*. D'autres espèces composent de façon plus minoritaire leur régime alimentaire

comme l'*Acacia*, la *Melaleuca* et l'*Allocasuarina*. Des écorces d'arbres, des glands et de la terre sont également ingérés (Sharp A., 1995). Parmi le genre *Eucalyptus*, seules deux espèces sont majoritairement sélectionnées : le *Symphyomyrtus* à plus de 80% et le *Monocalyptus* à environ 20% (Moore B.D. et al., 2004).

Les feuilles d'Eucalyptus présentent des particularités nutritives *et* seules 4 espèces de marsupiaux sont capables de se nourrir de ce type de feuilles (Cork S.J. et Sanson J.D., 1990). Elles sont composées essentiellement de fibres cellulosiques, de lignine, d'huiles essentielles et de phénols (figure 9). Ces derniers sont des composés toxiques, moyens de défense de l'arbre contre les insectes et autres folivores. Ce taux de phénols varie en fonction de la fertilité des sols. Le koala peut évaluer ce taux grâce à son puissant odorat. Ce critère est le principal facteur limitant de la captivité des koalas : il est nécessaire d'acheminer quotidiennement des branches d'Eucalyptus fraîches possédant le meilleur rapport énergie/toxicité, et en quantité importante afin qu'il puisse faire un tri très sélectif (Ulrey D.E. et al., 1981).

Seuls la cellulose, les protéines, les glucides et une partie des lipides (soit la moitié des constituants de la feuille) sont utiles d'un point de vue nutritif (figure 9). Le reste est éliminé ou détoxifié. Cette détoxification représente plus de la moitié de la consommation énergétique utilisée par le koala. Ce qui lui implique de posséder un système digestif performant.

La feuille d'Eucalyptus, composée à 50% d'eau, constitue la quasi unique source d'eau du koala. D'ailleurs, le mot « koala » signifie « ne boit pas » en aborigène. Pourtant l'organisme du koala est composé à 77% d'eau, ce qui est supérieur à la moyenne des autres mammifères. Ceci est permis grâce à une très bonne régulation de l'équilibre hydrique et à un choix de feuilles particulièrement riches en eau, notamment en période de sécheresse.

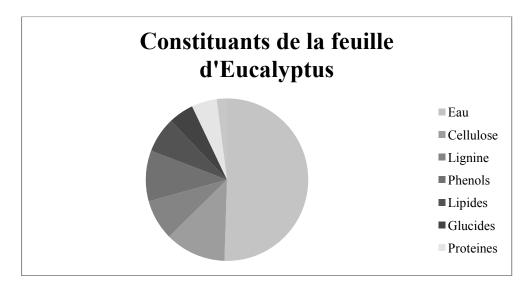


Figure 9 : Composition moyenne de la feuille d'Eucalyptus (d'après Tyndale-Biscoe H., 2005)

La digestion du koala peut se résumer en 7 étapes (figure 10) :

- **Broyage**: les larges molaires du koala permettent de hacher finement les feuilles d'*Eucalyptus* et ainsi de libérer les composants nutritifs contenus dans les cellules. L'usure

- des dents est d'ailleurs le facteur limitant à l'espérance de vie des koalas. Il est possible de connaitre l'âge d'un individu en analysant cette usure (annexe I).
- Digestion: au niveau de l'estomac, les composants subissent un traitement chimicoenzymatique. Ceci permet de transformer les macromolécules (protéines, glucides, lipides) en particules nutritives élémentaires. A l'issu de cette étape, les produits cataboliques toxiques comme les phénols sont libérés. Les fibres cellulosiques sont quant à elles non digestibles à ce stade.
- **Détoxification**: le foie permet la détoxification des phénols et autres huiles essentielles par oxydation par le cytochrome P450 puis conjugaison avec l'acide glucuronique.
- **Absorption** : celle-ci s'opère au niveau de l'intestin grêle. Elle représente plus de 90% de l'apport en énergie du koala.
- Fermentation : celle-ci intervient dans le caecum, particulièrement développé chez le koala (200 cm de long, le plus grand parmi les mammifères en proportion). La flore anaérobie permet une dégradation des fibres de cellulose non digérées dans l'estomac, en acides gras courts. Pourtant, cette fermentation n'apporte que 9% de l'énergie totale. L'importance physiologique de cet organe réside donc ailleurs. Grâce à l'importante osmolarité du contenu caecalique, il s'opère une rétention d'eau efficace, limitant les pertes hydriques dans un contexte environnemental de faible apport et de forte perte. Par ailleurs, la flore caecale permet la métabolisation de l'urée en protéines que le koala peut exploiter par caecotrophie, augmentant ainsi l'apport protéique. Les plus grosses particules alimentaires arrivant dans le caecum sont rapidement éliminées, alors que les autres solutés subissent la fermentation pendant près de 100 heures.
- Hydratation : l'absorption de l'eau a lieu au niveau de la muqueuse du colon proximal
- Elimination : les fibres résiduelles et la lignine sont éliminées après moulage, tandis que les fèces riches en protéines bactériennes sont réingérées. Les produits toxiques sont quant à eux éliminés dans les urines ou utilisés chez les mâles au niveau de la glande sternale pour le marquage territorial.

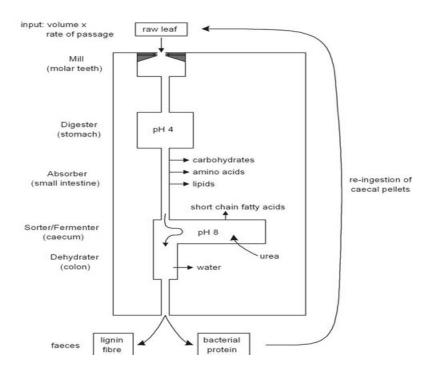


Figure 10: Etapes du processus digestif du koala (Hume I.D., 1999)

Grâce à son métabolisme lent, la digestion est rendue particulièrement longue, maximisant l'extraction de l'énergie tout en minimisant les besoins. Ainsi, seulement 300 grammes de feuilles sont nécessaires à la couverture des besoins quotidiens (Tyndale-Biscoe 2005).

C. Les principales affections du koala

L'espérance de vie d'un koala à l'état sauvage est d'environ 10 ans alors qu'en captivité, les individus peuvent atteindre une vingtaine d'années (Galit R., Lone Pine Sanctuary, communication personnelle). Ceci s'explique par la bonne gestion sanitaire des populations en captivité. Les affections infectieuses représentent la plus grande part des pathologies du koala. Cette forte susceptibilité aux agents infectieux s'explique notamment par l'efficacité du système immunitaire chez cette espèce, plus réduite que chez d'autres espèces. Par ailleurs, le facteur limitant l'espérance de vie, appartient à l'autre grande catégorie d'affections (les non infectieuses) et en particulier l'usure des dents est beaucoup plus marquée chez les koalas sauvages que chez les animaux captifs ; celle-ci est liée à la qualité constante des feuilles en parc zoologique, ce qui n'est pas le cas en milieu sauvage.

1. Un système immunitaire peu efficace

Le système immunitaire du koala est considéré comme « paresseux » (Wilkinson et al., 1994) : en effet, la réponse humorale se révèle plus longue à se mettre en place que chez les euthériens ; des koalas exposés *in vivo* à de l'albumine de sérum bovin produisent une quantité détectable d'anticorps seulement au bout de 12 semaines. Cette réponse humorale lente est corrélée à une faible quantité de lymphocytes B et T. Cependant, la réponse immunitaire cellulaire semble être comparable en terme de niveau et de délai avec celle observée chez les mammifères non métathériens (évaluation de la prolifération lymphocytaire *in vitro* après sensibilisation de koalas par le bacille de Calmet-Guerrin).

Le manque de réactivité du système immunitaire du koala et de rechreches sur le sujet se traduit par une très faible quantité de publications à ce sujet. La conception d'un vaccin contre la chlamydophilose du koala (recherche en cours) devrait permettre de mieux caractériser et expliquer les spécificités existant chez cette espèce.

2. <u>Les affections non infectieuses</u> (Pye G., 2006)

Les affections dentaires sont liées à l'usure précoce des dents. Des abcès dentaires et des fistules oronasales se forment, allant jusqu'à l'ostéolyse. Ceci se traduit généralement par un jetage mucopurulent unilatéral. La radiographie est souvent nécessaire au diagnostic.

La néphrose tubulo-interstitielle serait liée à la qualité de l'alimentation. Une nécrose et une fibrose des tissus médullaires sont observées, souvent associées à la présence de cristaux d'oxalates. Les symptômes comprennent anorexie, dépression, polydipsie; une augmentation de l'urémie est présente.

La dysplasie de la hanche et de l'épaule est surtout étudiée dans les populations captives. Une proportion équivalente d'individus présente une atteinte sévère, modérée et légère. Une production réduite de vitamine D liée à un manque d'ensoleillement naturel au sein de ces

populations pourrait en être à l'origine. Des études sont en cours dans les différents zoos hébergeant des koalas, sous la direction du zoo de San Diego.

L'hypovitaminose E se traduit par une parésie associée à une atrophie et une pâleur des muscles du membre antérieur, aboutissant généralement à la nécrose et à la fibrose musculaire. Sur les animaux en captivité, une supplémentation préventive à hauteur de 100 mg/kg/jour de vitamine E est administrée.

L'hypoglycémie néonatale est observée chez les joeys nourris au biberon. Les symptômes classiques de ce type d'affection sont de nature nerveuse (stupeur, convulsions). Une augmentation de la fréquence de prise de lait permet de la prévenir. Du dextrose en intra-veineuse peut être utilisé en cas d'urgence.

Enfin les affections traumatologiques sont fréquemment observées en milieu naturel.

3. Les affections infectieuses

a. Pathologie d'origine parasitaire (Pye G., 2006)

Sur le plan du parasitisme externe : de nombreuses tiques du genre Ixodes et Haemophysalis ont été rapportées, celles-ci peuvent provoquer une anémie lors d'une forte infestation. Ixodes peut par ailleurs provoquer une paralysie chez des individus naïfs. Parmi les acariens, Demodex spp. provoque des nodules cutanés, une alopécie périoculaire et des ulcérations. Un sarcopte spécifique Sarcoptes scabei wombati provoque un fort prurit au niveau des anterieurs.

En parasitologie interne: quelques nématodes et cestodes sont décrits chez le koala, notamment Bertiella obesa à l'origine d'une entérite en cas d'infestation massive et transmis par un arthropode. Parmi les pathogènes zoonotiques, on recense la présence de Toxoplasma gondii. Le koala est hôte intermédiaire, la transmission se fait à partir de l'environnement par ingestion de matériels souillés par les fèces de félidés. Les koalas sont moins exposés que les marsupiaux carnivores: seules 3 cas de mortalité ont été rapportés. Les signes cliniques observés sont une tachypnée aigue, une tachycardie, une hyperthermie et parfois une mort subite. Les kystes sont observés principalement au niveau cérébral, musculaire et dans la glande surrénale. Cependant sa prévalence au sein des populations de koalas est très faible, et le risque zoonotique nul (exception de la consommation de viande de koalas par les aborigènes, aujourd'hui révolue).

b. Pathologie d'origine bactérienne

Les koalas peuvent présenter :

des affections respiratoires sous forme d'un complexe rhinite/pneumonie. De nombreux agents pathogènes primaires et secondaires ont été isolés comme *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomona sp.s*, *Streptococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Pasteurella sp.* ... plus d'une vingtaine au total, dont des virus et des levures. Les symptômes sont ceux d'une affection classique de type pneumonie, bronchite, rhinite et pharyngite selon l'importance de l'infection. Le vaccin contre la toux du chenil du chien peut être utilise chez le koala.

- des septicémies. Les agents pathogènes isolés sont des Gram négatifs (*Salmonella sp., Morganella sp. et E. coli*). Ils proviendraient de l'ingestion de feuilles contaminées chez l'adulte, et par l'ingestion du pap chez le joey. Les symptômes sont essentiellement neurologiques, d'apparition aigue, et sont généralement sévères.
- la maladie de Tyzzer a également été décrite dans cette espèce (Canfield P.J. et Hartley W.J., 1991) : l'agent étiologique est *Clostridium piliformis*. Les signes cliniques comprennent diarrhée, dépression et anorexie. Des lésions de nécrose du myocarde et du foie peuvent être observées. Le traitement est à base de tétracycline.
- enfin la chlamydophilose représente la plus importante pathologie infectieuse du koala, en terme de prévalence et de virulence, elle fera l'objet d'une étude approfondie dans le second chapitre de cette thèse.

c. Pathologie d'origine fongique

La cryptococcose (Connoly J.H. et al., 1999) est l'affection dominante. L'agent étiologique est *Cryptococcus neoformans* neoformans. Le koala se contamine par inhalation de spores présentes dans l'environnement (feuilles contaminées par fèces de pigeons essentiellement). Trois formes cliniques existent : une forme respiratoire (rhinite pneumonie, anorexie, mort) une forme neurologique (extension à partir de la lame criblée de l'ethmoïde, forte mortalité) et une forme disséminée (apparition d'abcès cutanés au niveau des cervicales).

Des teignes sont également constatées chez le koala (Pye G., 2006). Celles-ci comprennent des agents zoonotiques non prurigineux avec *Trichophyton mentagrophytes* et prurigineux avec *Microsporum spp*. et *Acremonium spp*. Une alopécie, un érythème et un état kérato-seborrhéique sont observés particulièrement au niveau des doigts et sur la face. La contamination se fait en milieu naturel humide.

d. Pathologie d'origine virale

La découverte d'un *Gammaretrovirus* (KoRV) chez le koala est très récente (1993) et son intérêt est majeur : en effet, il s'agit du seul exemple d'endogénéisation rétrovirale active connue, c'est-à-dire de l'intégration permanente progressive du virus à tout ou partie des individus d'une espèce ; celle-ci aurait démarré il y a 200 ans. Cette notion d'événement récent est appuyée par l'absence du KoRV chez les autres marsupiaux présents en Australie (Hanger J. J. et al., 2000) et par la découverte de populations de koalas vierges de KoRV. En effet, au début du siècle, dans le but de protéger l'espèce, un certain nombre d'individus ont été déplacés sur une île É Kangaroo Island. Les derniers animaux exportés sur l'île l'ont été en 1920. Ces animaux ont ensuite servi à repeupler certaines régions australiennes. En étudiant cette population préservée, on s'est rendu compte qu'aucun individu n'était porteur du KoRV. Les études menées au sein des quatre régions où vivent des koalas sauvages ont montré que le pourcentage d'individus porteurs du KoRV augmentait en allant du sud vers l'est (faible sur Raymond Island, moyen sur Ballarat et 100 % sur SE Queensland, St Bees Island et Blair Athol) (Tarlinton, R. E. et al., 2006) (figure 11).

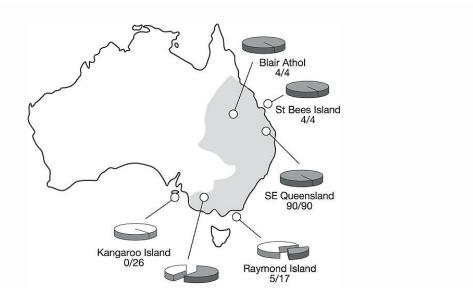


Figure 11 : Prévalence du KoRV dans différentes populations de koalas géographiquement distinctes (Tarlinton R.E. et al 2006)

La distribution de populations de koalas sauvages en Australie est marquée en gris. Les taux de prévalence de KoRV des différentes populations étudiées ont été définis par PCR et PCR en temps réel à partir d'ADN extrait de prélèvements de sang. Les données sont représentées dans des graphiques circulaires avec les résultats positifs (gris foncé) et négatifs (blanc) – les valeurs indiquent le nombre de prélèvements positifs sur le nombre de prélèvements testés.

Le KoRV est très fortement lié génétiquement au GaLV (virus de la leucémie du gibbon), retrouvé sur des gibbons captifs en Asie du sud-est. L'hypothèse d'une transmission horizontale du *Retrovirus* n'est possible, vu la situation géographique des deux espèces, que par l'intermédiaire d'un vecteur hôte, porteur sain, probablement de type rongeur (Hanger, J. J. et al., 2000), soit simple messager d'une espèce à l'autre, soit source commune du virus. Il se pourrait que ce rongeur soit arrivé d'Asie du sud-est par les ports du nord de l'Australie et ait ainsi infecté les koalas dans une vague d'endogénisation du nord vers le sud. Une transmission horizontale, à partir des particules virales de la forme endogène n'est pas exclue dans la mesure où le KoRV partage des caractéristiques avec les virus exogènes.

La transcription active du *Retrovirus* entraine une immunosuppression favorisant l'apparition d'infections opportunistes. Par ailleurs, une corrélation positive a été démontrée entre la charge virale et la présence de leucémies/lymphomes (Tarlinton R. et al, 2005). Aucun traitement n'est actuellement efficace. Il s'agit de la première cause de mortalité en parc zoologique (Mulot B., communication personnelle).

III. Le koala, une espèce en voie de disparition

A. L'Homme, seule menace de cette espèce vulnérable?

1. Un déclin continuel des populations

La population actuelle est estimée à près de 100.000 individus contre près de 9 millions deux siècles plus tôt. Malgré l'interdiction de chasser le koala, instaurée en 1937, suite à la prise de conscience des massacres perpétués pour alimenter le commerce de fourrures, le nombre d'individus continue à diminuer.

Une étude de 2007 (Guymer G. et al., 2007) s'est intéressée à l'évolution du nombre de koalas entre 1997 et 2005 dans la région de Koala Coast, à proximité de Brisbane dans le sud-est du Queensland, région réputée pour posséder la plus grande population de koalas du pays Une diminution de 26% (6246 contre 4211 d'individus) de la population de koalas a été constatée, les régions les plus urbanisées étant celles où la diminution a été la plus importante (figure 8a). Ce déclin peut atteindre 52% en région urbaine (figure 8b).

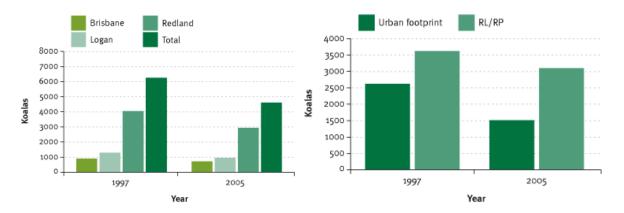


Figure 12 a et b : Etude de l'évolution des populations de koalas entre 1997 et 2005 sur la Koala Coast au sud est du Queensland

(a) dans chaque localité (Brisbane, Logan et Redland) ; (b) en milieu urbain (Urban footprint) et en région rurale (RL regional landscape / RP rural production) (Guymer G. et al., 2007).

Cette étude prouve que l'activité humaine reste l'un des principaux facteurs expliquant la disparition progressive du koala.

2. Les forces d'hier sont les faiblesses d'aujourd'hui

Les particularités physiologiques et anatomiques du koala sont parfaitement adaptées aux conditions environnementales du continent australien, comme vu précédemment. L'arrivée des colons a complètement bouleversé les acquis de l'espèce et ce qui se révélait comme un avantage il y a deux siècles est aujourd'hui un inconvénient (tableau II).

Facultés	Avantages passés	Inconvénients récents
Déplacement	Très bons grimpeurs	Mauvais marcheurs : difficulté à fuir (incendie, prédateurs, voitures)
Fourrure	Imperméable et isolante	Chasse pour alimenter le marché des fourrures
Régime alimentaire strict	Abondance d'Eucalyptus	Déforestation
Métabolisme lent	Economie d'énergie	Immunité,
Cerveau réduit	Economie d'énergie	Capacités d'analyse et d'adaptation réduites
Faible taux de natalité	Economie d'énergie	Faible taux de renouvellement de l'espèce
Territorialité	Faible consanguinité	Plus grande migration et exposition aux dangers

Tableau II : Avantages passés et inconvénients récents des particularités anatomophysiologiques du koala

3. <u>Les causes du déclin des populations de koalas</u> (Australian Koala Foundation, 2009g)

a. La perte d'habitat

La première cause du déclin actuel des koalas est celle de la majorité des espèces menacées dans le monde, à savoir la perte d'habitat. Les populations de koalas s'organisent en territoires appelés « home range », propres à chaque individu, et définis selon des critères très stricts et spécifiques : hiérarchie, fertilité des sols, espèces d'eucalyptus... Les « home range tree » sont marqués par les mâles grâce à la glande sternale et interdit tout accès à un autre koala. Ainsi, lorsqu'un koala perd son « home range », il ne peut trouver refuge dans celui du voisin ; il est alors contraint de trouver un autre lieu pour s'alimenter et redéfinir un nouveau territoire, ce qui est rendu d'autant plus difficile dans un environnement stressant (activités humaines) et/ou urbanisé (absence d'arbres). Ce territorialisme permet aux communautés de koalas d'éviter la consanguinité : en effet, les interactions sociales ont lieu avec les voisins de territoires ; ainsi, un jeune koala est contraint de migrer de sa région d'origine.

La perte d'habitat a des conséquences directes mais surtout indirectes pour les koalas : d'une part, l'eucalyptus est l'élément central et unique de l'écosystème du koala, à la fois pour l'alimentation et la structuration sociale. D'autre part, la perte d'habitat contraint les koalas à d'importantes migrations, phénomène qui les expose à de nombreux dangers malgré leur grande vulnérabilité.

Cette perte d'habitat a été considérable en près de 200 ans (figures 9 a et b) : plus de 80% de la surface forestière en eucalyptus a été détruite sur la côte est de l'Australie, soit autant d'habitat potentiel pour les koalas. Par ailleurs, parmi les forêts restantes aujourd'hui, plus de 75% se situent sur des propriétés privées, donc non protégées. La création de nombreux parcs nationaux ne permet pas encore de stopper le phénomène.

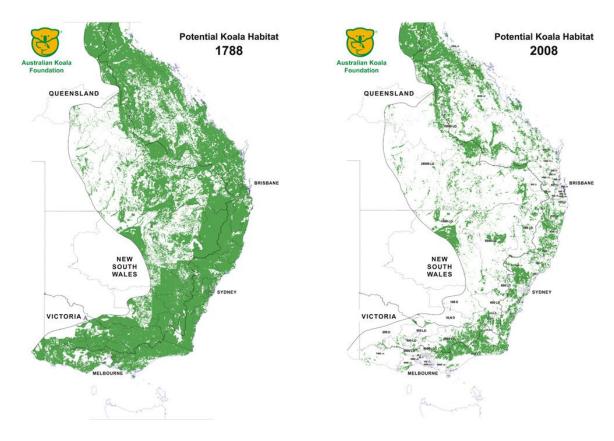


Figure 13 a et b : Habitat potentiel du koala en Australie (a) en 1788 et (b) en 2008 (Australian Koala Foundation, 2009g)

En vert, les forêts d'eucalyptus pouvant potentiellement accueillir des populations de koalas

b. L'activité humaine

Les accidents de la voie publique représentent la première cause d'admission dans les hôpitaux de faune sauvage, à savoir environ 40% (Gillet A., communication personnelle). Les koalas se déplacent plus généralement la nuit alors qu'ils sont moins visibles par les automobilistes ; par ailleurs, la faible capacité d'analyse du danger et la difficulté pour marcher expliquent la grande fréquence et la gravité de ces accidents. Un pic pseudo épidémique intervient entre septembre et février lors de la saison de reproduction ; les mâles sont alors plus exposés.

Les attaques de chiens constituent la deuxième cause d'admission dans les hôpitaux de faune sauvage : plus de 30% des admissions au WH de Beerwah (Gillet A., communication personnelle). Les blessures infligées sont modérées à sévères, le pronostic étant souvent dépendant de la durée de l'attaque et de la présence d'une personne sur les lieux pour le secourir.

Ces deux premières causes coûtent la vie à près de 4000 koalas par an.

De façon plus minoritaire, les koalas peuvent être exposés à des toxiques comme les pesticides utilisés en agriculture ou dans les jardins ; quelques cas de noyade dans des piscines ont également été rapportées (malgré de bonnes aptitudes à la nage).

Par ailleurs, le koala est une espèce très sensible au stress. Ainsi, sous l'effet d'un stress environnemental lié aux activités humaines, le système immunitaire est affaibli et les individus deviennent plus susceptibles aux infections : ce phénomène est nommé « syndrome de stress du koala » (Obendorf D.L., 1983).

c. Les menaces environnementales (Sharp A., 1995)

On dénombre quelques prédateurs naturels du koala dont l'impact sur la population reste modéré : ainsi, les iguanes, les dingos, les rapaces et les pythons peuvent occasionnellement capturer un joey.

Les animaux nuisibles, comme les renards ou les chats sauvages, sont également des prédateurs du koala : ces animaux ont été introduits au moment de l'arrivée des européens et tendent à bouleverser les écosystèmes australiens.

La sécheresse que connaît le continent australien ces dernières décennies a également un impact sur le déclin des populations sur au moins trois plans :

- Phénomène de dépérissement des forêts
- Modification de la composition des feuilles d'eucalyptus ; les tanins et autres matières toxiques sont en quantité augmentée alors que la teneur en eau est diminuée
- Les feux de forêt. Les koalas ont généralement aucune échappatoire, ou souffrent le cas échéant de brûlures et d'intoxication. Ces feux contribuent un peu plus à la perte d'habitat. L'importance des incendies croît chaque année (le plus important de l'histoire du pays dans la région de Melbourne en 2009). Certains sont directement déclenchés par l'homme pour des intérêts agricoles.

L'implication de l'homme dans le réchauffement climatique est aujourd'hui admise.

d. Les maladies émergentes

Enfin, l'apparition de maladies émergentes que sont la chlamydophilose et la rétrovirose constitue quant à elles des menaces à moyen et long terme. Leurs importances épidémiologiques et cliniques au sein des populations de koalas sont en pleine expansion. L'émergence de ces maladies à pour origine la transmission interspécifique avec des espèces introduites par l'homme lors de la colonisation : cette origine a été démontrée pour la chlamydophilose, souches transmises du bétail au koala (Timms P., 2005), alors qu'elle n'est que fortement suspectée pour la rétrovirose d'après les données épidémiologiques (Tarlinton R.E. et al., 2006).

Au terme de cette analyse, il apparait évident que l'Homme porte l'entière responsabilité de la lente extinction du koala, qu'il soit directement impliqué comme pour la perte de l'habitat et les accidents de la voie publique, ou indirectement comme pour l'introduction de nouveaux prédateurs et de maladies émergentes sur le continent.

B. <u>L'importance économique du koala pour l'Australie</u> (Hundloe T., 1997)

Le koala est aujourd'hui un emblème incontournable en Australie. Il joue d'ailleurs un rôle moteur pour le tourisme du pays.

T.Hundloe s'est intéressé en 1997 à la contribution du koala dans l'économie du pays, son importance était jusque là négligée.

Un échantillon représentatif de 419 touristes étrangers ont été soumis à un sondage dans les résultats sont probants :

- La présence d'une faune sauvage unique est un facteur influençant le choix de la destination pour 22% des touristes interrogés
- Parmi les espèces que les touristes veulent voir particulièrement, le koala apparait en premier avec 72% de sollicitations
- 75% des touristes souhaitent voir un koala durant leur séjour et 70% repartent en en ayant vu au moins un
- Enfin, 11% des touristes ne serait pas venu s'il n'y avait pas la faune si particulière à l'Australie.

Par ailleurs, l'étude donne une estimation des revenus directement générés par le koala : l'estimation se base sur le principe que 75% des touristes étrangers se donnent les moyens de voir un koala (zoo, sanctuaire...) et prend en compte les dépenses liées au transport, aux droits d'accès, aux photographies, aux souvenirs et aux logements : 336 millions de dollars sont ainsi directement générés grâce au koala. En prenant en compte les revenus indirectement liés à cette « industrie », l'estimation finale s'élève à 1.1 milliards de dollars et 9000 emplois dépendraient de cette espèce.

Ces données datent de 1997, et compte tenu de la croissance économique du pays ces dernières années, cette estimation est probablement à revoir à la hausse.

Même si la disparition du koala ne serait pas une catastrophe écologique (cette espèce ne participe pas l'équilibre d'un écosystème), elle serait une catastrophe économique. Nulle autre espèce animale ne pèse aussi lourd dans l'économie d'un pays. Il apparaît donc crucial d'instaurer une politique efficace de protection de l'espèce... qui n'est toujours pas le cas actuellement dans les faits

C. <u>Les tentatives de conservation de l'espèce</u> (Australian Koala Foundation, 2009 f)

Le premier pas a été réalisé en 1937 quand le gouvernement fédéral a interdit la chasse du koala. Devant l'hécatombe générée par les campagnes de chasse réalisées au début du siècle dernier, cette décision était incontournable pour ne pas voir disparaître l'espèce. Pour autant, depuis cette date, la préservation de l'espèce, au travers de la prise en compte de nouvelles menaces, n'a jamais été une priorité pour le gouvernement fédéral. En effet, il n'existe pas de vraie législation qui protège efficacement ou durablement l'habitat du koala, non pas parce que les lois n'existent pas, mais parce qu'il n'y a pas la volonté politique de financer et de se donner les moyens pour les faire appliquer.

Ainsi, le gouvernement fédéral délègue aux états qui transmettent eux-mêmes les responsabilités aux gouvernements locaux, avec pour conséquence des moyens limités.

Seuls quatre états possèdent des populations de koalas et chaque état possède sa propre législation en matière de conservation de l'espèce; il n'y a pas de coordination et de politique commune. Ce transfert de pouvoirs peut même conduire à certaines aberrations : ainsi, le statut du koala est différent au sein de chaque état, voire même au sein de l'état lui-même (tableau III).

Etat	Australie du Sud	Nouvelle Galles du Sud	Victoria	Queensland
	Statut Rare Vulnérable statut		Pas de	Vulnérable au sud-est
Statut		statut officiel	Commun dans le reste de l'état	
	Particularité de la l'unique population	Threatened Species Conservation Act 1995	Aucune	Inscrit comme tel au Nature Conservation Act 1992 depuis 2004
législation	sur Kangaroo Island = protection en parc national	State Environment Planning Policy 44 – Koala Habitat Protection		Nature Conservation (koala) Conservation Plan 2006

Tableau III : Statut et législation relative à la conservation du koala dans les 4 états d'Australie (Australian Koala Foundation, 2009 f)

Au niveau fédéral, plusieurs tentatives d'inscription du koala en tant qu'espèce vulnérable au Federal Government Endangered Species Protection Act 1992 ont échoué, la dernière datant de 2006. Etonnamment, les textes internationaux et américains semblent plus préoccupés par la question : l'espèce est considérée comme « potentiellement vulnérable » par The International Union for Conservation of Nature, et comme espèce « menacée » par The United States Endangered Species Act.

On se rend donc compte qu'à tous les niveaux, la confusion existe, ce qui rend difficile l'application d'un plan de conversation à l'échelle d'une population.

Il suffit de prendre l'exemple du Queensland pour comprendre la difficulté de mise en place d'un plan de conservation de l'espèce.

En 1994, le gouvernement du Queensland a reconnu le koala comme espèce « commune » dans *The Nature Conservation Act 1992*, excluant toute protection « officielle » prodiguée par cet Act.

Malgré les efforts des associations comme l'AKF, le statut d'espèce « vulnérable » ne sera adopté qu'en 2004, après un refus en 1996. Pour autant, ce statut n'est reconnu que pour le sud est du Queensland, décision fondée sur les données scientifiques (taux de mortalité, perte d'habitat, déclin de population...) recueillies pour cette partie de l'état. En l'absence de données fiables pour le reste du Queensland (liée à la difficulté à recueillir ces informations), le gouvernement considère l'espèce comme « commune » : le désintérêt politique de la question conduit à ne pas appliquer le principe de précaution, et ce malgré l'évidence de la situation.

Sous l'autorité du *Nature Conservation Act 1992* et de *l'Integrated Planning Act 1997*, un programme de gestion des populations du koala du Sud-est du Queensland a vu le jour pour la période 2006-2016. Ce programme est lui-même soumis à l'autorité de deux plans :

- le Plan Régional du Sud-est du Queensland 2006-2026. Il s'agit d'un plan de développement de l'occupation des sols sur 20 ans ; il doit promouvoir la survie du koala dans cette région en protégeant les zones d'habitat reconnues et adopter des mesures pour réduire la compétition entre l'urbanisme et les koalas
- le plan de Conservation du koala 2006. Il désigne précisément les zones d'habitat des koalas et les limites à ne pas dépasser pour préserver les populations. Il classe les populations en trois districts suivant le niveau de menace de l'espèce : d'élevé dans la région de Brisbane à faible dans le Queensland Central.

Le diagramme de la figure 14 résume l'intégration du programme de gestion au sein des différents plans et actes qui lui font autorité.

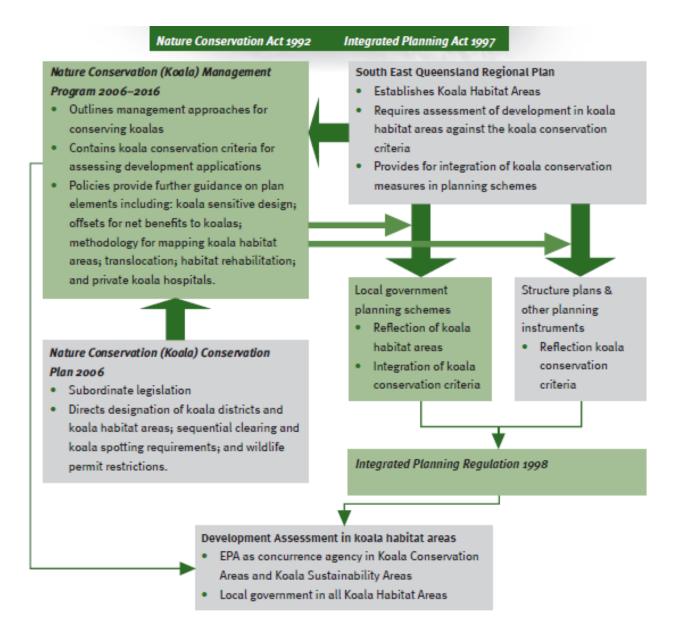


Figure 14 : Intégration des différents textes relatifs au plan de conservation du koala dans le sud est du Queensland sur la période 2006-2016 (Anonyme, 2006)

Ce diagramme reflète la complexité à mettre en place un programme de conservation de l'espèce, même localement

Le programme de gestion vise à mettre en application les principes édictés par les différents plans et actes, au sein de chaque district. Les autorités doivent s'assurer que les moyens sont mis en place pour contrôler les populations, limiter l'impact de l'Homme, améliorer l'efficacité des mesures de conservation des populations et de l'habitat, et enfin sensibiliser la population aux menaces dont elle est directement responsable : les accidents de la voie publique et les attaques de chiens.

Ce programme est sous l'autorité du gouvernement de l'état du Queensland mais les mesures d'application sont déléguées au niveau régional.

Malgré ces efforts, le plan de conservation ne prend pas en compte les problèmes d'ordre sanitaire. Or un constat alarmant a été dressé par une étude (Obendorf D.L., 1983) : celle-ci s'est intéressée aux causes de mortalité et de morbidité sur 55 koalas entre 1975 et 1980 dans l'état de Victoria. Ainsi, 35% et 27% des koalas avaient été respectivement victimes de traumatismes physiques (accidents de la voie publique, prédation) et de syndrome du stress du koala (dépression, anorexie, dysfonctionnement métabolique) mais 43% des koalas admis présentaient une kératoconjonctivite associée ou non a une infection du tractus urogénital imputables à la chlamydophilose.

Or cette affection, contre laquelle aucune mesure n'est prévue dans le plan de conservation responsable d'une forte morbidité et mortalité, ainsi que d'infertilité.

La chlamydophilose constitue un enjeu majeur pour la survie à moyen et long terme de l'espèce, alors que le plan de conservation du Queensland ne prend en compte que les menaces à court terme, à savoir conservation de l'habitat et sensibilisation des habitants.

Une meilleure connaissance de cette pathologie s'avère indispensable pour pouvoir prétendre sauver cette espèce si particulière et si importante pour la biodiversité.

Second Chapitre : La chlamydophilose du koala, une réelle menace

Les *chlamydia* sont des bactéries cosmopolites, pathogènes chez un grand nombre de vertébrés : mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens et poissons (Vanrompay D., 1995). L'infection se traduit par une atteinte des muqueuses chez les mammifères, dont la conjonctive, le tractus urogénital, les tractus respiratoire et digestif ; cependant des formes systémiques comme l'encéphalomyélite et la polyarthrite ont été décrites (Storz J., 1971). Les syndromes les mieux étudiés chez l'homme et les ruminants domestiques sont la kératoconjonctivite et l'infertilité/avortement.

Les connaissances concernant l'infection chlamydienne des mammifères sauvages sont limitées. L'essentiel des données concernent la faune sauvage américaine, australienne et sud africaine (Williams E.S., 2001). La chlamydophilose la plus étudiée chez les mammifères sauvages concerne celle du koala : il s'agit d'une infection mucosale de découverte récente et dont les conséquences sanitaires fragilisent un peu plus cette espèce.

I. Historique de la chlamydophilose

En 1893 à Paris, la transmission d'un agent infectieux d'un perroquet à un homme, causant des symptômes similaires à la grippe a été rapporté. Cette maladie sera nommée psittacose, du latin *psittacus*, signifiant « perroquet » (Morange A., 1895).

En 1907, la première description de ce micro-organisme a conduit à sa dénomination de *Chlamys*, qui signifie « manteau », du fait de sa position intracytoplasmique, au sein d'une vacuole. D'abord considéré comme un protozoaire par Halberstaedter, il a ensuite été considéré comme un virus a partir de 1930, et ce n'est qu'en 1966 que l'agent infectieux de la chlamydophilose a été finalement reconnu comme une bactérie (Moulder J.W., 1966).

En parallèle de ces recherches, la première description de lésions correspondant à une atteinte chlamydienne chez le koala date de 1919 sans pour autant en évoquer l'étiologie (McKenzie 1919) : sous la forme d'une maladie kystique du tractus reproducteur femelle. Ces lésions seront par la suite décrites à de nombreuses reprises et les études montreront l'indépendance de ce phénomène avec une origine hormonale.

En 1937, Pratt décrivit d'autres manifestations cliniques imputables à l'infection par *Chlamydia*: kystes utérins, affection respiratoire, néphrite, cystite, conjonctivite (Pratt A., 1937), mais c'est seulement trente ans plus tard que l'association entre la kératoconjonctivite et la chlamydophilose a été démontré dans le New South Wales (Cockram F.A. et Jackson A.R.B., 1974).

En 1978, Dickens a évoqué la chlamydophilose comme étant une possible cause du syndrome « dirty tail » (cystite) et McColl en 1984 a mis en cause *Chlamydia spp.* comme agent responsable de l'infertilité chez les femelles koalas, basés sur des résultats sérologiques et sur des isolements de l'agent par inoculation de sac vitellin d'œufs de poules (Dickens R.K., 1978) (McColl K.A. et Martin R.W., 1984).

En 1984, Brown et Grice ont quant à eux rapporté la croissance de *Chlamydia psittaci*, par la technique de culture cellulaire à partir de conjonctive, du septum nasal, du rectum, de l'urètre et du tractus urogénital de koalas malades (Brown A.S. et Grice R.G., 1984).

Il aura fallu près de 70 ans avant de pouvoir relier les symptômes décrits précédemment et l'agent étiologique depuis sa première découverte chez l'homme. La particularité du genre Chlamydia, à mi-chemin entre virus, parasite et bactérie explique en partie cette lente découverte. La chlamydophilose du koala apparait donc comme un sujet récent et sensible.

En 1937, Pratt avait déjà fait part de ces inquiétudes concernant les symptômes oculaires et génitaux du koala, considérant qu'il pourrait être responsable de l'extinction de l'espèce dans le Queensland et le New South Wales, sans connaître le caractère infectieux et pathogénique de cette maladie (Pratt, 1937).

II. Taxonomie

A. Un microorganisme difficilement identifiable

La taxonomie de la chlamydophilose a toujours été controversée depuis sa découverte au début du XIXème siècle. La première idée de classer les *chlamydia* en tant que protozoaire a été rapidement abandonnée du fait de l'absence de noyau. Les deux principales raisons qui ont permis de rejeter l'idée que les *chlamydia* n'étaient pas des virus sont : la présence d'ADN et d'ARN simultanément dans le microorganisme ainsi qu'un cycle de développement unique totalement différent du mécanisme de réplication virale (Moulder J.W., 1966). Ces bactéries ont également longtemps été considérées comme appartenant à la famille *Rickettsia* mais l'absence de système de transport d'électrons, l'absence de cytochromes et l'impossibilité de synthétiser de l'ATP et du GTP ont conduit à rejeter cette idée (Vanrompey D., 1995). Cette difficulté à identifier ce microorganisme tient au fait qu'il est particulièrement difficile à cultiver : il est indispensable d'utiliser des cellules vivantes, les milieux ordinaires n'étant pas adaptés.

B. <u>L'ancienne classification</u>

Celle-ci ne reconnaît qu'un seul genre *Chlamydia*, au sein d'une famille et d'un ordre uniques, respectivement *Chlamydiaceae* et *Chlamydiales*. Les espèces de *Chlamydia* ont été regroupées sur la base de caractéristiques phénotypiques, comme la morphologie des inclusions intracellulaires, la sensibilité aux inhibiteurs de croissance et l'analyse antigénique.

Avant 1968, seule *C. psittaci*, pathogène des oiseaux et de l'homme, est reconnue historiquement. Cependant, la découverte d'inclusions de glycogène et d'une sensibilité différente à la sulfadiazine chez certaines souches de l'homme, conduit à séparer les *Chlamydia* en deux espèces : *C. trachomatis* et *C. psittaci* (Page L.A., 1968).

Des analyses génétiques et sérologiques ont permis de caractériser 3 biovars et 18 sérovars pour *C. trachomatis*.

Quant à *C. psitacci*, elle constitue un groupe hétérogène de souches infectant aussi bien les oiseaux que les mammifères ; ces différences ont conduit à considérer deux nouvelles espèces :

- *C. pneumoniae*, isolée du tractus respiratoire de l'homme et du cheval. Cette espèce partage moins de 10% d'homologie avec les autres espèces de *Chlamydia* (Grayston J.T., 1989)

- *C. pecorum*, est la quatrième espèce reconnue, isolée de bovins, moutons et porcs. Cette espèce partage moins de 30% d'homologie avec les autres espèces (Fukushi H. et Hirai K., 1992).

C. La nouvelle classification

En 1999, Everett reconsidère totalement cette classification sur la base de l'analyse de la séquence des gènes 16SrRNA et 23SrRNA, par la méthode d'hybridation ADN-ADN (Everett K.D.E. *et al*, 1999). Ainsi, l'ordre *Chlamydiales* est divisé en 4 familles :

- Simkaniaceae
- Waddliaceae
- Parachlamydiaceae
- Chlamydiaceae, lui-même divisé en deux genres, Chlamydophila et Chlamydia

Au sein du genre *Chlamydophila*, 6 espèces nommées *C.abortus*, *C. psitacci*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. pecorum* et *C. pneumoniae* infectent respectivement les mammifères, les oiseaux, les chats, le cochon d'inde, les mammifères et l'homme.

La figure 15 met en parallèle les deux classifications :

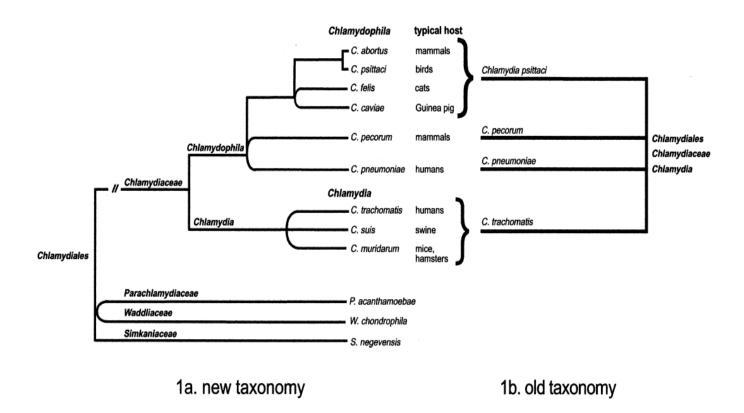


Figure 15: Ancienne (1b) et nouvelle classification (1a) des *Chlamydia* (Everett *et al.*, 1999)

Cette classification n'est pourtant pas reconnue par tous les bactériologistes, bien qu'elle soit validée par la communauté scientifique. L'existence de neuf espèces n'est pas particulièrement controversée mais les critiques principales tiennent en quatre points :

- le manque d'éléments pour diviser *Chlamydiaceae* en deux genres
- la trop grande prise en compte des résultats de l'analyse des séquences d'ADN par rapport aux aspects biologiques
- l'existence des familles *Waddliaceae* et *Simkaniaceae* est basée sur l'isolement à partir d'un isolat extrait d'échantillon unique
- les désaccords sur le nom *Chlamydophila* qui signifie littéralement « *like Chlamydia* »

D. Spécificités et symptomatologie des différentes espèces

Chaque espèce de *Chlamydia* possède un tropisme particulier concernant l'espèce cible ainsi que le tissu cible. Le tableau IV dresse un bilan du modèle pathogénique de chacune des neuf espèces définies par la nouvelle classification.

Espèces	Hôte cible	Symptômes
C. trachomatis	Hommes	Conjonctivite, blépharite, PID (maladie inflammatoire pelvienne), urétrite, prostatite, adénite
C. muridarum	Souris (ancien biovar de <i>C. trachomatis</i>)	Infection du bas et haut tractus génital
C. suis	Porcs	Infection du tube digestif asymptomatique
C. psitacci	Oiseaux sauvages et domestiques Zoonotique	Conjonctivite, pneumonie et symptômes urinaires
C. pneumoniae	Mammifères, reptiles	Pharyngite, bronchite et pneumonie atypique
C. felis	Chats	Pneumonie, conjonctivite
C. abortus	Bovins, caprins, ovins	Avortement
C. caviae	Cochon d'inde	kératoconjonctivite
C. pecorum	Mammifères	Polymorphe, dépend de la souche : polyarthrite, pneumonie, conjonctivite, avortement, encéphalomyélite, entérite, métrite, infertilité

Tableau IV : Les neuf espèces de *chlamydia* et leur modèle pathogénique (Longbottom D. et Livingstone M., 2006)

III. Etiologie

A. Deux espèces infectent le koala

Lorsque *Chlamydia* a été isolée pour la première fois chez le koala (1974), seules deux espèces au sein du genre étaient reconnues : *C. trachomatis* et *C. psitacci*. La première était alors considérée comme hôte strict de l'homme ; par conséquent toutes les souches isolées d'animaux étaient identifiées comme *C. psitacci*, y compris celles du koala (Cockran F.A. et Jackson A.R.B., 1974).

Les études du génome des *chlamydia* isolées chez le koala ont permis de mettre en évidence l'existence de deux types de *C. psitacci*, nommés type I et type II. Ces deux types ont été identifiés grâce à l'utilisation des techniques RFLP, ainsi que par l'analyse des plasmides (absence pour le type I) (Girjes A.A. *et al.*, 1988). Malgré le manque d'évidences sur la pathogénicité des deux types, le type I est considéré à tropisme oculaire et le type II à tropisme urogénital.

L'introduction récente de la PCR et du séquençage d'ADN a permis une avancée importante concernant la connaissance de l'agent étiologique infectant le koala. L'étude du gène codant pour la protéine majeure de la membrane externe (ompA) a révélé près de 97% d'homologie entre le type I et une souche de *C. pneumoniae* infectant l'homme et moins de 75% d'homologie avec 3 souches de *C. psitacci* (Girjes A.A. *et al.*, 1994).. Cette homologie est de 99% entre le type I et *C. pneumoniae* avec le gène *ompB*.

Le gène *ompB* a également été utilisé pour comparer le type II avec des souches atteignant les bovins : une homologie de 99% a ainsi été mise en évidence avec *C. pecorum* (Fukushi H. et Hirai K., 1992). Ces études ont conduit à ne plus considérer la chlamydophilose chez le kooala comme due à deux types d'une même espèce mais bien à deux espèces différentes : *C. pneumoniae* et *C. pecorum*.

B. Morphologie

Les *chlamydia* sont des bactéries non mobiles, cocoïdes, Gram-négatives, dont la taille varie de 0,2 à 1,5 µm. Ce sont des bactéries intracellulaires obligatoires, pathogènes, ne pouvant se reproduire qu'au sein de vésicules cytoplasmiques de la cellule hôte (*cf.* photo du tableau V).

On distingue une forme extracellulaire infectieuse, le corps élémentaire (CE), et une forme intracellulaire, le corps réticulé (CR). Ces deux formes sont adaptées, de par leur structure, à leur rôle : le corps élémentaire est une forme de résistante mais inerte, le corps réticulé est fragile mais une forme métaboliquement active.

Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau V.

	Corps élémentaire	Corps réticulé
Taille	0,3μm	0,5-1 μm
Paroi cellulaire	rigide	fragile
Ultrasons	résistant	fragile
Trypsine	résistant	lyse
Enveloppe cellulaire	sous-unitaire	pas de sous unité
ARN: ADN	1:1	1:3
Infectieux	oui	non
Adaptation	survie extracellulaire	développement intracellulaire
		G

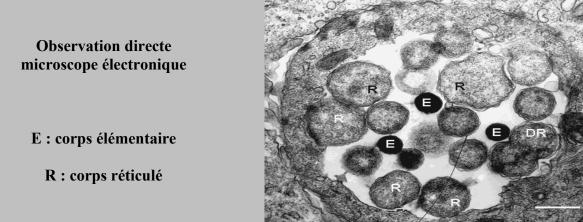


Tableau V : Comparaison morphologique et fonctionnelle des 2 formes de *Chlamydia* (d'après Prescott L.M. *et al.*, 2002)

Comme toutes les bactéries Gram-négatives, les chlamydia possèdent une double membrane

trilaminaire (figure 16). La membrane externe est constituée de phospholipides, lipides, lipopolysaccharide (LPS) et de protéines mais contrairement aux autres bactéries Gram-négatives, l'acide muramique n'est pas présent.

Une autre particularité de la membrane externe tient à la présence d'une protéine constituant 60% de cette membrane, la MOMP (Major Outer Membrane Protein) (figure 17) : elle joue un rôle important dans le maintien de la rigidité du corps élémentaire, mais également lors de l'adhésion à la cellule cible. Une activité de porine a également été mise en évidence.

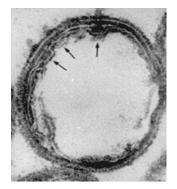


Figure 16 : Structure trilaminaire de la paroi des *chlamydia* (crédit P.Timms)

Le LPS joue un rôle important dans la structure de la membrane externe. Il est proche de celui des entérobactéries dites rugueuses. Des réactions croisées antigéniques sont possibles (Vanrompay D., 1995). Des ponts disulfures permettent d'assurer la stabilité de la membrane.

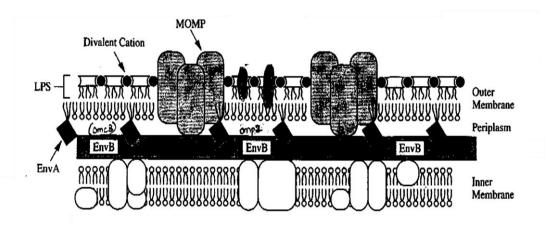


Figure 17 : Modèle d'enveloppe cellulaire du corps élémentaire des *chlamydia* (Fowler A., 1997)

MOMP = Major Outer Membrane protein, EnvA = ompA, EnvB = ompB. La proportion de chacune de ces protéines est de 5 :2 :1

C. Le cycle de réplication

Le cycle de reproduction commence par la fixation du corps élémentaire à la membrane de la cellule hôte, et est suivi de sa phagocytose. Le mécanisme d'entrée dans la cellule n'est pas parfaitement connu, mais l'on suppose que la bactérie entre par un procédé d'endocytose récepteur-dépendant, entre autres. Le corps élémentaire empêche la fusion de lysosomes (Zeichner S.L., 1983) avec le phagosome et commence à se réorganiser pour former un corps réticulé. Au bout de 8 à 10h, le corps réticulé commence à se diviser et cette réplication continue jusqu'à la mort de la cellule. Après une vingtaine d'heures, les corps réticulés se réarrangent en corps élémentaires infectieux et ce processus se poursuit jusqu'à ce que la cellule hôte se lyse et libère les *chlamydia* (entre 500 et 1000 par cellule infectée), 2 à 3 jours après l'infection (Hammerschlag M.D., 2002). La figure 18 résume ces étapes.

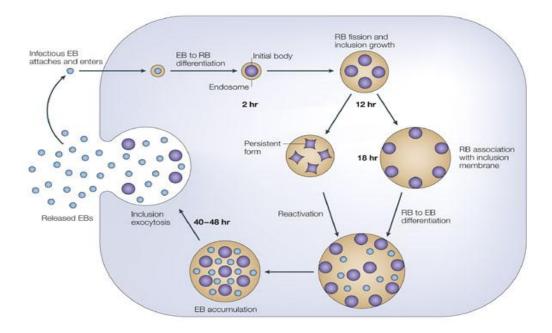


Figure 18 : Cycle de réplication des *chlamydia* (Brunham R.C. et Rey-Ladino J., 2005)

L'existence d'une troisième forme a été récemment démontrée. Les *chlamydia* peuvent en effet entrer dans un état de persistance, provoqué par un traitement antibiotique, de la présence d'interféron-γ ou encore lors d'une carence en nutriments. Cet état joue un rôle important dans la pathogénie de la maladie, dans la mesure où il est métaboliquement inactif et en position intracellulaire. Un retour à une forme infectieuse est possible lors d'un retour à des conditions favorables à son développement (Beaty W.L. *et al.*, 1994).

D. Le métabolisme

Le métabolisme chlamydien est très différent de celui des autres bactéries à Gram-négatif. Elles sont dépourvues de transporteurs d'électrons mais possèdent en revanche une translocase membranaire qui prend l'ATP de l'hôte en échange de l'ADP consommé. Ainsi, les *chlamydia* sont considérées comme parasites énergétiques. D'ailleurs, les mitochondries sont souvent retrouvées juxtaposées aux inclusions chlamydiennes. Pourtant, les *chlamydia* possèdent bien un gène codant une enzyme catabolisant le glucose et permettant la production d'ATP, mais ce gène n'est pas exprimé pour des raisons évidentes d'adaptation à l'environnement intracellulaire (Hammerschlag M.D., 2002).

Seul le corps réticulé est métaboliquement actif : il est capable de synthétiser l'ADN, l'ARN et les protéines, ainsi que quelques co-enzymes et acides aminés.

Le corps élémentaire ne peut pas capter d'ATP, ni produire des protéines : il s'agit d'une forme quiescente exclusivement impliquée dans la transmission et l'infection.

IV. Epidémiologie

A. Epidémiologie descriptive

1. Avant propos

Il est nécessaire de considérer plusieurs périodes dans la littérature scientifique concernant l'étude épidémiologique de la chlamydophilose du koala :

- De 1900 à 1980, les recherches ont été fondées sur l'observation des signes cliniques et de l'infertilité dans différentes populations de koalas. Il n'y a alors aucune évidence de la présence de l'agent infectieux.
- De 1980 à 1993, l'évaluation de l'incidence de l'infection à *C. psitacci* reposait sur la culture cellulaire et le test de fixation du complément (TFC). Ces techniques se révéleront par la suite peu sensibles, avec notamment une proportion de 43% de faux négatifs pour le TFC.
- Après 1993, la découverte des deux espèces infectant le koala et l'utilisation de la PCR marquent une avancée majeure dans la compréhension de l'épidémiologie de cette maladie. En effet, la sensibilité et la spécificité de cette méthode diagnostique avoisine les 100%.

2. Distribution géographique

Dans les quatre états possédant des populations de koalas, les prévalences s'échelonnent de 6% sur French Islands (Victoria) à 98% sur Phillip Island (Victoria). Il n'existe pas de différence significative de répartition de la maladie sur la côte Est de l'Australie, mais de fortes disparités locales existent. Seules les populations de quelques iles du sud de l'Australie sont indemnes de chlamydophilose.

La meilleure sensibilité des tests utilisés pour détecter les *chlamydia* ont permis de mettre en évidence une augmentation de la prévalence de l'infection sur tout le continent au cours des dernières décennies.

3. Prévalence de C. pecorum et de C. pneumoniae

Deux récentes études épidémiologiques, utilisant la méthode PCR, mettent en évidence la forte prévalence de *C.pecorum* au sein de populations sauvages du sud est du Queensland. Ainsi, 73% des koalas de Mutdapilly (55 km au Sud-ouest de Brisbane) sont infectés par cette espèce, mais seulement 17% présentent des signes cliniques associés. La prévalence de *C.pneumoniae* dans cette même population s'élève à seulement 21%, avec aucun cas de manifestations cliniques (Jackson M. *et al.*, 1999).

Le même constat a été fait dans une population du New South Wales (Pine Creek State Forest): 52% des animaux se révèlent infectés par *C. pecorum* alors que 12% sont positifs pour *C. pneumoniae*. Moins de 10% des koalas sont co-infectés par les deux espèces. Seuls les koalas infectés par *C. pecorum* présentent des signes cliniques dans cette étude, mais la proportion de koalas malades est réduite par rapport à la forte prévalence (Devereaux L.N. *et al.*, 2003).

Ainsi, il apparait clairement que *C. pecorum* est l'espèce la plus répandue dans les populations de koalas et est la principale responsable de la morbidité et de la mortalité. Chacune des

deux espèces est retrouvée aussi bien au niveau oculaire que urogénital, mais *C. pneumoniae* est retrouvée principalement au niveau oculaire. La co-infection par les deux espèces de *chlamydia* est possible. Dans ces cas, la part de *C. pneumoniae* dans les cas de manifestations cliniques est difficile à mettre en évidence. Seul un cas de pathologie respiratoire a été directement relié a l'infection par *C. pneumoniae* (Wardrop S. *et al.*, 1999).

Par ailleurs, les populations captives sont autant atteintes que les populations sauvages, seules les manifestations cliniques diffèrent : ainsi, dans le plus grand sanctuaire de koalas au monde situé à Brisbane (Lone Pine Koala Sanctuary), 75% des koalas sont infectés par *C. pecorum* mais aucun ne présente de manifestations cliniques (Galit T., communication personnelle)

Une étude en cours, menée par Peter Timms, tendrait à démontrer que tous les koalas sauvages seraient aujourd'hui infectés par *C. pecorum*, non pas du fait d'une importante incidence, mais du fait de la sensibilité de plus en plus importante des techniques diagnostiques utilisées (emploi de la PCR quantitative). La manifestation clinique serait alors corrélée à l'importante de la charge bactérienne.

B. Epidémiologie analytique

1. Les sources de contamination

On distingue deux sources principales impliquées dans la transmission du pathogène, l'une active et l'autre inerte :

- Les koalas infectés, asymptomatiques ou non constituent la source majeure de contamination en raison d'une période d'incubation courte et d'une dose infectante faible nécessaire à la transmission faible, cette source est la plus importante dans la transmission de la chlamydophilose chez les koalas (Whittington R., 2001).
- Le milieu extérieur contaminé par différentes secrétions ou excrétions telles que l'urine, le pap et les fèces. Ces substances se chargent en corps élémentaires qui peuvent résister plus de six jours dans les conditions environnementales (Whittington R., 2001).

La transmission de la chlamydophilose peut donc se faire de manière directe ou indirecte.

2. Les facteurs de réceptivité

- Les facteurs intrinsèques :
 - o L'âge:

Toutes les catégories d'âge sont atteintes par *C. pecorum* et *C. pneumoniae*. Cependant, la prévalence pour les deux espèces a tendance à être plus importante pour les jeunes de moins d'un an et pour les adultes de plus de 6 ans (Jackson M. *et al.*, 1999). Il existerait donc une prédisposition à l'infection pour les koalas les plus jeunes et les plus âgés.

o Le sexe :

Le sexe n'est pas un facteur majeur de réceptivité. La plupart des études montrent une prévalence équivalente chez les deux sexes. Les différences pouvant exister ne font que refléter l'organisation sociale au sein des populations ; ainsi, les koalas mâles dominants sont plus exposés que les autres et donc prédisposés à être infectés. Quant aux femelles, la prévalence augmente pour les femelles multipares (White N.A. et Timms P., 1994).

o L'individu:

Aucune étude n'existe sur la sensibilité individuelle à la chlamydophilose, mais celle-ci existe comme dans chaque espèce. Par ailleurs, le système immunitaire du koala décrit comme « paresseux», est probablement un élément clé de cette problématique, certains individus pouvant se révéler plus sensibles aux infections.

- Les facteurs extrinsèques :

o Le syndrome de stress du koala :

Le koala est une espèce particulièrement sensible au stress (Obendorf D.L., 1983). Celui-ci peut être causé par un stress environnemental (modification du milieu, surpopulation) ou physique (contact humain, attaque de prédateurs) les rendant plus vulnérables à l'infection par Chlamydia.

o L'infection par le KoRV :

Ce rétrovirus, très répandu au sein des populations de koalas est à l'origine d'une immunodépression. L'organisme ne dispose plus des moyens suffisants pour combattre l'infection et favorise la déclaration de la forme clinique. Tarlinton en 2005 a mis en évidence la relation étroite existant entre l'infection virale et bactérienne (*cf* II.V.) : les animaux infectés par le KoRV sont plus suceptibles de développer une infection à la chlamydophilose et d'en déclarer les symptômes (Tarlinton R.E. *et al.*, 2005).

3. Mode de contamination

Deux voies de transmission de la chlamydophilose sont possibles. La principale reste cependant la voie directe, par contact étroit entre individus. Les particularités du mode de contamination tiennent au fait que les *chlamydia* sont des bactéries intracellulaires, ils sont métaboliquement inactifs dans le milieu extérieur. Par ordre d'importance décroissante, on distingue :

- La voie directe:

- Par transmission vénérienne: toutes les études épidémiologiques démontrent l'importance de cette voie de transmission. La faible incidence de l'infection chez les koalas sexuellement immatures démontre le rôle primordial de cette voie de transmission.
- Par transmission en péripartum ou postpartum : 58% des jeunes koalas sont infectés alors qu'ils n'ont pas atteints la maturité sexuelle (Jackson M. *et al.*, 1999), ce qui

suggère que l'infection a eu lieu au moment de la naissance (lorsque le fœtus rampe du cloaque jusqu'à la poche) ou plus tard lorsqu'il s'alimente du pap vers ses six mois. Le passage par la voie placentaire ou lactée n'a pas été démontré.

O La transmission au cours de combat : cette voie de transmission concerne essentiellement les mâles susceptibles de se griffer au niveau de la conjonctive et ainsi transmettre l'agent infectieux

La période d'accouplement, d'août à février, favorise les contacts mâles/femelles (reproduction) mais également mâles/mâles (rivalité). Ces deux types de contacts intimes conduisent à une importante propagation de la maladie durant cette période. Cette variation saisonnière a été démontrée par l'étude de la prévalence des kératoconjonctivites : plus de cas ont été recensés en été et fin d'été / automne respectivement (Obendorf D.L., 1983) (Cockram F.A. et Jackson A.R.B., 1976).

- La voie indirecte:

- Active : certains arthropodes peuvent jouer le rôle de vecteurs en transmettant le corps élémentaire d'une conjonctive à une autre (Whittington R., 2001).
- Passive: les koalas peuvent s'infecter à partir du milieu extérieur, par inhalation, ingestion ou contact étroit avec des particules contaminées par d'autres koalas (ou autres espèces si souche chlamydienne compatible).

C. Epidémiologie synthétique

Il existe donc deux situations épidémiologiques très différentes concernant la chlamydophilose en Australie :

- Les îles du sud du continent australien (French Islands, Kangaroo Islands) qui sont indemnes de chlamydophilose.
- En situation d'enzootie sur le continent : en effet, la quasi totalité de la population est infectée par *C. pecorum* (et de façon moindre par *C. pneumoniae*) mais le niveau d'infection se maintient à un bas niveau, avec seulement une faible proportion d'animaux présentant des symptômes. Les koalas infectés asymptomatiques entretiennent la propagation de la maladie de part leur relation sociale (reproduction, combats). Cette situation est problématique pour la gestion des populations de koalas. Par ailleurs, la possibilité de voir apparaître des endémo-épizooties n'est pas négligeable bien qu'elle n'est jamais été constatée à l'heure actuelle.

L'origine de cette enzootie semblerait provenir d'une transmission interspécifique. *C. pecorum* aurait été transmis entre 200 et 50 ans auparavant du mouton au koala d'après de récentes études comparant le génome des souches de ces deux espèces (Timms P., 2005). Quant à *C. pneumoniae*, on suppose qu'elle proviendrait de reptiles (grenouilles ou serpents), communément infectés sur le continent australien (Mitchell C.M. *et al.*, 2009).

V. Immunopathogénie

Très peu de données sont disponibles concernant l'immunopathogénie de la chlamydophilose chez le koala. Les études comprennent essentiellement l'infection chlamydienne chez l'homme et les animaux de production. Cependant, l'ensemble des données se recoupent et l'on peut supposer que les informations disponibles pour ces espèces sont transposables au koala.

Quant au système immunitaire du koala (*cf* chapitre 1, II), il est dit « paresseux » mais reste, sur le plan du schéma réactionnel, comparable à celui des espèces les plus étudiées, que sont la souris ou l'homme

A. Cytopathogénie

1. Voie d'entrée et spécificité cellulaire

Selon le mode de contamination, les *chlamydia* peuvent se retrouver au niveau des différentes muqueuses de l'organisme. Pour autant, toutes les cellules ne sont pas infectées, seules les cellules épithéliales, les cellules endothéliales vasculaires et les monocytes sont les cibles du microorganisme (Byrne G.I. et Ojcius D.M., 2004). Concernant *C. pecorum* et *C. pneumoniae*, seule une infection des cellules épithéliales oculaires, pulmonaires et urogénitales a été démontrée. En effet, ces cellules épithéliales correspondent aux portes d'entrée de la *chlamydia* dans l'organisme. L'origine d'une telle spécificité de cellule cible n'est pour l'instant pas connue mais l'existence d'une interaction antigène-récepteur est supposée.

Cependant, cette spécificité connaît des limites : en effet, en 1986, Brown a prouvé qu'une souche de chlamydie isolée de la conjonctive pouvait également infectée le tractus urogénital et inversement. De plus, suite à cette transmission expérimentale, les koalas ont développé des symptômes aux deux sites bien que la transmission n'ait été réalisée que par une seule voie. Ainsi, il semblerait que la voie de transmission n'a qu'une faible part dans la manifestation de la maladie et que les *chlamydia* ont la capacité de circuler entre les différents sites d'infection (Brown A.S. et Grice R.G., 1986).

2. Phagocytose et exocytose

Le phénomène d'attachement et de pénétration dans la cellule reste mal connu : les *chlamydia* s'attacheraient aux cellules cibles par interaction électrostatique entre un antigène et un récepteur cible ; ceci induirait alors un phénomène d'endocytose qui ne dépend pas du système microtubulaire.

Suite au cycle de réplication binaire, 48 à 72 heures après l'internalisation de l'agent infectieux, le relarguage des corps élémentaires peut avoir lieu de deux façons (Hammerschlag M.D., 2002) :

- Par cytolyse, avec destruction totale de la cellule cible. Ce mode de dissémination correspond à la forme aigüe
- Par phénomène d'exocytose ou d'expulsion de l'inclusion entière, laissant la cellule hôte intacte. Ce mode de dissémination correspond à la forme chronique

Par ces deux phénomènes, l'infection se propage de proche en proche et de manière ascendante en ce qui concerne le tractus urogénital. D'un point de vue pathogénique, les lésions observées ne sont pas nécessairement directement reliées à l'effet cytopathique des *chlamydia*: l'effet délétère de l'inflammation engendrée par l'infection est la principale cause des lésions observées.

D'un point de vue lésionnel, l'infection peut se traduire par la perte de cellules épithéliales (par effet cytopathique) accompagnée généralement d'un épaississement mucosal (par réaction proliférative) et d'une modification de la structure suite à l'infiltration par les cellules immunitaires.

3. Régulation de l'apoptose (Byrne G.I. et Ojcius D.M., 2004)

Un point important de la stratégie des *chlamydia* tient au fait qu'elles peuvent intervenir sur la régulation de l'apoptose de la cellule cible. Elles peuvent favoriser l'induction de la mort cellulaire dans certaines conditions, et inhiber activement l'apoptose dans d'autres.

Il s'agit d'une véritable prise de contrôle de la cellule hôte. Ainsi, l'agent pathogène peut dans des conditions favorables se multiplier rapidement au détriment des cellules hôtes, et lorsque les conditions deviennent moins favorables (défense immunitaire notamment), les *chlamydia* ont la capacité à persister dans la cellule hôte, sans que celle-ci ne puisse mourir.

Ce phénomène est en partie responsable de la complexité du mode d'évolution de l'infection, à savoir aigue versus chronique et symptomatique versus asymptomatique.

B. La défense immunitaire non spécifique

Les corps élémentaires n'ont pas la capacité d'infecter la peau, seule la barrière épithéliale des muqueuses est soumise à la pression infectieuse des *chlamydia*. Elle dispose cependant de moyens de défense limitant l'infection par l'agent pathogène.

1. Les facteurs physiques

Les turbulences de l'air au niveau du nez, les mouvements des cils vibratiles qui tapissent l'arbre respiratoire, le balayage de la muqueuse oculaire par les paupières ou le lavage sous pression de la muqueuse urétrale par l'urine s'opposent à l'implantation des micro-organismes.

2. Les facteurs chimiques

Les facteurs chimiques sont représentés par les sécrétions comme les larmes au niveau des yeux, le mucus nasal et bronchique au niveau de l'arbre respiratoire, le mucus vaginal au niveau de l'appareil urogénital femelle et les secrétions prostatiques chez le mâle.

Ces sécrétions jouent un rôle par leur toxicité vis-à-vis des micro-organismes (acidité, lysozyme, enzymes protéolytiques) ou parce que le mucus qu'elles contiennent englue les micro-organismes et facilite leur élimination par écoulement.

Pour autant, ces différents facteurs n'ont qu'un rôle dérisoire compte tenu du mode de contamination et de la forme infectante de la bactérie. En effet, la transmission nécessite un contact étroit avec la source, il y a donc passage à travers les facteurs mécaniques et introduction directe de l'agent infectieux au niveau de la muqueuse. De plus, le corps élémentaire correspond à une forme de résistance, notamment aux pH acides et aux enzymes protéolytiques.

3. La réaction inflammatoire

Une fois la cellule épithéliale infectée, une réaction inflammatoire physiologique se met en place. Du fait de la position particulière des *chlamydia*, intracellulaire, cette réaction est initiée par les cellules infectées elles-mêmes. En effet, la présence de *C. pecorum* ou *C. pneumoniae* dans le cytoplasme déclenche l'expression d'ARNm codant différentes cytokines et chemokines tels GM-CSF (granulocyte/macrophages-colony stimulating factor), les interleukines 6 et 8. Ceci permet le recrutement des leucocytes polynucléaires, des macrophages et par la suite de lymphocytes sur le site de l'infection : l'infection est donc dans un premier temps contrôlée de manière non spécifique (Entrican G. *et al.*, 2004).

Par ailleurs, la présence de l'agent infectieux et les débris des cellules infectées engendrent la sécrétion d'autres cytokines, responsables des modifications vasculaires, de la prolifération des fibroblastes, de cellules épithéliales... Ces modifications agissent en faveur de la lutte contre l'infection, mais représentent un effet délétère sur les tissus et sont donc en partie à l'origine des symptômes observés.

Pour autant, le phénomène de phagocytose des chlamydia par les neutrophiles ou macrophages est rendue impossible : en effet, la position intracellulaire protège le microorganisme. Seules les cellules NK peuvent avoir une action non spécifique en engendrant la cytolyse des cellules infectées.

Cette réaction inflammatoire est plus ou moins intense selon le niveau d'infection des *chlamydia* : ainsi, lors du passage à la forme persistante, la production de cytokines par les cellules infectées est diminuée et la réaction inflammatoire diminue. L'infection, dans ces conditions, n'a pas de répercussion au niveau de l'organisme (Mpiga P. et Ravaorinoro M., 2006).

On voit ainsi que la réponse immunitaire non spécifique joue un rôle important dans la pathogénie de la chlamydophilose mais son efficacité pour la lutte contre l'infection est très limitée. Elle permet cependant l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire spécifique plus adaptée à la lutte contre l'infection d'un agent pathogène intracellulaire.

C. La défense immunitaire spécifique

Deux cas de figure sont à distinguer pour comprendre la place de cette réponse immunitaire : la primo-infection avec l'intervention essentielle d'une immunité à médiation cellulaire (IMC), et la réinfection pour laquelle l'immunité à médiation humorale (IMH) tient un rôle central.

1. La primo-infection

La position intracellulaire des *chlamydia* suggère que l'IMC serait plus efficace que l'IMH. L'étude de modèles animaux a permis de confirmer et d'explorer précisément cette hypothèse (Entrican G. *et al.*, 2004).

Ainsi, il a été démontré que les lymphocytes T CD4+ helper 1 (Th1) sont les seules cellules indispensables à l'établissement d'une réponse immunitaire efficace contre l'infection par les chlamydia. Les Th1 permettent une augmentation de l'opsonisation, une activation des lymphocytes T cytotoxiques, et par-dessus tout, une très forte production d'interféron γ (IFN-γ), le plus puissant chlamydiostatique connu (Mpiga P. et Ravaorinoro M., 2006). En plus d'activer les LT8 spécifiques de l'agent en présence, l'IFNγ induit la production de radicaux libres dans la cellule infectée (rôle mineur) mais surtout entraîne une inhibition de l'indoléamine 2.3-dioxygènase. Cette inhibition est responsable de l'arrêt de synthèse de tryptophane. Or, les *chlamydia* sont auxotrophes vis-à-vis de cet acide aminé. Ainsi, les *chlamydia* ne peuvent plus se diviser et sont contraintes de passer du corps réticulé à la forme persistante (Morrison R.P. et Caldwell H.D., 2002).

La balance Th1/Th2 est particulièrement importante dans le contrôle de l'infection chlamydienne : en effet, lors d'une réponse dominée par Th2, la production d'IFN-γ est trop faible pour permettre un effet chlamydiostatique. Or, le profil de cytokines favorisant la réponse Th1 s'oppose à la réponse Th2 et inversement. Plus précisément, l'IFN-γ et l'IL-12 favorisent la réponse Th1 et inhibent la réponse Th2, alors que l'IL-4 et l'IL-10 favorisent la réponse Th2 tout en inhibant la réponse Th1. Ainsi, les premières étapes de la réponse immunitaire non spécifique sont cruciales pour induire une réponse appropriée. Des recherches ont permis de mettre en évidence le rôle des cellules dendritiques et des Natural Killer dans la mise en place d'une telle réponse par la production respective d'IL-12 et d'IFN-γ (Matyszak M.K. et al., 2002).

Plusieurs facteurs peuvent contrecarer la mise en place d'une réponse immunitaire Th1 adaptée. Ainsi :

- La production précoce d'IL-6 par les cellules épithéliales infectées s'oppose à la production d'IFN-γ (Entrican G. *et al.*, 2004).
- l'infection chlamydienne pourrait favoriser la production d'IL-10 chez la cellule hôte et déclencher une réponse Th2 inefficace (Mozzato-Chamay N. *et al.*, 2000). Ceci traduirait à nouveau une formidable adaptation de la bactérie à son environnement.

Alors que l'on pourrait penser que l'effet cytotoxique des LT8 tiendrait un rôle important dans l'élimination des *chlamydia*, en fait, leur présence est nécessaire mais non indispensable. En effet, des souris dépourvues de cette lignée lymphocytaire contrôlent l'infection chlamydienne aussi bien que des souris qui en sont pourvues. Cependant, il existe des preuves évidentes que les LT8 agissent sur les cellules infectées. La raison de ce paradoxe n'est pas connu (Morrison R.P. et Caldwell H.D., 2002).

Lors de cette primo-infection, une réponse immunitaire à médiation humorale se met en place mais elle n'apporte aucun bénéfice pour la protection de l'hôte lors de la primo-infection en raison de son caractère tardif et de l'inaccessibilité des antigènes cibles.

2. La réinfection

Le rôle des LT4 et lymphocytes B est sans équivoque dans le cadre d'une protection efficace contre la réinfection. La production d'immunoglobulines (Ig) par les plasmocytes permet un contrôle de l'agent pathogène réintroduit. En effet, la muqueuse est alors tapissée d'IgA et de quelques IgG, fabriquées lors de la précédente infection et qui neutralisent l'agent avant qu'il ne puisse infectée une nouvelle cellule.

Par ailleurs, l'opsonisation est suivie de la destruction par des cellules phagocytaires spécialisées mais ce mécanisme semble plus adapté dans la prévention de la dissémination de l'infection qu'à la résolution elle-même.

Les anticorps peuvent également jouer un rôle dans la résolution de l'infection intracellulaire via le mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) dans la mesure où des anticorps chlamydiens sont retrouvés à la surface des cellules infectées (Morrison R.P. et Caldwell H.D., 2002).

D. <u>L'évolution de l'infection</u>

1. L'élimination de l'infection

Cette forme d'évolution est rare compte tenu des différentes stratégies efficaces mises en place par les *chlamydia* pour échapper au système immunitaire. Lorsque l'agent infectieux est éliminé, il est pour autant possible que les symptômes persistent du fait de la réaction inflammatoire qui peut se poursuivre après l'élimination de la bactérie ou réapparaître à l'occasion de sa réintroduction.

Ceci est un point important en cas de chlamydophilose chez toutes les espèces, la maladie et l'infection sont à considérer sur deux plans différents, l'une pouvant exister sans l'autre. Ceci est possible du fait de la réaction croisée existant entre les LPS et les HSP (Heat Shock Proteins) d'autres bactéries Gram-négatif: l'inflammation est alors maintenue, accompagnée d'hypersensibilité retardée et d'auto-immunité, responsable de la gravité des séquelles (Thibault C. et Levasseur M.C., 2001). Ainsi un animal ayant éliminé l'infection pourra continuer à manifester la maladie, entretenue par le système immunitaire.

Une étude épidémiologique en cours actuellement chez les koalas tend à prouver que cette forme d'évolution est quasi inexistante. Tous les koalas appartiendraient aux deux catégories suivantes vis-à-vis de *C. pecorum*.

2. L'infection chronique

Celle-ci correspond à la forme évolutive majoritaire existant au sein des populations de koalas. On distingue au sein de l'infection chronique, la forme asymptomatique et la forme symptomatique à bas niveau.

La bactérie est donc bien présente dans l'organisme mais grâce à l'immunité mise en place, l'infection est contrôlée sans pour autant pouvoir être éliminée. En effet, les *chlamydia* se maintiennent en équilibre entre une forme métaboliquement active que sont les corps réticulés et la forme persistante silencieuse. Cet équilibre entre l'hôte et son parasite est quasi-symbiotique, mais peut être rompu dès lors que les conditions deviennent plus favorables pour l'agent pathogène. L'excrétion bactérienne est en général assez faible. Les symptômes observés sont liés à l'intensité de la réponse inflammatoire engendrée.

3. Infection aigue

Cette forme tend à prendre de l'importance au sein des populations de koalas, et seul *C. pecorum* est mis en cause pour le moment (excepté un cas de pneumonie sévère imputable à *C. pneumoniae*).

Le système immunitaire est alors incapable de contrôler l'infection, le parasite se reproduit rapidement. L'excrétion bactérienne est dans ces conditions importante. L'effet cytopathique associé à l'intense inflammation rend cette forme systématiquement symptomatique.

Le passage d'une forme à une autre est possible dans les deux sens au cours de la vie de l'individu : une baisse de l'immunité liée au KoRV ou à un stress peuvent permettre le passage à la forme aigue alors que le pathogène « couvait » depuis des années.

Tarlinton a récemment mis en évidence une corrélation existant entre la charge virale en KoRV et la manifestation clinique de la chlamydophilose (figure 19): une faible charge virale est associée à des animaux cliniquement sains alors que pour une charge virale supérieure à 10⁸ copies d'ADN par millilitre de plasma, la manifestation clinique de la chlamydophilose est significativement plus importante (Tarlinton R.E. *et al*, 2005).

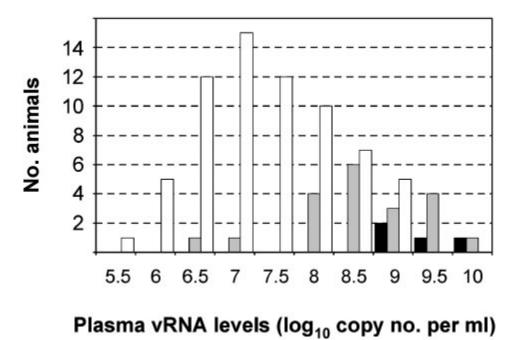


Figure 19 : Comparaison de la charge virale plasmatique en KoRV chez des koalas sains et

Colonne blanche: animaux sains; colonnes noires: animaux présentant leucémie/lymphome; colonnes grises: animaux atteints cliniquement de chlamydophilose

malades

VI. <u>Aspects cliniques de l'infection chlamydienne chez le koala</u>

Les koalas présentant une forme clinique de la chlamydophilose peuvent déclarer, un ou plusieurs des symptômes (rarement tous) tels qu'une kératoconjonctivite, une cystite, de l'infertilité et de la dyspnée.

A. L'infection de l'appareil oculaire : la kératoconjonctivite

La période d'incubation suite à l'inoculation expérimentale au niveau oculaire est de 7 à 19 jours (Brown A.S. et Grice R.G., 1986). Les mâles sont autant touchés que les femelles, l'inflammation pouvant être uni- ou bilatérale (Canfield P.J. *et al.*, 1991). Les deux espèces *C. pecorum* et *C. pneumoniae* ont été isolées au niveau des conjonctives mais la part de chacune dans la manifestation des symptômes oculaires n'est pas encore connue (Girjes A.A. *et al.*, 1993).

Cliniquement, les symptômes débutent par une hyperhémie conjonctivale accompagnée d'une épiphora séreuse synonyme d'une augmentation des secrétions lacrymales. Au bout de deux semaines, l'écoulement devient purulent et un œdème des annexes oculaires (blépharite, membrane nictitante) est observé (Cockram F.A. et Jackson A.R.B, 1974). Dans les cas aigus les plus graves, la cornée est atteinte, un œdème est alors observé ainsi qu'une néovascularisation périphérique progressant de façon centripète au bout de trois semaines. Le chémosis peut être sévère et s'étendre jusqu'aux paupières ; un pannus et une opacité marqués de la cornée (figure 20) peuvent se développer plus tard (Whittington R., 2001).



Figure 20 : Kératoconjonctivite sévère avec écoulement mucopurulent et pannus (crédit Wildlife Hospital de Beerwah)

L'évolution peut se faire, soit vers :

- une récupération totale, mais les lésions peuvent persister pendant plusieurs années.
- une forme chronique caractérisée par une kératite et une hyperhémie de la cornée.
- une complication (lésions traumatiques par grattage, surinfection et synéchies) pouvant conduire a la cécité (Obendorf D.L., 1983). Dans ce cas, les capacités et possibilités de déplacement et de préhension des aliments du koala sont affectées, conduisant à la mort de l'animal

Histologiquement, pour les cas aigus les plus avancés, la conjonctive présente une hyperplasie villositaire ainsi qu'une infiltration neutrophilique et plasmocytaire ; l'épisclère présente une congestion sévère ; un œdème, une ulcération, une néovascularisation, ainsi qu'une une fibrose et une hyperpigmentation de la cornée peuvent également être constatés (Obendorf D.L., 1983).

B. L'infection du tractus urinaire : « dirty tail disease »

La période d'incubation obtenue expérimentalement est plus longue que pour la conjonctivite, à savoir entre 25 et 27 jours (Brown A.S. et Grice R.G., 1986). A nouveau les deux espèces de *chlamydia* ont été isolées mais la prévalence de *C. pneumoniae* est moindre par rapport à celle de *C. pecorum*. Les femelles développent plus fréquemment une infection du tractus génital concomitante probablement dûe au fait que les abouchements des deux tractus proviennent du sinus urogénital commun (Obendorf D.L., 1981). Les koalas immatures sont plus épargnés ainsi que les koalas captifs (Canfield P.J. *et al.*, 1989).

La principale caractéristique clinique est l'incontinence urinaire qui a valu la dénomination de « dirty-tail disease » ou « wet bottom » (maladie de la queue souillée) : la fourrure au niveau de la croupe du koala est alors colorée en jaune-orange (figure 21) et dégage une forte odeur d'urine atypique (liée à l'élimination des phénols des feuilles d'eucalyptus). L'incontinence se manifeste par

une pollakiurie, une dysurie, une strangurie pouvant provoquer une éversion du cloaque (Brown A.S. et al., 1987).



Figure 21 : "Wet bottom" caractéristique de l'incontinence urinaire (photo personnelle)

Ces symptômes sont dus à l'inflammation de la vessie, cette cystite étant généralement importante. La paroi est œdèmatiée, épaissie (figure 22), empêchant la bonne dilatation de celle-ci : ainsi, l'incontinence est liée à un défaut de stockage. Par ailleurs, la cystite n'est que le point de départ de l'infection qui peut remonter jusqu'aux reins via les uretères. Lorsque le fonctionnement rénal est atteint suite au développement d'une pyélonéphrite, d'une hydronéphrose ou d'une fibrose, l'état général est altéré jusqu'à causer la mort (généralement sur un mode d'évolution chronique, la phase aigue n'ayant pas d'atteinte sur l'état général).

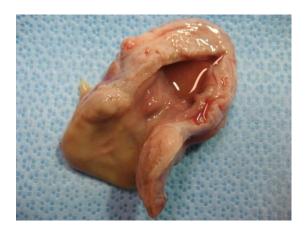


Figure 22 : Œdème sévère de la vessie chez un koala atteint de chlamydophilose (crédit Wildlife Hospital de Beerwah)

Une des complications de la souillure de la croupe par l'urine est la myiase du périnée extérieurement. Les surinfections bactériennes (Staphylococcus coagulase positive, Streptococcus

hémolytique, *E.coli...*) sont fréquentes, celles-ci profitant des modifications physico-chimiques de l'urine pour se développer (Obendorf D.L., 1983).

Au niveau tissulaire, les modifications observées pour l'urètre, la vessie et les uretères correspondent essentiellement à une érosion de la muqueuse accompagnée de profondes ulcérations, ainsi qu'une infiltration de plasmocytes et d'agrégats lymphocytaires. Au niveau du rein, une dégénérescence tubulaire, une atrophie glomérulaire, une fibrose interstitielle, une pyélonéphrite plus ou moins généralisée ainsi qu'une hydronéphrose ont été observées (Obendorf D.L., 1983) (Canfield P.J. et al., 1989).

C. L'infection du tractus génital : infertilité

Cet aspect est beaucoup plus étudié chez la femelle qu'il ne l'est chez le mâle koala. Ceci s'observe à plus long terme lors d'évolution chronique de la maladie : une période de 4 mois a été observée chez la femelle avant de constater des modifications structurales du tractus génital haut (Brown A.S. *et al.*, 1984). Par ailleurs, l'infertilité peut être l'unique signe clinique de l'infection du tractus génital. A partir du bas appareil urinaire, une inflammation ascendante du tractus génital se met en place jusqu'à atteindre l'utérus et les ovaires chez la femelle et le testicule chez le mâle (démontré chez l'homme) : dès lors que ces organes sont atteints, les risques d'infertilité sont importants. *C. pecorum* est majoritairement impliqué par rapport à *C. pneumoniae*. Des surinfections peuvent se produire, ce qui amplifie la gravité des lésions et des signes cliniques (Obendorf D.L., 1988). Les lésions du tractus urogénital tendent à se développer après l'acquisition de la maturité sexuelle (White N.A. et Timms P., 1994).

Chez la femelle, les lésions varient d'une légère vaginite sans atteinte du tractus génital haut, jusqu'au pyomètre, à la salpingite et à des atteintes kystiques de la bourse ovarienne (Obendorf D.L. et Handasyde K.A., 1990). Un écoulement cloacal mucopurulent est constaté dans les cas de métrite sévère. Les cornes utérines sont alors épaissies uni- voire bilatéralement. L'accumulation de fluides mucopurulents dans l'utérus est favorisée par un défaut de drainage lié d'une part à l'œstrus (augmentation de la kératinisation et épaississement mucosal) (Backhouse T.C. et Bolliger A., 1961) et d'autre part aux phyto-œstrogènes présents dans les feuilles d'eucalyptus (Handasyde K.A. *et al.*, 1990). Des kystes de la bourse ovarienne atteignant jusqu'à 8 cm de diamètre ont également été observés (figure 23). L'infertilité s'observe lorsqu'il y a atteinte de l'un ou l'autre de ces deux organes (utérus pour l'implantation ou ovaire pour la production d'ovocytes). La formation des kystes ovariens est due à l'oblitération de l'ostium de la bourse ovarienne consécutive à l'inflammation de celle-ci; par ailleurs, l'anatomie atypique de l'ovaire et de la bourse chez le koala prédispose à la formation de kystes (repli du péritoine) (Finckh E.S. et Bollinger A., 1963).



Figure 23 : Echographie d'un kyste de la bourse ovarienne gauche (22,9 mm) (crédit Wildlife Hospital de Beerwah)

Les lésions histologiques varient énormément en termes de sévérité et d'extension. Des modifications de structure de type érosion et hyperplasie sont observées ; malgré l'atteinte des bourses ovariennes, l'ovaire ne présente pas de modification structurale. L'infiltration est d'abord polynucléaire puis lymphoplasmocytaire (Brown A.S. *et al.*, 1987).

Peu d'études ont été réalisées concernant l'infection du tractus génital mâle du koala : cellesci se limitent à l'étude de la prostate (Hemsley S. et Canfield P.J., 1997) : une prostatite plus ou moins sévère est observée sur la plupart des koalas cliniquement atteints par la chlamydophilose. On suppose que la douleur liée à l'inflammation de cet organe pelvien peut conduire à une atteinte de l'état général. Un écoulement mucopurulent au niveau du prépuce peut être la seule traduction clinique de l'atteinte du tractus génital. Des abcès prostatiques peuvent également compliquer la prostatite (figure 24).



Figure 24 : Echographie de la prostate d'un koala atteint de chlamydophilose (crédit Wildlife Hospital de Beerwah)

Présence d'un abcès prostatique de 7,8 mm

L'atteinte du tractus génital haut est largement étudié chez l'homme : il s'agit de la première cause d'orchi-épididymite causant douleur, gonflement et congestion du scrotum (Mulcahy F.M. *et al.*, 1987). L'infection par *C.trachomatis* chez l'homme affecte la fertilité de différentes manières : augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, diminution de la mobilité et de la concentration, modification de la morphologie (Gallegos G. *et al.*, 2008). Ceci n'est pas démontré chez le koala.

Cependant, pour des raisons de gestion des populations et de conservation de l'espèce, l'insémination artificielle du koala est en cours d'étude et les premiers résultats sont encourageants ; du fait de la forte prévalence de *C. pecorum*, il est nécessaire de dépister la présence de l'agent et de réaliser le traitement de la semence par antibiothérapie *in vitro* (Bodetti T.J. *et al.*, 2003) mais l'étude ne s'intéresse pas à la qualité de la semence à pouvoir féconder naturellement l'ovocyte.

D. La proctitite

Un seul cas de proctitite directement reliée à l'infection par *C.pecorum* est reportée dans la littérature (Hemsley S. et Canfield P.J., 1996) : un koala mâle âgé présentant par ailleurs une conjonctivite bilatérale et une infection du tractus urogénital. Aucun signe clinique n'est associé à cette inflammation de l'anus, mais les *chlamydia* sembleraient pouvoir être dispersées dans les fèces.

E. <u>L'infection du tractus respiratoire : rhinite et pneumonie</u>

Cet aspect symptomatologique est relativement peu documenté car relativement bénin (ou rarement grave) par rapport aux autres symptômes. Il est d'ailleurs important de distinguer l'appareil respiratoire haut et bas.

En effet, il n'est pas rare d'observer une rhinite associée à une kératoconjonctivite. Celle-ci se manifeste par un jetage plus ou moins purulent selon le stade d'évolution (figure 25), un sifflement et de difficultés à respirer; les muqueuses sont hyperhémiques et l'infiltration est majoritairement plasmocytaire et neutrophilique (Brown A.S. *et al.*, 1987). Il semblerait que cette rhinite ne soit pas primaire, mais qu'elle trouve son origine dans la contamination descendante de la sphère oculonasale. *C. pecorum* et *C. pneumoniae* sont toutes deux isolées sans pour autant connaître la part d'implication de chacune des deux espèces.

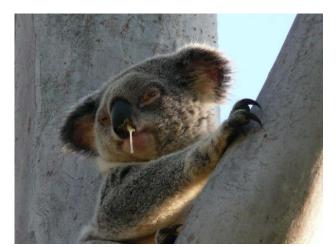


Figure 25 : Jetage mucopurulent d'un koala atteint de chlamydophilose (crédit Wildlife Hospital de Beerwah)

Concernant l'appareil respiratoire profond, de nombreux cas de bronchopneumonies ont été décrits, sans pouvoir prouver l'implication des *chlamydia* mais sans pouvoir pour autant l'exclure de certains cas non élucidés sur le plan étiologique : en effet, la plupart des cas de bronchopneumonie ont pu être directement reliés à l'infection par *Bordetella bronchiseptica* et *Cryptococcus neoformans* (Canfield P.J. *et al.*, 1986) mais l'intervention de *C. psitacci* n'a pas été prouvée à l'époque.

Une seule étude rapporte le cas d'une infection naturelle à *C. pneumoniae* provoquant une maladie respiratoire sévère et étendue dans une population captive (Wardrop S. *et al.*, 1999). Les difficultés respiratoires observées s'accompagnaient de sifflement, toux et jetage mucopurulent.

VII. Diagnostic

Le diagnostic différentiel est quasi inexistant chez le koala; il devrait être fait avec les autres causes de kératoconjonctivite (non décrites chez le koala), les autres causes de cystite et d'affection rénale (peu décrites) et enfin les autres causes d'infertilité acquises (l'origine alimentaire étant l'une des principales causes soulevées par la présence de phyto-œstrogènes dans les feuilles d'eucalyptus) (Handasyde K.A. *et al.*, 1990).

A. Les éléments de suspicion de suspicion d'une chlamydophilose

1. Diagnostic clinique

Aucun symptôme n'est pathognomonique mais l'association de symptômes de kératoconjonctivite et de « wet bottom », compte tenu de la forte prévalence de la chlamydophilose, oriente fortement le diagnostic.

2. Diagnostic paraclinique

a. L'analyse urinaire

L'analyse d'urine est à interpréter à la lumière de l'examen clinique, il n'apporte que des renseignements complémentaires sur l'évolution des symptômes urinaires et sur le pronostic. Parmi les modifications constatées, on recense (Obendorf D.L., 1983) :

- Une protéinurie pouvant être d'origine inflammatoire (cystite le plus fréquemment) et/ou rénale dans les cas d'affection graves
- Une hématurie et une leucocyturie
- La présence de débris cellulaires au culot
- La présence de bactéries à l'ECBU lors de complications infectieuses (E. coli, Staphylococcus spp. ...)
- Une diminution de la densité urinaire lors d'insuffisance rénale.

b. L'analyse biochimique et hématologique (Canfield P.J. et al., 1989)

Les modifications observées ne sont pas systématiques et précises. L'anémie et l'hypoprotéinémie sont les deux critères fréquemment observés lors d'affection par la chlamydophilose avec atteinte du tractus uro-génital.

Lors d'atteinte rénale, l'urée et la créatinine sont augmentées.

c. L'examen échographique

C'est l'examen de choix pour évaluer l'intensité de l'infection au niveau urogénital. Elle est rapide, non invasive et précise. Les modifications observables sont :

- chez le mâle et la femelle : des images de cystite (épaississement de la paroi, caillot...), urétérite et modifications rénales (hypertrophie, échogénicité modifiée...) dans les cas d'atteintes graves
- chez le mâle : des images de prostatite (hypertrophie, modifications échogénicité...), abcès, voire d'orchi-épididymite
- chez la femelle : la présence de kystes des bourses ovariennes (formation circulaire anéchogène). Dans les cas compliqués, des images classiques de pyomètre sont observables.

d. L'examen radiographique (Brown A.S. et al., 1984)

Cette technique permet de mettre en évidence la présence de kystes des bourses ovariennes ainsi qu'un élargissement des cornes utérines, deux modifications pouvant apparaître chez la femelle infectée. Cette technique permet d'orienter le diagnostic. Cependant, la technique employée est invasive, car elle nécessite de créer un pneumopéritoine par insufflation d'air au niveau abdominal ; ainsi un contraste radiographique est obtenu. Il n'est jamais utilisé en routine.

3. <u>Diagnostic nécropsique</u> (Obendorf D.L., 1983)

Cet examen n'apporte aucune confirmation du diagnostic ; il permet simplement d'évaluer l'étendue des lésions au niveau urogénital ou pulmonaire (non décrit dans la littérature). Les lésions sont de type inflammatoire avec modification structurelle des organes selon la durée d'évolution de celles-ci. Sont ainsi constatées:

- des modifications de taille : hypertrophie des organes, épaississement des muqueuses
- des modifications de couleur : congestion voire nécrose
- des modifications de consistance : augmentation lors de fibrose associée
- la présence d'ulcération des muqueuses parfois observable au niveau de la vessie
- la présence de décharge purulente
- la présence d'hémorragies

Cette étude nécrosique peut par ailleurs être associée à une étude histologique afin de caractériser les lésions de façon plus précise. Les études histologiques des tissus infectés par la chlamydophilose chez le koala portent essentiellement sur l'appareil génital de la femelle, le bas appareil génital mâle (Hemsley and Canfield 1997), ainsi que l'appareil urinaire haut mâle et femelle.

B. La confirmation du diagnostic

Les méthodes d'identification des infections chlamydiennes chez le koala ont été adaptées des méthodes développées chez l'homme, à savoir la culture cellulaire, la détection d'antigènes, d'anticorps et plus récemment les techniques de biologie moléculaire.

1. Les méthodes de diagnostic indirectes

Le test de fixation du complément

Le développement de cette méthode a permis dans un premier temps d'augmenter le nombre d'études sur l'infection du koala dans les années 80. Le lipopolysaccharide est un antigène faisant partie du « groupe CFT », capable d'induire la formation d'anticorps fixant le complément : l'antigène utilisé provient de souches d'origine bovine et plus récemment de souches isolées chez le koala (Osawa R. *et al.*, 1990).

Cette méthode présente l'avantage d'être relativement simple, peu coûteuse et rapide, et permet d'évaluer l'exposition à l'agent infectieux. Elle a largement été utilisée pour les études épidémiologiques. Cependant, les antigènes employés se sont révélés particulièrement peu sensibles (Brown A.S. *et al.*, 1984) (Girjes A.A. *et al.*, 1993). Tous les koalas présentant une infection aigüe étant séronégatifs (Jackson A.R. et Cockram F.A., 1981), le manque de sensibilité a d'abord été rapporté au statut sérologique de l'animal : le temps de séroconversion est estimé à près de 3 à 4 mois chez le koala (Brown A.S. et Grice R.G., 1986). Par ailleurs, des forts titres en anticorps ont été mis en évidence chez des koalas cliniquement sains (Jackson A.R. et Cockram F.A., 1981), laissant penser à d'éventuelles réactions croisées.

Cette méthode a été progressivement abandonnée au profit d'autres techniques ; la sensibilité par comparaison à la culture cellulaire, s'est révélée particulièrement faible, à seulement 7% (Weigler B.J. *et al.*, 1988) et le nombre de faux positifs s'élève quant à lui à 43% (White N.A. et Timms P., 1994).

ELISA indirect

Cette méthode a succédé au test de fixation du complément, elle présente les mêmes avantages que la méthode précédente tout en étant beaucoup plus spécifique et sensible (Ueno H., *et al.*, 1990). Cette sensibilité a été démontrée comme étant 16 fois supérieure au test de fixation du complément grâce à l'utilisation de protéines recombinantes (Emmins J.J., 1996).

Cette méthode est soumise à différentes contraintes : le temps de séroconversion du koala est long et la réponse humorale du koala contre la chlamydophilose est faible. Chez l'homme, les titres en anticorps sont faibles lors d'une infection à la chlamydophilose (Darougar S., 1985). Ceci s'explique par le fait que l'infection ait lieu au niveau des muqueuses, favorisant principalement la production d'anticorps au niveau de celles-ci (Weigler B.J. *et al.*, 1988).

Cependant, il existe encore assez peu de données comparant les deux méthodes indirectes afin d'évaluer précisément leur sensibilité à différents moments de l'infection (étude cinétique par exemple). Cependant, la méthode indirecte reste un bon moyen d'étude épidémiologique (Whittington R., 2001).

D'autres tests de type indirect ont été développés afin d'augmenter la rapidité d'obtention des résultats et de disposer de techniques avec une meilleure sensibilité, comme l'immuno-dot blot réalisable en 16 heures (Girjes A.A. *et al.*, 1993) mais le développement de kits spécifiques du koala réalisable sur le terrain n'a pas été réalisé : ces tests sont donc peu utilisés, les méthodes directes étant privilégiées.

2. Les méthodes de diagnostic directes

La culture cellulaire

Cette méthode a très longtemps été la référence en matière de diagnostic de la chlamydophilose, tant pour le koala que pour les autres espèces. La culture est obtenue à partir d'écouvillons oculaires ou génitaux, ainsi qu'à partir de n'importe quel autre tissu infecté (Cockram F.A. et Jackson A.R.B., 1974) (Brown A.S. et Grice R.G., 1984).

Les œufs embryonnés de poussins ont d'abord été utilisés avec succès pour isoler les chlamydia de koalas symptomatiques (Cockram F.A. et Jackson A.R.B., 1981). Cependant des erreurs par défaut associées à une évolution clinique récente ont été rapportées. Plus récemment, des cellules de singe ont été utilisées (Buffalo-Green Monkey), montrant des résultats similaires à ceux obtenus avec les œufs embryonnés (Canfield P.J. et al., 1991). Les corps élémentaires sont colorés par la coloration de Giemsa et l'observation directe des inclusions est réalisée au microscope, grossissement x400. La forte spécificité et sensibilité de cette méthode (supérieures à 95%) est le point fort de cette méthode, et pour cette raison elle a longtemps été considérée comme le « gold standard» en matière de diagnostic de la chlamydophilose.

Cette méthode est néanmoins uniquement utilisée dans le cadre de recherches scientifiques, et non en routine, pour plusieurs raisons :

- sa réalisation est particulièrement longue : plusieurs semaines
- seulement certains laboratoires sont habilités et capables à réaliser cette technique
- les conditions de collecte (sans contamination), de transport (réfrigéré avec écouvillon en aluminium) et de stockage (congélateur à 80°C) des échantillons doivent être très rigoureusement respectées (Canfield P.J. *et al.*, 1991)
- seuls les corps élémentaires viables peuvent être détectés

De plus, les méthodes de dépistage basées sur la recherche de matériel génétique plus fiables ont permis de démontrer que la culture cellulaire était moins sensible que précédemment estimée. Wood and Timms ont rapporté que la culture cellulaire de *chlamydia* chez le koala avait une sensibilité de seulement 36% mais une spécificité de 100% (méthode de référence par technique ELISA direct) (Timms P. et Wood M.M., 1992). Cette faible sensibilité est imputable aux contaminations et aux conditions de transport. D'autres études ont démontré une sensibilité de 70-80% (Fowler A., 1997).

Ainsi, cette technique tend à être de moins en moins utilisée en matière de diagnostic, mais son utilisation en recherche sur la chlamydophilose est toujours privilégiée.

La mise en évidence d'antigènes

Il s'agit des méthodes immunoenzymatiques directes (ELISA, Immuno dot blot). On distingue deux types de tests : les tests rapides et les tests de laboratoire.

Le test rapide : Clearview Test ND

Clearview Chlamydia MF est un immunodosage rapide de détection directe qualitative de l'antigène des Chlamydia développé pour la médecine humaine, spécifiquement pour la recherche de C. trachomatis au niveau urogénital; ce test est particulièrement sensible (93.8% chez la femme et 77.8% chez l'homme) et spécifique (99.8% et 97.5% respectivement), la méthode de référence étant la PCR (Matthews R. et al., 1996). Les prélèvements sont réalisés à partir d'écouvillons génitaux et/ou à partir d'urine.

Les anticorps utilisés par ce test sont dirigés contre un épitrope du LPS de chlamydia, ainsi il peut détecter *C. psitacci*, *C. pneumoniae* et *C. pecorum*. Son utilisation dans le cadre du diagnostic de la chlamydophilose chez le koala est ainsi possible. Pour autant aucune étude de sensibilité et de spécificité n'a été réalisé chez d'autres espèces que l'homme. Cependant sa rapidité, sa facilité d'utilisation et sa sensibilité en font un outil diagnostique de choix pour une pratique clinique quotidienne (exemple du Wildlife Hospital de Beerwah).

Les techniques ELISA antigène

Ces tests ont été largement décrits dans la littérature scientifique. Les avantages des techniques ELISA reposent sur la facilité de collecte des prélèvements sur le terrain, de conservation et sur la rapidité de réalisation et la reproductibilité du test (Timms P. et Wood M.M., 1992).

La sensibilité de ces tests s'élève à 70-90% (Canfield P.J. *et al.*, 1991) (Timms P. et Wood M.M., 1992) et la spécificité à 80-90% (Whittington R., 2001). La méthode de référence étant la culture cellulaire.

Des anticorps polyclonaux dirigés contre des souches de *chlamydia* du koala (antigène du corps élémentaire), ainsi que les anticorps monoclonaux dirigés contre les immunoglobulines du koala sont obtenus par immunisation chez le lapin et/ou le mouton (Girjes A.A. *et al.*, 1993) (Ueno H. *et al.*, 1990).

Certains résultats montrent une grande proportion de faux négatifs (89%) (Weigler B.J. et al., 1988) par l'utilisation de cette technique montrant les limites de cette méthode de diagnostic. Ces techniques sont utilisées dans le cadre d'études épidémiologiques, bien qu'elles soient de plus en plus délaissées au profit de techniques plus modernes.

L'immuno-histochimie

Il s'agit d'une technique de diagnostic *post mortem*. L'observation directe des inclusions étant rendu difficile malgré l'utilisation de colorations telle Giemsa ou Machiavello (Timms P., 1993), des techniques plus sensibles ont été développées. Des anticorps polyclonaux ou

monoclonaux généralement dirigés contre le LPS des *chlamydia* marqués à la fluorescéine ou par la peroxydase sont utilisés sur des coupes histologiques (Palmer D.G. *et al.*, 1988) (Hemsley S. et Canfield P.J., 1996) (Hemsley S. et Canfield P.J., 1997). Cette technique présente l'avantage d'être très sensible et spécifique (pas de faux positifs par observation directe des inclusions) ; par ailleurs, la répartition des bactéries ainsi que l'analyse semi-quantitative peuvent être réalisées grâce à cette technique.

Pour autant, cette technique est coûteuse et longue à réaliser, elle n'est réservée qu'aux études histopathologiques (peu de publications).

Techniques de biologie moléculaire : PCR, hybridation et séquençage

Ces techniques se sont développées ces quinze dernières années, elles constituent aujourd'hui le « gold standard » en matière de diagnostic de la chlamydophilose chez le koala, comme chez les autres espèces (Mahdi O.S. *et al.*, 2001). Les avantages de l'utilisation de telles techniques sont nombreux : les prélèvements sont simples à réaliser sur le terrain (écouvillonnages cloacaux ou oculaires), le transport et la conservation ne nécessitent pas de conditions particulières (basse température), les résultats sont rapides ; le point le plus important de l'utilisation de ces techniques repose sur la sensibilité et spécificité, ce qui en fait la technique la plus précise en matière de diagnostic. La détection ne se limite par aux corps élémentaires (comme pour la culture cellulaire), et une faible quantité de matériel (dix bactéries) permet d'obtenir des résultats (Rasmussen S. et Timms P., 1991). Les limites de cette technique concernent le coût élevé (matériel et personnel).

La PCR peut permettre le typage de l'espèce par utilisation de sondes spécifiques et être associée au séquençage pour identifier la souche (Girjes A.A. *et al.*, 1989) (Devereaux L.N. *et al.*, 2003). Le tableau VI rapporte les différentes cibles utilisées dans la littérature pour le diagnostic de la chlamydophilose chez le koala : il est possible de faire un diagnostic plus ou moins précis sur le plan taxonomique. Ces études génétiques ont pour but de déterminer l'origine de la chlamydophilose chez le koala et son évolution par comparaison génétique avec les autres souches infectant d'autres espèces : ainsi, il a été démontré que *C pecorum* a été transmis à partir de souches de ruminants il y a 50-200 ans (Sherwin W.B. *et al.*, 1997) et *C. pneumoniae* pourrait provenir de souches reptiliennes (Wardrop S. *et al.*, 1999) ; de nombreuses recherches sont actuellement en cours sur le sujet. Les principales cibles de cette technique sont exposées dans le tableau VI.

L'utilisation de la PCR quantitative a permis de mettre en évidence la très forte prévalence de *C. pecorum* au sein des populations sauvages de koalas : près de 100% des koalas prélevés sont infectés mais la quantité de matériel infectant est très variable. Les koalas cliniquement atteints présentent une forte charge de bactéries systématiquement (supérieure à 500 copies en fin d'analyse PCR), alors que les koalas cliniquement non atteints se divisent en deux catégories, ceux présentant moins de 10 copies, considérés comme colonisés et ceux ayant entre 10 et 100 copies, infectés chroniques (Timms P., communication personnelle).

Classification	Gène cible	Amorces PCR	Publications
Chlamydiales	Région de 298 paires de base du gène codant pour l'ARN 16S ribosomal	16SIGF et 16SIGR	(Everett K.D.E. <i>et al.</i> , 1999)
	Région de 72 paires de base du gène codant pour l'ARN 16S ribosomal	16S rt F et 16S rt R	(Markey B. <i>et al.</i> , 2007)
Chlamydiaceae	Région de 570 paires de base du gène ompB		(Jackson M. <i>et al.</i> , 1999)
Chlamydia pecorum	Région de 380 paires de bases du gène ompA codant pour le domaine IV de MOMP	CPeNTVD3 et CPeNTVD4	(Devereaux L.N. et al., 2003)
	Région de 480 paires de bases du gène ompA codant pour le domaine IV de MOMP	<i>MJRVD3</i> et <i>MJRVD4</i>	
Chlamydia	Région de 365 paires de bases du gène ompA codant pour le domaine IV de MOMP	Cpn5N et Cpn3N	
pneumoniae	Région de 450 paires de bases du gène ompA codant pour le domaine IV de MOMP	Cpn5p et Cpn3p	

Tableau VI : Cibles des amorces PCR utilisées pour le diagnostic de chlamydophilose

VIII. Le Traitement

Peu de publications se sont intéressées au traitement de la chlamydophilose chez le koala, contrairement à l'homme : ainsi le traitement non compliqué de la chlamydophilose chez l'homme repose sur différentes familles d'antibiotiques (Mahdi O.S. *et al.*, 2001) :

- les tétracyclines : en utilisation locale et parentérale, la doxycycline donne de bons résultats mais son utilisation prolongée, ainsi que les complications associées tendent a réduire leur utilisation
- les macrolides : il s'agit de la famille de référence. L'érythromycine a d'abord été utilisée, avec de bons résultats mais le mode d'action la rend peu efficace pour l'élimination de l'agent. Ainsi, l'azithromycine représente le traitement de choix aujourd'hui, il s'agit d'un dérivé de l'érythromycine, son efficacité est comparable à celle des tétracyclines en une seule prise. Elle empêche la synthèse protéique et prévient la transformation en corps élémentaire.
- Les phénicolés : le chloramphénicol, bactériostatique large spectre, est l'antibiotique le plus efficace contre les infections du tractus uro-génital, notamment la chlamydophilose ; les graves complications associées à son utilisation (aplasie médullaire, névrite, avortement...) ont conduit à l'interdire chez l'homme (Osborne N.G., 1992) et chez les espèces de rente. Certaines souches de *C. trachomatis* sont par ailleurs non sensibles à cette molécule

Le traitement de la chlamydophilose du koala est très limité, toutes les applications humaines ne sont pas transposables au koala. Les premiers essais de traitement avec de l'oxytétracycline en application locale (collyres) n'ont pas montré de résultats satisfaisants malgré leur utilisation prolongée (Cockram F.A. et Jackson A.R.B., 1976). Les essais de traitement par voie parentérale se sont révélés particulièrement nocifs : l'utilisation de l'oxytétracycline et de l'érythromycine ont eu des répercussions fatales sur les koalas. En effet, l'antibiothérapie s'accompagne d'une perte de poids sévère (près de 30%) conduisant inévitablement à la mort de l'animal malgré l'amélioration clinique (Carrick F.N. et Wood A.D., 1986). Ainsi, ces deux molécules sont totalement proscrites des protocoles pour le koala.

Aucune famille d'antibiotiques n'est dépourvue d'effet nocif sur la flore digestive du koala, aussi chaque traitement antibiotique doit être accompagné d'une supplémentation alimentaire pour lutter contre la perte de poids (Osawa R., 1992). Les molécules ayant le moins d'effets nocifs par voie parentérale sont la doxycycline, l'enrofloxacine et le chloramphénicol.

L'efficacité de l'utilisation du chloramphénicol a été prouvée dans une étude récente (Markey B. et al., 2007). Quatorze koalas cliniquement atteints par la chlamydophilose ont été traités pendant 45 jours par injection sous cutanée à 60 mg/kg de chloramphénicol SID (une fois par jour), ainsi que par application locale au niveau des yeux de collyre contenant du chloramphénicol et de l'acétate d'hydrocortisone accompagnée de collyre de dexaméthasone BID (deux fois par jour) pendant 45 jours pour les animaux souffrant de conjonctivite. La charge microbienne a été évaluée sur écouvillons oculaires et urogénitaux pendant plus de 60 jours par technique de PCR quantitative en temps réel. Les résultats ont montré une nette efficacité du traitement puisque deux semaines après le début du traitement, les chlamydia n'étaient plus détectables et ce, même deux semaines après l'arrêt du traitement (figure 26). En revanche, le traitement topique nécessite d'être prolongé d'après cette même étude, du fait de la présence de chlamydia en fin de traitement au niveau des yeux sur la plupart des koalas.

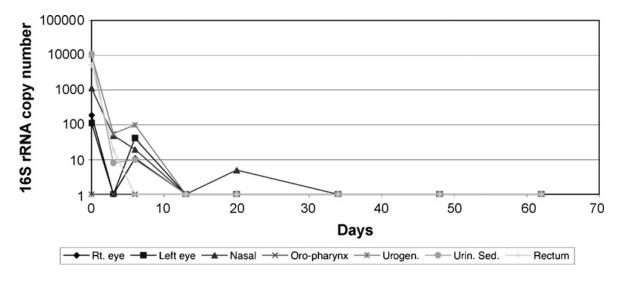


Figure 26 : Suivi de la charge chlamydienne sur différents organes par RT-PCR chez un koala atteint de kératoconjonctivite bilatérale et "dirty tail" pendant le traitement complet (Markey B. et al, 2007)

Rt. Eye = œil droit ; Left eye = œil gauche ; Urogen. = tractus urogénital ; Urin. Sed. = sédiments urinaires

En pratique, le protocole utilisé s'inspire de cette étude. Au Wildlife Hosptital de Beerwah, le centre hospitalier pour faune sauvage recevant près de 200 koalas atteints de chlamydophilose par an, la démarche thérapeutique est la suivante (Gillet A., communication personnelle) :

- L'infection chlamydienne est tout d'abord objectivée sur des critères cliniques et par test diagnostique rapide (Clear View Test)
- Une injection de chloramphénicol SC à 60 mg/kg SID pendant 45 jours
- Une pommade oculaire est appliquée contenant du chloramphénicol à 10 mg/g et acétate d'hydrocortisone à 5 mg/g ainsi qu'un collyre contenant de la déxaméthasone à 1 mg/ml BID pendant 45 jours pour les animaux présentant une kératoconjonctivite uni ou bilatérale
- En cas de cystite, l'antibiothérapie est adaptée selon l'antibiogramme dans le cas de surinfections
- Traitement symptomatique si complication de l'infection
- Contrôle clinique deux semaines après l'arrêt du traitement avec prolongation du traitement initié ou administration de corticoïdes à dose anti-inflammatoire en SC et en topique, le cas échéant
- Les animaux sont identifiés avec une puce et une boucle avant d'être relâchés, afin de disposer d'un suivi dans le cas d'un retour dans la structure d'accueil.

Quelques cas particuliers de prise en charge viennent s'ajouter à ce protocole :

- Les femelles présentant des kystes ovariens à l'échographie sont traitées chirurgicalement (ovariectomie) si elles sont susceptibles d'intégrer un programme éducatif et donc être détenu en captivité par la suite : en effet, éthiquement, il n'est pas possible de relâcher une femelle stérilisée. Les femelles ne remplissant pas ces critères sont euthanasiées.
- Les koalas présentant un score corporel trop faible sont euthanasiés. La période d'évolution de la maladie étant souvent importante pour ces animaux, le taux d'échec est élevé et pour des raisons éthiques, l'euthanasie est pratiquée systématiquement.

Un cas de rémission spontanée a été décrit concernant une kératoconjonctivite d'origine chlamydienne chez un koala (Cockram F.A. et Jackson A.R.B., 1974). Pour autant, la plupart des koalas admis pour cas chronique sont traités plus difficilement que lors de cas aigus. En effet, des séquelles importantes s'installent dans les cas chroniques, pouvant perturber le fonctionnement d'organes comme le rein.

Le problème majeur du traitement de la chlamydophilose repose sur le cycle particulier et sur sa capacité de l'agent à échapper aux défenses naturelles ou thérapeutiques. En effet, le chloramphénicol agit en tant que bactériostatique en se liant à la sous-unité 50S de l'ARN ribosomal, empêchant la synthèse protéique (Osborne R., 1992) ; cette inhibition de synthèse conduit non pas à l'élimination de la bactérie mais au passage à la forme persistante métaboliquement inactive mais en position intracellulaire latente (Mpiga P. et Ravaorinoro M., 2006). Cette transformation est par ailleurs réversible à l'arrêt du traitement antibiotique. Ainsi le traitement peut être responsable du passage de la forme aigue ou chronique à la forme chronique à bas bruit : l'antibiothérapie n'apporte qu'une solution à court terme et ne permet pas l'élimination de la bactérie.

Aucune étude ne s'est intéressée à la sensibilité de *C. pneumoniae* au protocole précédemment cité. Par ailleurs, des résistances aux macrolides et aux tétracyclines ont été démontrées chez l'homme (Dessus-Babus *et al.*, 1998), alors qu'aucune n'a été reportée chez le koala vis-à-vis du chloramphénicol.

IX. Prophylaxie

A. Sanitaire

Celle-ci n'est applicable qu'au sein de populations captives de koalas. On distingue alors deux cas de figure :

- 1) Une population indemne de chlamydophilose (exemple des zoos ou sanctuaires). Il est important de s'assurer du maintien de ce statut par la réalisation régulière d'analyse sérologique, ou à défaut de séronégativité, par dépistage régulier de l'agent par technique PCR. Lors de l'introduction d'un nouvel individu, celui-ci doit être contrôlé par méthode directe et indirecte : si les résultats sont négatifs, il peut être introduit, dans le cas contraire, une mise en quarantaine accompagnée d'un traitement adapté est nécessaire. Le mode de transmission étant essentiellement direct, la protection du milieu extérieur n'est pas fondamentale ; des règles basiques d'hygiène sont à respecter (désinfection du matériel et du personnel avant introduction, nettoyage quotidien des enclos...). Le glutaraldéhyde et les chloramines sont les deux types de désinfectant utilisés (Pye G., 2006). Le contrôle de l'infection est donc privilégié en amont, afin d'éviter son introduction (Brown A.S. et Woolcock J.B., 1987).
- 2) Une population non indemne de chlamydophilose (exemple du Wildlife Hospital recevant les cas de chlamydophilose clinique). Dans ce cas, le contrôle est privilégié en aval. Les koalas sont isolés dans des enclos individuels dont l'accès est restreint et contrôlé. L'usage des pédiluves est indispensable ainsi qu'une hygiène stricte du personnel et du matériel afin d'éviter la contamination par voie indirecte. Les individus sont traités par antibiothérapie (cas échéant traitement symptomatique). Une réintroduction en milieu naturel est envisagée après disparition complète des symptômes et statut infectieux négatif. Un vide sanitaire et une désinfection de l'environnement est nécessaire.

B. Médicale

L'antibioprévention n'est pas envisageable chez le koala : les désavantages liés à l'utilisation de cette méthode sont le développement d'antibiorésistance, le passage à la forme persistante et l'intolérance du koala aux antibiotiques (déséquilibre de la flore caecale).

Le développement d'un vaccin contre la chlamydophilose du koala apparaît comme une nécessité. Celui-ci devra combiner le choix d'antigènes qui permettra l'installation d'une protection immunitaire efficace ainsi qu'un adjuvant sûr et conduisant à une réponse approprie (notamment Th1 et IgA). Les premiers essais réalisés sur une population de koalas sains ont permis de trouver un adjuvant induisant une réponse humorale et cellulaire (Carey A.J. et al., 2009) mais le choix des sous-unités antigéniques et la démonstration de l'efficacité du vaccin sont en cours de réalisation.

Le développement d'un tel vaccin est pourtant rendu difficile à plusieurs niveaux. La vaccination contre la chlamydophilose chez l'homme a échoué du fait de l'exacerbation des symptômes : le système immunitaire réagit de manière disproportionnée face à certains antigènes. Ainsi, l'acte vaccinal est responsable de la déclaration clinique de la maladie. Aujourd'hui aucun vaccin efficace n'existe chez l'homme. Par ailleurs, le système immunitaire du koala est moins efficace que celui des euthériens, notamment au niveau de la réponse humorale plus longue à se

mettre en place (Wilkinson, Kotlarski and Barton 1992). Enfin, le manque de réactifs propres au koala ne permet pas d'évaluer suffisamment précisément la réponse immunitaire.

X. <u>Le potentiel zoonotique de la chlamydophilose du koala</u>

Chlamydia psittaci et Chlamydia abortus sont reconnues comme étant des zoonoses mais aucune évidence de cet aspect n'a encore été démontrée concernant C.pecorum et C.pneumoniae. Seule cette dernière espèce a été étudiée du fait de sa proximité avec les souches humaines : C. pneumoniae aurait été une zoonose à l'origine de la transmission à l'homme, mais les divergences entre souches humaines et celles du koala observées aujourd'hui laissent penser que les animaux ne constitueraient plus un réservoir de transmission pour l'homme (Myers G.S.A. et al., 2009).

Troisième chapitre : Contribution à l'étude de la virulence de *Chlamydia pecorum* sur le tractus uro-génital male du koala

I. Contexte de l'étude

Le koala, icône d'un pays, est probablement amené à disparaître dans les prochaines décennies. Si les erreurs du passé sont en voie de correction (perte d'habitat, braconnage...), l'implication des maladies infectieuses dans le déclin actuel des populations est majeure. La chlamydophilose est en effet la maladie la plus répandue chez le koala, causant de nombreux symptômes et notamment de l'infertilité. La prévalence de l'infection par *C. pecorum* est estimée entre 10 et 90% selon la méthode diagnostique et l'origine de la population (Jackson A.R. et Cockram F.A., 1981) (Jackson M. *et al.*, 1999), mais les recherches actuelles fondées sur la PCR quantitative montrent que cette prévalence est de 100% (Timms P., communication personnelle) alors que seulement 10 à 20 % des individus présentent des signes cliniques. Ceci est conforme avec la pathogénie des infections chlamydiennes, très répandues chez les différentes espèces hôtes mais généralement d'évolution chronique et asymptomatiques : un équilibre hôte-parasite s'installe si bien que les *chlamydia* persistent généralement toute la vie de l'individu.

Le passage d'une forme asymptomatique ou chronique à une forme déclarée de la maladie semble dépendre de différents facteurs : il a été prouvé qu'un déséquilibre immunitaire (rétrovirose du koala, syndrome de stress dû a un environnement non adapté, surpopulation, contact humain..) pouvait faire pencher la balance en faveur de la bactérie (Timms P., 2005).

Cependant, face à cette situation épidémiologique, une question se pose : certaines souches de *chlamydia* seraient-elles plus virulentes que d'autres, systématiquement à l'origine de formes déclarées, ou au contraire, toutes les souches de *chlamydia* peuvent-elles causer des infections chroniques et la forme déclarée indifféremment.

Aucune publication ne s'est encore intéressée à cet aspect chez le koala. Ainsi, le travail qui m'a été confiée au sein de l'équipe de chercheurs dirigée par Peter Timms¹, spécialiste de la chlamydophilose, aborde une partie de cette problématique. En effet, le but de l'étude est d'évaluer la virulence de souches de *Chlamydia pecorum* isolées dans le tractus urogénital mâle de koalas du Sud-est de l'état du Queensland en Australie. L'évaluation de cette virulence se basera sur des éléments cliniques, nécropsiques et histologiques, couplée avec une étude biomoléculaire quantitative et qualitative de souches de *Chlamydia pecorum*. C'est la première fois que l'on s'intéresse à l'histopathologie du haut appareil génital mâle du koala, les publications concernant en effet principalement les femelles ou le bas appareil génital mâle.

Les contraintes liées à la durée de stage (3 mois et demi) et la faible disponibilité en échantillons, n'ont pas permis la réalisation de l'étude dans sa totalité (estimée entre 2 et 3 ans) : ce troisième chapitre de la thèse exposera donc principalement, la définition des objectifs, la mise en place des matériels et méthodes et l'interprétation des premiers résultats. La discussion portera essentiellement sur les problèmes rencontrés et sur les améliorations à apporter quant à la méthodologie pour la poursuite de l'étude.

.

¹ Institute of Health & Biomedical Innovation, 60 Musk Ave Kelvin Grove, QLD 4059 Australia

II. Objectifs

Le premier objectif consiste à constituer une base de données d'images et d'interprétation histologique des différents tissus sains du tractus urogénital mâle du koala.

Le second objectif est d'évaluer de manière semi-quantitative (étude lésionnelle clinique, nécropsique et histologique) la virulence de *Chlamydia pecorum* des différents tissus du tractus urogénital mâle du koala.

Le troisième objectif vise à évaluer de manière quantitative la charge infectieuse dans les différents tissus du tractus urogénital mâle du koala et génotyper les souches impliquées dans l'infection.

La démarche de l'étude est résumée dans le diagramme de la figure 27.

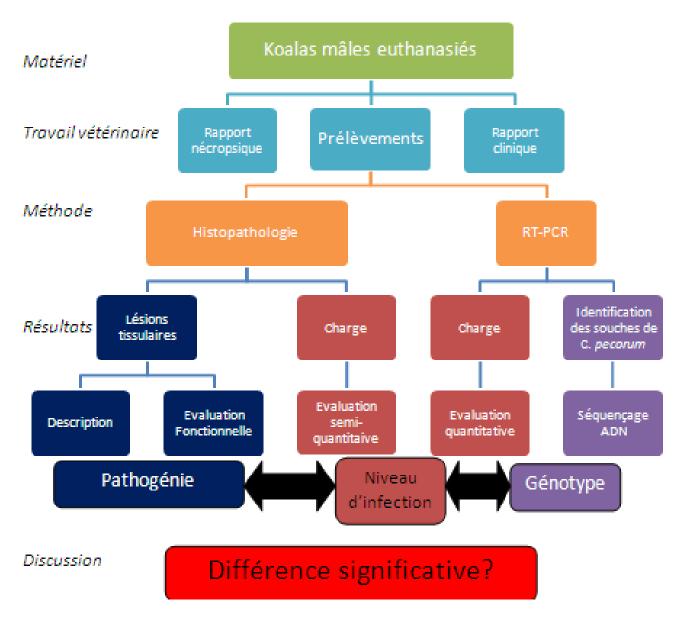


Figure 27 : Diagramme résumant la démarche de l'étude

III. Matériels et méthodes

A. Animaux ante mortem

Les koalas inclus dans l'étude sont des mâles admis au Wildlife Hospital de Beerwah dans le Queesnland entre septembre et décembre 2009. Cet hôpital pour faune sauvage est le plus grand d'Australie, il collecte les animaux provenant d'un territoire d'une superficie de 100 000 km² au Sudest du Queensland et au nord du New South Wales.

Deux catégories de koalas sont inclues dans l'étude :

- Des koalas mâles sans signe d'infection chlamydienne et sans dommage urogénital : Clearview Test négatif au niveau cloacal, non traité au chloramphénicol. Pour des raisons éthiques évidentes, cette catégorie est représentée essentiellement par des koalas morts ou euthanasiés suite à un AVP ou une attaque de chien.
- Des koalas mâles présentant des signes cliniques urogénitaux et un test Clearview positif sur prélèvements effectués au niveau cloacal et oculaire. Ces animaux n'avaient pas reçu de traitement au chloramphénicol et étaient euthanasiés pour raison médicale.

Chaque koala a été soumis à un examen clinique complet selon le protocole examinatoire utilisé à l'hôpital (annexe II), ainsi qu'à une série d'examens complémentaires incluant une analyse urinaire, une analyse sanguine et biochimique, un test Clearview oculaire et urogénital. Un examen échographique de l'appareil urogénital a également été réalisé (vessie, reins et prostate).

Dans le cadre du stage, deux koalas de chaque catégorie ont été prélevés, les détails d'admission et d'identification sont rapportés dans le tableau VII. Les examens paracliniques ont été réalisés dans les limites de disponibilité des vétérinaires sur place.

dentification Koala (numéro de l'étude et nom)	1	2	3	4
Statut infectieux (signes cliniques et Clear View	"sans signe de chlamydophilose" Test négatif	"chlamydophilose clinique" Infecté <i>C.pecorum</i>	"sans signe de chlamydophilose" Test négatif	"chlamydophilose clinique" Infecté <i>C.pecorum</i>
test)	rest negatii	(test positif)	i est negatii	(test positif)
Origine	Moreton Bay (40 km sud)	Cleveland (100 km sud)	Maryborough (200 km nord)	Tiaro (150 km nord)
Age	4 ans	2 ans	4 ans	5 ans
Date et motif d'euthanasie	22/09/2009 AVP compliqué par septicémie	17/09/2009 Faible score corporel (2/10), incontinence sévère	20/11/2009 AVP, fracture de la mandibule, hémorragies	25/11/2009 Faible score corporel (2/10), aveugle

Tableau VII : Caractéristiques des koalas inclus dans l'étude

Les koalas pairs sont malades et les koalas impairs non malades de chlamydophilose

B. Les prélèvements

Une autopsie complète des koalas a été effectuée dans les 24 heures suivant l'euthanasie avec une attention particulière accordée à l'appareil urogénital : description morphologique et lésionnelle précise des différents tissus de l'appareil urogénital.

Au cours de l'autopsie, les tissus suivants sont prélevés : les reins (médulla et cortex), l'uretère, la vessie, l'urètre, la prostate, le canal déférent, l'épididyme et le testicule. Deux sections d'environ 5x5x2 mm sont réalisées au sein de chaque tissu (partie présentant des lésions macroscopiques le cas échéant) :

- une section est introduite dans une cassette histologique, placée au moins 24 heures dans une solution à 10% de formaldéhyde tamponnée afin d'assurer une bonne fixation du prélèvement.
- l'autre section est stockée à 80°C dans un tube Eppendorf en attente de la réalisation de la PCR.

Pour les koalas 3 et 4, trois écouvillons (cloacal, urétral et vésical) ont été réalisés en plus des prélèvements tissulaires, conservés à - 80 $^{\circ}C$ en vue d'une analyse PCR.

C. Examen anatomopathologique

1. <u>Préparation des lames histologiques et coloration Hématoxyline et Eosine</u> (H&E)

- a) La déshydratation des prélèvements: l'eau n'étant pas miscible avec la paraffine, elle est retirée des échantillons tissulaires. Des bains successifs à 37°C dans une solution alcoolique (éthanol) de concentration croissante (1 bain à 70% pendant une heure, 2 bains à 90% d'une heure et 3 bains à 100% de 45 minutes) sont réalisés. L'éthanol n'étant pas miscible avec la paraffine, trois bains successifs de 45 minutes à 37°C dans une solution de xylène permettent la substitution de l'éthanol par le xylène. Une infiltration de paraffine est ensuite réalisée à 60°C pendant 30 minutes, afin de stabiliser les structures cellulaires. Cette étape est réalisée grâce à un automate.
- b) L'enrobage : les tissus sont alors inclus en blocs de paraffine, grâce à l'utilisation d'une machine à enrobage. L'orientation des tissus est réalisée de manière à obtenir des coupes longitudinales et transversales, selon l'échantillon.
- c) La réalisation des coupes histologiques : elles sont effectuées à l'aide d'un microtome afin d'obtenir des coupes d'une épaisseur de 5 μm. Deux séries de trois coupes, correspondant à une profondeur différente, sont montées sur lame. Les lames sont ensuite laissées à l'étuve à 50°C pendant 24 heures.
- d) Le déparaffinage et la réhydratation des lames : les lames sont plongées successivement deux fois 6 minutes dans une solution de xylène, puis trois fois 3 minutes dans une solution d'éthanol de concentration décroissante (100%, 90% et 70%) puis totalement réhydratées dans un bain d'eau distillée pendant trois minutes.
- e) La coloration Hématoxyline et Eosine: le colorant Hématoxyline de Mayer est utilisé dans un premier temps, les lames y sont immergées pendant 4 minutes puis rincées à l'eau courante pendant 5 minutes. Une nouvelle étape de déshydratation est alors réalisée: 4 bains successifs de 3 minutes dans des solutions d'éthanol de concentration décroissante (70%, 90% et deux fois 100%). Une goutte de solution d'éosine est ensuite appliquée sur chaque coupe pendant 15 secondes, puis les lames sont rincées deux fois pendant 2 secondes dans une solution d'éthanol 100%. Trois bains successifs de 3 minutes dans une solution de xylène sont ensuite réalisés. Les lames sont ensuite montées sous lamelles afin d'éviter l'altération des tissus et de la coloration.
- f) L'observation des lames : elle s'effectue grâce à un microscope optique AXIO disposant d'objectifs de grossissement x40, x100, x200 et x400. Des clichés numériques sont réalisés au moyen d'un appareil AXIOCAM MRC 5 mégapixels.

2. L'évaluation semi-quantitative des lésions

Une grille a été construite afin de rendre compte de l'impact de l'infection sur l'état général du koala : les critères cliniques susceptibles d'être modifiés par la chlamydophilose (comportement, score corporel, examen oculaire, nœuds lymphatiques...) sont inclus et quantifiés sur un total de 100.

Afin d'évaluer la virulence de l'infection du tractus urogénital, chaque tissu est soumis à une évaluation lésionnelle semi-quantitative. Un score est attribué au moyen d'une grille pour chacun des

8 tissus : il est ainsi possible de comparer la virulence de l'infection entre les tissus d'un même individu, ou entre un même tissu de deux individus différents. Ces grilles, réalisées par mes soins, sont consultables (annexes III à XI).

Les grilles d'évaluation des tissus se basent sur différents critères : une partie reposant sur les examens paracliniques quand ceux-ci étaient réalisables (rein, vessie et prostate), et une partie nécropsique et histologique renseignées pour tous les tissus. Des critères précis sont évalués et quantifiés pour chacune de ces parties. Les sous-scores obtenus sont alors additionnés et le score final est exprimé sur 100, pris comme valeur standard pour cette étude.

Les critères nécropsiques sont retenus spécifiquement pour chaque tissu selon l'ampleur des modifications par l'infection. L'aspect externe (couleur, consistance, taille...) et interne (hémorragies, suppuration...) de chaque organe est pris en compte, un score est attribué selon l'intensité de la modification (quantifiable ou classée de légère à sévère).

Les critères histologiques retenus sont basés sur les recherches de Hemsley et Canfield (1997) qui, après avoir classé les tissus du tractus urogénital femelle et de la prostate selon que l'inflammation soit légère, modérée ou sévère, ont réalisé une description lésionnelle et cytologique (à partir de lames histologiques colorées à l'H&E). Par analogie avec ces résultats, les modifications structurelles (épithélium, muscle lisse, tissu interstitiel pour la plupart des tissus) et cytologiques (caractérisation, distribution et profil cellulaire) observées pour chacun des tissus (exceptés les reins) ont été quantifiées selon l'intensité ou la qualité des modifications. La distinction entre léger, modérée et sévère lors de l'analyse des modifications structurelles, correspond respectivement à une atteinte inférieure à 30%, entre 30% et 60% et supérieure a 60% de la surface tissulaire.

Les critères histologiques retenus pour le rein sont basés sur les résultats d'une autre étude de Hemsley, Canfield et Higgins (2005), dans laquelle les modifications lésionnelles et cytologiques du rein de koala atteint de chlamydophilose ont été décrites.

La pondération des scores est réalisée de façon à équilibrer la part de chaque critère dans le score final. L'analyse des lésions histologiques étant plus précise et plus spécifique pour la chlamydophilose, le sous-score accordée à celle-ci est le plus important (entre 55 et 80 sur 100) ; le sous-score paraclinique est, lorsqu'il est accessible, pondéré faiblement (inférieur à 10/100); le sous-score nécropsique possède une pondération moyenne compte tenu de la faible spécificité des lésions observées (entre 20 et 40 sur 100). Le détail de ces scores est donné en annexes III à XI.

D. Les tests moléculaires

1. La PCR

a. L'extraction d'ADN

Protocole appliqué aux koalas 1 et 2: environ 50 mg de tissu est plongé dans 1 ml de TRIzolND pendant une nuit. Après homogénéisation avec 0.2 ml de chloroforme puis centrifugation, la phase aqueuse contenant l'ARN est éliminée. La précipitation de l'ADN est réalisée par ajout de 0.3 ml d'éthanol. La phase organique contenant l'éthanol et les protéines est éliminée. L'ADN est ensuite lavé deux fois dans une solution de citrate de sodium 0.1 mol/l dans 10% d'éthanol. La pelote est ensuite mise en suspension dans 2 ml d'éthanol à 75%. L'ADN est enfin dissous par ajout de 0.3 ml d'hydroxyde de sodium à 8 mmol/l. Le pH est ajusté à 8.4 en fin d'extraction.

Protocole appliqué aux koalas 3 et 4: environ 25 mg de tissu est lysé dans 20 μl de protéinase K pendant 3 heures en milieu homogénéisant. 200 μl de Buffer AL ND (tampon de lyse) sont ajoutés au mélange (incubation a 70°C pendant 10 min), puis 200μl d'éthanol 100%. Le mélange est transféré dans une colonne à centrifuger (QIAamp Mini spin column, QIAGEN) disposée dans un tube de 2 ml. Une centrifugation à 6000 x g est appliquée pendant une minute. La colonne subie 2 lavages consécutifs par l'ajout de 500 μl de solution tampon (Buffer AW1 et Buffer AW2), centrifugation (6000 x g pendant une minute pour le premier et 20000 x g pendant 3 minutes pour le second) et élimination du filtrat. L'ADN subit enfin une élution par ajout de 200 μl de solution tampon (Buffer AE) dans la colonne, mise à l'incubation pendant 1 min puis centrifugée à 6000 x g, pendant une minute. Le filtrat est alors conservé à 4°C.

Traitement préparatoire à l'extraction d'ADN à partir des écouvillons (koalas 3 et 4) : ceux-ci sont plongés dans 3 ml de SPG (sucrose/phosphate/glutamate) pendant 2 minutes, puis 1 ml est centrifugé, après avoir été transféré dans un tube Eppendorf pendant 30 min. Les composants cellulaires sont mis en suspension dans 50 μl de tampon TE (Tris/EDTA). Un traitement thermique a 95°C pendant 10 minutes permet de détruire d'éventuelles bactéries résiduelles. L'extraction d'ADN a ensuite été réalisée selon le protocole appliqué aux tissus des koalas 3 et 4.

2. La réalisation de la PCR

Mélanges réactionnels : chaque tissu soumis à l'analyse PCR est réalisé en double exemplaire. Un contrôle négatif et 4 standards étalons $(10^2, 10^4, 10^6 \text{ et } 10^8 \text{ C.pecorum})$ et *C.pneumoniae*) en double exemplaire sont inclus dans chaque run. Le mélange réactionnel est de 20 μ l comprenant :

- 2 μl de solution tampon (x10 buffer)
- 2 µl de MgCl₂
- 2 µl de solution de nucléotides dNTP
- 1.5 µl d'amorces sens et 1.5 µl d'amorces anti sens
- 4.8 µl de ddH₂O (double distilled H₂O)
- 3 µl de solution de SYBR© green Mastermix (Applied Biosystems)
- 0.2 µl de FastStart Tag polymerase (Roche)
- 3 μl d'extrait d'ADN pour les prélèvements à analyser, 3 μl de solution standard étalon pour les contrôles positifs et 3 μl de ddH₂O pour les contrôles négatifs.

Différentes amorces sont utilisées pour identifier *C. pecorum* et *C. pneumoniae*. Ainsi pour chaque prélèvement, 4 PCR sont réalisées afin d'effectuer une analyse en doublon pour chacune des espèces de *chlamydia*.

La description des amorces utilisées est donnée dans le tableau VIII.

	Gène cible	Séquence amplifiée	Noms des amorces		Amorces	
			sens	antisens	sens	antisens
C. pecorum	16SrRNA, gène de 1548 paires de base	203 paires de bases (position 56 à 259	16rtFo rpec	16SrtRe vpec	confidentiel	confidentiel
C. pneumoniae		185 paires de bases (position 63 à 248)	16SrtF orpne	16SrtRe vpne	confidentiel	confidentiel

Tableau VIII : description des amorces utilisées pour la RT-PCR (Wan C., communication personnelle)

Cycles: toutes les réactions ont été réalisées grâce au thermocycler 7000 SDS (Applied Biosystems). Une première phase d'initialisation à 94°C pendant 3 minutes permet d'activer la Taq polymérase. Une répétition de 40 cycles suivent ensuite, se composant d'une phase de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, puis une phase d'hybridation a 57°C pendant 30 secondes et une phase d'élongation à 72°C pendant 90 secondes.

En fin de processus, la courbe de fusion (« meltcurve ») de l'ADN est réalisée (température croissante entre 70 et 90°C) afin d'exclure d'éventuels faux positifs.

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée tout au long de la réaction.

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale.

Les dilutions standard permettent de réaliser une courbe d'étalonnage afin de déterminer la quantité d'amplicons présents dans les échantillons à analyser.

La courbe de fusion permet de déterminer la température de fusion pour laquelle l'amplicon est dénaturé. Cette température varie selon la longueur de l'amplicon et la séquence génétique. Dans le cas où la courbe de fusion met en évidence plus d'un pic de température, cela signifie que le mélange réactionnel final contient différents types d'amplicons, et est donc à considérer comme un faux positif (amplification de plus d'une séquence dans le mélange réactionnel).

b. Le séquençage

Par manque de temps et de moyens.aucun séquençage n'a été réalisé dans le cadre de notre étude. Seuls les principes du séquençage et de l'identification des souches, dans le cadre de la contribution à l'étude, est juste décrit. Le protocole est présenté en annexe XII.

IV. Résultats

Avertissement: compte tenu du faible nombre d'animaux ayant pu êtreprélevés, la présentation des résultats n'a pour intérêt que d'illustrer le cheminement du raisonnement et de valider le protocole. Les analyses histologiques et statistiques présentées ci-après seront retenues dans le cadre de l'étude complète qui sera menée plus tard à l'Institut de Santé et d'Innovation Biomédicale de Brisbane, mais pourront être soumis à modifications; l'interprétation de ces analyses ne dépasse pas le cadre des 4 koalas inclus dans l'étude (les résultats n'ont pas pour objet de démontrer, simplement d'illustrer).

La qualité médiocre des colorations ainsi que celle des clichés photographiques des lames ne permettent pas d'illustrer les résultats. Ceux-ci se résument donc à une description des lésions observées.

A. <u>Aspects macroscopique et histologique du tractus urogénital mâle sain du koala</u>

Les koalas 1 et 3, euthanasiés pour raison médicale sans affection apparente du tractus urogénital, sont les seuls utilisés pour la description nécropsique et histologique des différents tissus du tractus urogénital. L'intérêt de cette partie est de disposer de références nécropsiques et histologiques.

1. Aspect macroscopique

Le tractus urogénital mâle du koala (figure 28) est similaire à celui des mammifères euthériens (type carnivores).

Les reins sont lisses, fermes, de couleur uniforme brun foncé, en forme de « haricot » d'environ 5 cm de long. La capsule est non adhérente. Le rapport cortico-médullaire est classique 1/3-2/3, tout comme la description interne. Les uretères cheminent profondément le long des vertèbres lombaires et ne présentent pas de particularités. La vessie est plissée et souple, de couleur blanche nacrée ; la paroi mesure environ 2 mm d'épaisseur, la muqueuse est lisse et blanche, les papilles urinaires sont situées très caudalement. L'urètre prostatique et pénien n'est pas accessible macroscopiquement.

La prostate est piriforme, de couleur blanche, lisse et ferme. Elle mesure environ 12 mm de long sur 5 mm de large, la lumière occupe plus de la moitié du volume (7 mm de diamètre) et est de couleur plus foncée. L'appareil génital haut constitué du canal déférent, de l'épididyme et du testicule ne présente pas de particularités : le testicule, recouvert par la vaginale, mesure environ 15 mm, est ferme de couleur brun claire.



Figure 28 : Tractus urogénital du koala 3 (photo personnelle)

2. Aspect histologique

- L'uretère et la vessie présentent un épithélium transitionnel de 4 à 6 couches cellulaires ; la *tunica muscularis* est composée de 3 couches musculaires (circulaires pour l'intermédiaire et longitudinales pour les autres) séparées par du tissu conjonctif. La lumière de l'uretère n'est pas de forme étoilée.
- L'urètre : l'urètre prostatique est celui retenu pour l'étude. L'épithélium est stratifié, similaire à celui de la vessie et de l'uretère. De nombreuses vésicules sécrétoires sont observées. Le tissu adjacent est celui de la prostate.
- Le rein : la corticale est dense en glomérules, tandis que les tubes contournés proximaux et distaux ainsi que les tubes collecteurs occupent l'essentiel du parenchyme. Les tubes collecteurs, tapissés par un épithélium cylindrique, convergent vers la médulla pour former les tubes de Bellini. Les anses de Henlé se distinguent des tubes contournés par la taille et leur forme (plus large et moins réguliers pour ces derniers) et sont tapissés par un épithélium cubique. Le *vasa recta* est visible est reconnaissable grâce à la présence d'érythrocytes dans la lumière.
- Le testicule : les tubes séminifères sont tapissés par un épithélium pseudo-stratifié composé de cellules de Sertoli et de cellules spermatogéniques, avec présence de spermatozoïdes dans la lumière. L'interstitium est composé de cellules de Leydig et de conjonctif.
- L'épididyme : le canal epididymaire est tapissé d'un épithélium cylindrique portant de nombreuses microvillosités (stéréocils). Des vésicules sécrétoires sont présentes au sein de cet épithélium et des spermatozoïdes sont visibles dans la lumière.
- Le canal déférent : la lumière est tapissée par un épithélium stratifié composé de 3 à 4 couches cellulaires reposant sur une couche de cellules basales cubiques. Les cellules épithéliales présentent de nombreux stéréocils. Les couches musculaires sont classiques pour ce type de tissu, épaisses et orientées longitudinalement (interne et externe) et circulairement (intermédiaire). La lumière n'est pas de forme étoilée.

- La prostate : les glandes tubulo-alvéolaires, tapissées par un épithélium cylindrique, sont entourées de tissu conjonctif dense et de fibres musculaires. La *lamina propria* des canaux glandulaires est composée de fibres musculaires et de vaisseaux sanguins. De nombreuses secrétions amylacées sont visibles au niveau des canaux glandulaires.

B. <u>Aspects macroscopique et histologique du tractus orugénital mâle</u> chez le koala atteint de chlamydophilose

Les 4 koalas sont soumis à cette étude mais l'essentiel porte sur les koalas 2 et 4 reconnus infectés par test direct rapide et présentant des symptômes de chlamydophilose.

1. Le score général chlamydophilose

Le score général des koalas 1 et 3 est donné à titre indicatif (mauvais état général mais pas de symptômes évoquant la chlamydophilose) : ainsi un score de 21/100 et de 16/100 respectivement pour le koala 1 et 3 ont été obtenus, tous deux ayant subi un AVP (compliquée d'une septicémie lors de l'hospitalisation).

Le koala 2 présente une kératoconjonctivite mucopurulente bilatérale modérée et une incontinence sévère, avec atteinte sévère de l'état général alors que le koala 4 présente une cécité bilatérale accompagnée d'écoulement mucopurulent sévère, et un léger syndrome « dirty tail ». Un même score général de 55/100 a été obtenue pour les deux koalas.

2. <u>L'étude lésionnelle</u>

a. Aspect qualitatif des lésions

Le tableau IX donne l'ensemble des résultats d'analyse nécropsique et histologique observés sur les différents tissus et organes des 4 koalas inclus dans l'étude. Une description plus détaillée est disponible en annexe XIII.



Figure 29 : Présence de pétéchies sur la muqueuse vésicale du koala 4 (photo personnelle)

Koalas	1	2	3	4
Statut clinique	AVP compliqué par septicémie	Syndrome Ŗdirty tailŗ	Polytraumatisme	Kératoconjonctivite, cécité
Statut infectieux (Clear View test)	négatif	Fortement positif	négatif	Modérément positif
Reins	Néphrite fibrotique cortico- médullaire, atrophie glomérulaire, pertes structures tubulaires	Absence de lésion observée	Absence de lésion observée	Fibrose diffuse, taille augmentée (58 mm) Atrophie glomérulaire (50%), fibrose médullaire, infiltration plasmocytaire au niveau tubulaire et interstitiel, congestion vasa recta
Uretère	Epaississement de l'urothélium Absence de lésion observée l'interstitium ædèmatié, congestion, infiltrats neutrophiliques		Absence de lésion observée	Epaississement de l'épithélium, infiltration neutrophilique modérée
Vessie	Absence de lésion observée	Cystite sévère (paroi de 6mm, fibrose diffuse, congestion, zones nécrotiques, hématopyurie) Pertes cellulaires importantes, infiltration de la lamina propria et de la sous muqueuse par neutrophiles et plasmocytes	Absence de lésion observée	Cystite légère (paroi de 3mm, congestion, pétéchies) (figure 29) Epaississement de l'épithélium, infiltration neutrophilique modérée
Urètre	Ecoulement hémopurulent Absence de lésion Pertes cellulaires importantes		Absence de lésion observée	Absence de lésion observée
prostate	Absence de lésion observée	Prostatite sévère (32 mm, consistance augmentée, écoulement mucopurulent) Epaississement épithélium, déformations tubuloglandulaires, ædème interstitiel, infiltration lymphoplasmocytaire, pyocytes, absence sécrétions prostatiques	Absence de lésion observée	Prostatite modérée (congestion légère) <i>Léger</i> épaississement épithélial, ædème interstitiel diffus
Canal déférent	Absence de lésion observée	Absence de lésion observée	Absence de lésion observée	Absence de lésion observée
Epididyme	Absence de lésion observée	Perte des microvillosités et des vésicules sécrétoires, infiltration focale lymphoplasmocytaire, absence de spermatozoïdes	Absence de lésion observée	Absence de lésion observée
Testicule	Absence de lésion observée	Absence de lésion observée	Absence de lésion observée	Absence de lésion observée

Tableau IX : Description des lésions observées à l'examen nécropsique et histologique des 4 koalas inclus dans l'étude

Les descriptions nécropsiques sont reportées en caractère normal et les descriptions histologiques sont notées en italique.

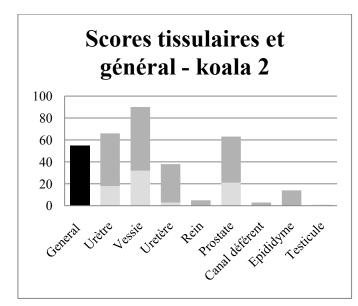
Ce tableau correspond à l'analyse qualitative de l'étude.

Les lésions observées aussi bien au niveau macroscopique que microscopique sont non spécifiques : les organes atteints présentent une inflammation aigüe des tissus (cystite, urétrite, prostatite et néphrite) avec généralement une infiltration de type lymphoplasmocytaire et/ou neutrophilique.

Le koala 2 est le koala présentant les lésions les plus importantes (étendue et intensité) essentiellement distribuées au niveau du bas appareil urogénital. Les koalas 1 et 4 présentent quant à eux des lésions du haut appareil urinaire, de type néphrite fibrotique, avec extension à la vessie pour le koala 4. L'ensemble des appareils génitaux hauts sont indemnes chez les quatre koalas.

b. Evaluation semi-quantitative des lésions

L'évaluation selon les grilles présentées en annexes (III à XI) des lésions nécropsiques et histologiques ont permis d'établir un score lésionnel pour chaque tissu : les résultats sont présentés dans la figure 30.



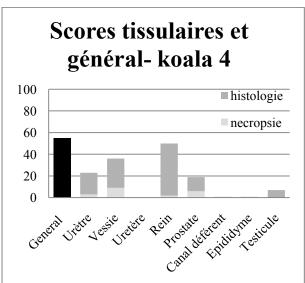


Figure 30 : Scores général et tissulaires obtenus par analyse nécropsique et histologique des koalas 2 et 4

Dans l'ensemble, l'analyse nécropsique des tissus est en accord avec l'analyse histologique mais la part histologique dans le score final est toujours prédominante (notamment pour le rein du koala 4 évalué à 50/100 dont 48/100 obtenue à l'histologie). Les scores lésionnels du koala 4 sont dans l'ensemble inférieurs à ceux du koala 2 (moyenne de 17/100 contre 34.5/100).

En regroupant les scores par niveau du tractus urogénital (figure 31), on constate que les profils des koalas 2 et 4 sont opposés (excepté pour l'appareil génital haut des 4 koalas pour lequel le score ne dépasse pas 5/100). En effet les bas appareils urinaire et génital du koala 2 sont supérieurs à 60/100 (atteinte sévère) alors qu'ils sont inférieurs à 30/100 pour le koala 4. Inversement le score lésionnel moyen de l'appareil urinaire haut du koala 4 est de 50/100 alors qu'il n'est que de 22/100 pour le koala 2.

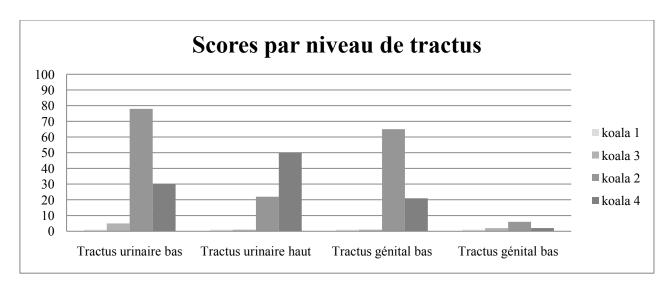


Figure 31 : Scores lésionnels par niveau du tractus urogénital des 4 koalas inclus dans l'étude

C. Résultats de l'analyse quantitative par PCR en temps réel

Pour l'ensemble des prélèvements, aucune copie de *C. pneumoniae* n'a été mise en évidence (inférieur au seuil de détectabilité).

Les protocoles d'analyse quantitative n'étant pas exactement les mêmes entre les koalas 1 et 2 d'une part et 3 et 4 d'autre part (extraction d'ADN, test de présence des inhibiteurs, analyse d'écouvillons), les résultats sont présentés de façon distincte pour ces deux groupes.

Par ailleurs, deux essais ont été réalisés pour les koalas 1 et 2, en raison de l'obtention de résultats inattendus lors du premier essai (présence de *chlamydia* dans les tissus du koala 1 malgré l'absence de signes et quasi absence de *chlamydia* sur les tissus du koala 2 malgré la forte positivité au test Clearview). Les résultats pour ces deux koalas sont présentés dans la figure 32 (essais 1 et 2).

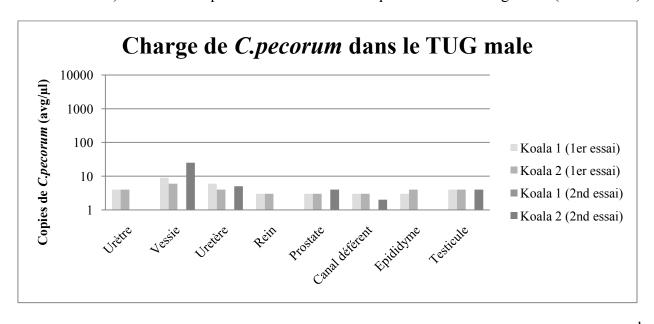


Figure 32 : Résultats de RT-PCR réalisées sur les différents tissus des koalas 1 et 2 (1 er et 2 nd essai). TUG = Tractus urogénital

D'une part, les deux essais montrent des résultats similaires pour chaque koala : il n'existe que de faibles écarts entre le nombre de copies trouvées lors des deux essais (pour un koala donné). D'autre part, le nombre de copies d'ADN présentes initialement dans les prélèvements est équivalent entre les deux koalas (pour un tissu donné), il n'existe pas de différence significative de niveau de charge bactérienne entre les koalas 1 et 2 : en effet, le nombre de copies par µl est compris entre 1 (comme pour tous les tissus du koala 1 au 2nd essai) et 25 (pour la vessie du koala 2 lors du deuxième essai).

Les résultats obtenus pour les koalas 3 et 4 (figure 33) sont similaires à ceux obtenus précédemment pour les koalas 1 et 2, à savoir une faible charge bactérienne des différents tissus. Seul l'uretère du koala 4 présente une charge significativement différente comparée aux autres tissus avec un nombre de copies de 908 par µl; l'ensemble des tissus du koala 3 présente une charge inférieure au seuil de détectabilité (à l'exception des écouvillons).

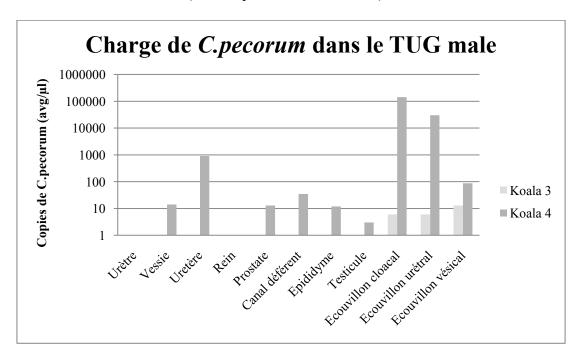


Figure 33 : Résultats de RT-PCR réalisées sur les différents tissus et des écouvillons des koalas 3 et 4

Par ailleurs, l'analyse des écouvillons montre une charge bactérienne très élevée (selon des critères définis par l'étude en cours) du tractus urogénital du koala 4, à savoir 142 500 copies par µl au niveau cloacal, 30 000 copies par µl au niveau urétral. Seul l'écouvillon vésical montre une charge bactérienne faible à modérée (87copies par µl).

D. <u>Identification des souches</u>

Celle-ci n'a pu être réalisée.

V. <u>Discussion</u>

La partie expérimentale développée dans ce troisième chapitre n'a pas vocation à répondre à la problématique posée, mais à valider la démarche. Les résultats ne sont que partiels, du fait d'un manque d'échantillons, de moyens et de temps. Pour autant, elle permet de soulever les problèmes et difficultés rencontrées, inhérents à tout travail de recherche. Ainsi, la discussion consistera à reprendre les différentes étapes de l'étude, d'analyser les résultats obtenus, afin d'apporter des éléments d'amélioration et de correction (sur la forme de l'étude) et des éléments d'interprétation et de réorientation (sur le fond de l'étude) au regard de la littérature scientifique.

Cette étude est la première à s'intéresser à la virulence des souches de *C. pecorum* chez le koala afin de mieux comprendre la pathogénie de cette maladie. Il n'existe par ailleurs aucune donnée sur l'atteinte du haut appareil génital mâle par la chlamydophilose, notamment son implication dans l'infertilité; celle-ci est démontrée chez la femelle koala mais pas chez le mâle. Jonhston (2003) s'est intéressée à la décontamination du sperme par les *chlamydia* par emploi d'antibiotiques in vitro : la fertilité n'est pas atteinte dans la mesure où le sperme se contamine au niveau du bas appareil urogénital (prostate notamment), ainsi le sperme n'est que vecteur de la maladie. Chez l'homme, *C. trachomatis* provoque une épididymio-orchite à l'origine d'une aspermatogénèse (Beagley and Cunningham 2008) : il est supposé que ce phénomène intervient chez le koala, cette étude permettra d'apporter des éléments de réponse.

A. <u>L'échantillonnage testé</u>

Le choix de porter l'étude sur les koalas mâles repose sur deux critères :

- Peu de données existantes (notamment histologiques) chez le mâle
- Saison de reproduction favorisant les déplacements des mâles : ce qui augmente la probabilité d'admission d'individus de ce sexe à l'hôpital faune sauvage

Cependant, peu de koalas mâles admis remplissaient les conditions d'appartenance aux deux catégories, à savoir koalas mâles négatifs au Clearview test et sans dommage urogénital d'une part (catégorie 1), et des koalas positifs au test et présentant des symptômes urogénitaux d'autre part (catégorie 2). En effet, pour des raisons éthiques évidentes, la plupart des koalas atteints de symptômes évocateurs de la chlamydophilose sont hospitalisés pour être traité au chloramphénicol Ř critère d'exclusion en raison du risque de faux négatifs à la PCR (Markey B. *et al.*, 2007). Ainsi, les koalas inclus sont ceux qui sont les plus gravement atteints, conduisant ainsi à un biais d'échantillonnage. Quant aux koalas, de la catégorie 1, ils sont euthanasiés pour raison médicale : ces koalas n'étant pas cliniquement sains, il est possible d'obtenir des résultats par excès lors de l'évaluation nécropsique et/ou histologique (atteinte non chlamydienne de l'appareil urogénital).

Par ailleurs, l'âge des koalas est évaluable mais n'est pas un paramètre contrôlable. L'analyse devra prendre en compte ce paramètre, afin de disposer d'un échantillonnage plus homogène, par exemple entre 2 et 4 ans (après maturité sexuelle et ayant une bonne aptitude à développer une réponse immunitaire). En revanche, la période d'évolution des symptômes n'est pas évaluable. Or pour une même virulence de souches, l'évaluation lésionnelle différera selon ce paramètre.

L'étude s'intéresse à la capacité qu'auraient certaines souches de *C. pecorum* à provoquer les symptômes et d'en évaluer la virulence. Or, des individus porteurs ou atteints d'une infection

chronique à bas bruit peuvent développer ces symptômes à la faveur d'une baisse d'immunité pouvant être provoquée par un syndrome de stress ou une infection par le KoRV (Timms P., 2005). Ainsi, l'addition systématique d'une NFS et d'un myélogramme aux examens paracliniques permettrait d'exclure les individus présentant un système immunitaire défaillant, et donc de minimiser ce biais d'interprétation, ou d'en évaluer l'impact sur l'intensité et le type de lésions observées.

B. Nature des prélèvements effectués

Le choix des tissus prélevés permet d'avoir une bonne représentativité du tractus urogénital mâle. Les glandes de Cooper n'ont pas été incluses dans l'étude mais pourront l'être dans la version définitive. Il s'agit d'une glande para-urétrale responsable de la sécrétion du liquide pré-éjaculatoire ; son altération lors d'une infection chlamydienne a été démontrée chez l'homme (Sanders C.J. et Mulder M.M., 1998), mais aucune étude ne s'y est intéressée chez le koala. L'analyse des glandes de l'appareil reproducteur s'est limitée dans le cadre du stage à la prostate. Les recommandations de Hemsley et Canfield (2000) concernant le mode de prélèvement histologique chez les marsupiaux ont été suivis, à savoir prélèvements dans les 4 premières heures *post-mortem*, échantillons ne dépassant pas 1 cm de long et fixation dans le formol.

Un seul prélèvement a été réalisé pour chaque tissu, ce qui ne permet pas d'avoir une vision globale de l'organe, et notamment de l'étage de l'infection pour les structures tubulaires. Ainsi, pour l'urètre, l'épididyme et le canal déférent, un minimum de trois prélèvements aux différents étages permettrait de contourner ce problème.

C. Protocole d'analyse histologique

L'épithélium infecté répond de manière non spécifique par une prolifération des cellules basales conduisant à son épaississement. Cette observation, faite sur l'urètre, la vessie, la prostate et l'uretère du koala 2, est en accord avec celles faites par Hemsley et Canfield (1997). Cet épaississement, dans les cas les plus sévères, se manifeste par une hypertrophie polypoïde et une hyperplasie de la muqueuse. Une étude a par ailleurs prouvé que l'infection de l'épididyme par *C. trachomatis* chez l'homme pouvait être diagnostiquée par simple coloration HE: en effet, l'épididymite chlamydienne se caractérise par la non destruction et la prolifération de l'épithélium, contrairement aux autres bactéries qui provoquent destruction et abcédation (Hori S. et Tsutsumi Y., 1995).

L'autre aspect des observations faites sur les tissus infectés des koalas 2 et 4 concerne le profil leucocytaire. Les cellules mononucléaires sont prépondérantes dans l'infiltrat inflammatoire, notamment les plasmatocytes. Ceci est en accord avec les observations faites chez les autres espèces (Kiviat N.B. et al., 1990) (Kuo C.C., 1988). La prépondérance des plasmocytes au sein des tissus infectés semble indiquer une forte réponse humorale contre *C. pecorum* mais le profil des immunoglobulines ne peut être exploré par manque de réactifs existant chez le koala : seul l'IgG du koala a été purifiée. Il serait intéressant de travailler sur l'IgA qui participe à la défense spécifique au niveau des muqueuses.

Cependant, la lecture qualitative des lames a montré certaines incohérences. Pour exemple, l'épididyme du koala 2 révèle la présence de lésions compatibles avec une infection chlamydienne (perte focale d'épithélium, perte des microvillosités, absence de spermatozoïdes au niveau de la lumière...) alors que les tissus en amont et en aval ne présentant aucune lésion particulière (testicule

et canal déférent respectivement présentent notamment des spermatozoïdes dans leur lumière, sans aucune lésion visible). Ainsi, il est probable que l'évaluation ait été majorée du fait de la mauvaise qualité des lames histologiques. En effet, le contraste hématoxyline et éosine obtenu s'est révélé d'une qualité médiocre et les structures tissulaires n'ont pas été toujours facilement identifiables sur l'ensemble des tissus analysés. D'autres erreurs d'interprétation par excès (« fausses » lésions) ou par défaut (« fausses » structures saines, manque de représentativité du prélèvement), ont très certainement été commises.

Les principales raisons expliquant le défaut de qualité des lames sont les suivantes :

- l'enrobage qui permet d'obtenir la bonne orientation du tissu sur la lame et nécessite une bonne technicité
- la microtomie qui nécessite également une bonne technicité
- La coloration Hematoxyline et Eosine bien qu'universellement rependue n'est pas celle qui facilite le mieux l'observation; un vrai trichrome et/ou une coloration bien adaptée aux leucocytes (Giemsa par exemple) eurent été un bon complément.

Cependant, l'analyse histologique réalisée sur les koalas 1 et 3 supposés atteints de chlamydophilose, a permis de servir de référence pour l'analyse des koalas 2 et 4. Ainsi, le biais lié à la qualité des lames est minimisé : les anomalies relevées sont déduites par comparaison aux structures et des colorations observées sur les tissus des koalas sains traitées selon le même procédé.

Il est important de noter que l'analyse histologique n'a pas été réalisée par un histologiste dans le cadre de la partie présentée précédemment. Il est très probable que des erreurs d'interprétation, par excès ou par défaut, ont été commises. Cependant, l'intervention d'un histologiste dans l'étude est prévue. Ceci permettra de qualifier beaucoup plus précisément les lésions et les modifications cytologiques observées et ainsi d'accroitre la valeur du score attribué dans le cadre l'évaluation semi-quantitative. Seul un spécialiste pourrait faire la part entre l'atteinte lésionnelle directement induite par les bactéries et les lésions liées au remembrement des structures tissulaires post-infection; la virulence des *chlamydia* dans l'étude est en effet considérée comme directement responsable des lésions observées.

La coloration hématoxyline et éosine est la plus utilisée en histologie. Elle permet une analyse correcte des structures tissulaires mais manque de spécificité; il s'agit d'une coloration standard qui rend les noyaux basophiles et le cytoplasme et autres structures éosinophiles, avec un contraste tissulaire limité (Canfield P.J. et Hemsley S., 2000). Ainsi dans le cadre de cette étude, il serait intéressant d'utiliser des méthodes complémentaires de coloration et de marquage immunohistochimique. La coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS) et trichrome de Masson permettraient de mettre en évidence la présence de glycogène dans les cellules épithéliales et de collagène respectivement : ceci permet d'obtenir un excellent contraste au niveau de l'épithélium, tissu atteint par les *chlamydia*, et ainsi d'en améliorer l'analyse qualitative.

Il est également possible de détecter les inclusions de *chlamydia* par la méthode de Giminez. Cependant, cette technique est peu sensible, le marquage immunohistochimique (anticorps monoclonaux de souris dirigés contre LPS) étant préféré à cette méthode. En effet, sur 16 échantillons positifs avec la seconde méthode, seuls 5 le sont par la méthode de Giminez (Hemsley S. et Canfield P.J., 1997).

Enfin, le marquage immunohistochimique permet également de mettre en évidence le type de cellules immunitaires impliquées dans le processus. Il existe des anticorps dirigés spécifiquement contre les lymphocytes du koala : anticorps polyclonaux de lapins dirigés contre CD3 des lymphocytes T et monoclonaux contre CD79b des lymphocytes B (Hemsley S. et Canfield P.J., 1997)...

En résumé, il serait ainsi nécessaire d'intégrer à l'étude la coloration PAS - trichome de Masson, dans la mesure où l'étude se base sur l'évaluation des modifications tissulaires, ainsi qu'une méthode d'observation directe des *chlamydia* (immunohistochimie de préférence). L'identification du profil cytologique lymphocytaire est secondaire pour cette étude car il a déjà été largement étudié dans la littérature (chez l'homme et autres espèces).

D. Evaluation semi-quantitative de la virulence

1. Analyse du score général

Le score général, basé uniquement sur des critères cliniques, permet de donner une bonne évaluation de la répercussion sur l'état de santé des animaux : malgré le mauvais état général des koalas 1 et 3, non atteints par la chlamydophilose, leur score général est compris entre 15 et 20 alors qu'il est de 55/100 pour les koalas 2 et 4. Les critères cliniques retenus auraient ainsi une valeur diagnostique. En revanche, la valeur du score ne permet pas de discriminer le type d'atteinte : le koala 2 présente un syndrome « wet bottom » intense et une atteinte oculaire modérée alors que le koala 4 présente une cécité sans syndrome « wet bottom » ; il est néanmoins probable que, malgré l'atteinte sévère par la chlamydophilose pour ce dernier, son score soit majoré les conséquences indirectes liées à la cécité.

Ce fort score général obtenu pour les deux koalas traduit une atteinte sévère de l'état général par la chlamydophilose. Cependant le profil des scores tissulaires (figures 30 et 31 dans **IV.B.2.b**) révèle un processus différent :

- la clinique du koala 2 est dominée par un syndrome « dirty tail », traduisant une cystite, ce qui est en accord avec les forts scores obtenus pour les tissus du bas appareil urinaire (score de 90 pour la vessie). La dégradation de l'état général est directement liée à cette atteinte sévère des tissus du bas appareil urogénital. Les lésions observées dans les tissus les plus inflammés permettent de comprendre les répercussions cliniques; par exemple, l'hypertrophie des couches musculaires de la vessie accompagnée d'un épaississement de la muqueuse conduisent à la perte de capacité dilatatoire de cet organe; ceci se traduit par une incontinence (« wet bottom »), voire une hydronéphrose par reflux urétéral (non observée dans l'étude mais décrite par Higgins en 2005). La douleur liée à la prostatite aigüe est également un élément d'explication du dépérissement de l'animal.
- la clinique du koala 4 est en revanche dominée par une kératoconjonctivite compliquée de cécité; les scores des tissus du bas appareil urogénital sont inferieurs de près de 60% par rapport à ceux du koala 2. Cependant la dégradation de l'état général n'est probablement pas seulement liée à la cécité, l'importante néphrite (atteinte cortico-médullaire dominée par une fibrose, une atrophie glomérulaire et une perte de structures tubulaires) diagnostiquée à l'histologie (à défaut d'examens paracliniques), a très certainement accéléré le processus.

2. Analyse de la méthode d'attribution des scores

L'attribution de score lésionnel permet d'échelonner l'impact de la chlamydophilose sur les différents tissus. En 1997, Hemsley et Canfield ont catégorisé la sévérité de l'inflammation liée à la chlamydophilose chez le koala par méthode histologique pour la conjonctive, la prostate, la vessie et le sinus urogénital femelle : l'inflammation des tissus était considérée comme légère, modérée ou sévère selon la distribution et les caractéristques de l'infiltrat. La construction des grilles d'évaluation s'est inspirée des résultats de cette étude, en incluant des critères paracliniques et nécropsiques en plus. L'attribution d'un score sur 100 points permet de mieux discriminer l'atteinte entre les différents tissus pour un individu donné, ou entre le même tissu de deux individus différents. Le choix de cette méthode d'évaluation permettra de faciliter le traitement statistique de la virulence des souches de *chlamydia* (Hemsley S. et Canfield P.J., 1997).

Les critères retenus pour évaluer cette virulence se divisent en trois catégories : clinique/paraclinique, nécropsique et histologique. Aucun critère n'est spécifique de la chlamydophilose (excepté le score clinique « dirty tail »), il est donc possible d'obtenir des scores élevés par excès, notamment pour les koalas de catégorie « euthanasiés pour raisons médicales ». Cependant, cet inconvénient est en partie limité : les critères ayant été sélectionnés par leur forte probabilité à être modifiés par une atteinte de la chlamydophilose, critères largement décrits dans la littérature scientifique concernant l'examen clinique, paraclinique et nécropsique (Cockram F.A. et Jackson A.R.B., 1976) (Obendorf D.L., 1983) (Brown A.S. *et al.*, 1987).

Les critères histologiques ont été retenus à partir des observations précises faites sur les tissus (prostate et vessie) légèrement, modérément ou sévèrement inflammés et infectés par *C. pecorum* (Hemsley S. et Canfield P.J., 1997). Les modifications observées se définissent à 3 niveaux : les modifications structurelles de la muqueuse, les modifications structurelles de la sous muqueuse et du tissu interstitiel, et les modifications leucocytaires. Ces 3 niveaux d'observation ainsi que les descriptions faites ont permis de construire les grilles histologiques et d'attribuer les sous-scores (entre 0 et 8) pour l'ensemble des tissus, par analogie, à l'exception du rein. En effet, la démonstration de l'implication de *C. pecorum* est récente (Higgins D.P. *et al.*, 2005) : elle a été retrouvée dans les cellules épithéliales et les macrophages en association avec une pyélonéphrite pyogranulomateuse (8/11 cas) et une néphrite interstitielle focale (3/11 cas). Cet article donne par ailleurs une description des modifications histologiques observées, celle-ci ayant permis de construire la grille de score pour le rein (choix des critères les plus spécifiques et échelonnage des sous-scores).

Les résultats de l'analyse semi-quantitative (figure 31) font clairement apparaître une distinction nette entre les koalas « sains » (n° 1 et 3) et les koalas « infectés » (koalas 2 et 4). Les scores lésionnels attribués à ceux-ci sont nettement supérieurs à ceux des deux autres pour les appareils urinaires (hauts et bas) et les bas appareils génitaux (rappelés dans le tableau X). Malgré le mauvais état général des koalas inclus dans la catégorie 1 (« sains »), leurs scores restent à un bas niveau : ainsi, les critères retenus dans les grilles d'évaluation semblent relativement spécifiques d'une affection chlamydienne du tractus urogénital.

Koalas	1	2	3	4
App. ur. bas	2	78	5	29
App. ur. haut	3	22	1	48
App. gén. bas	1	64	3	21
App. gén. haut	0	7	0	3

Tableau X : Rappels des scores lésionnels par étage du tractus urogénital

Concernant les résultats exposés dans la figure 30, il est à noter que, dans l'ensemble, l'analyse nécropsique est en accord avec l'analyse histologique mais la part histologique dans le score final est toujours prédominante (notamment pour le rein du koala 4 évalué à 50/100 dont 48/100 obtenue à l'histologie). L'examen histologique participe à hauteur de 60 à 100% dans le score final pour l'ensemble des tissus et des koalas. La plus grande sensibilité de l'examen histologique et la faible spécificité des lésions macroscopiques recherchées (signes d'inflammation) à l'autopsie permettent d'expliquer cette différence.

Il est évident que l'utilisation d'une telle méthode présente une part importante de subjectivité, la distinction entre modification légère, modérée et sévère de certains critères n'est pas évidente à trancher. Cependant la rigueur et la précision des critères choisis permettent de limiter le caractère subjectif des observations. Ces scores n'ont pas de valeur dans l'absolu, ils permettent de comparer le degré d'atteinte des tissus aux différents étages et de comparer la virulence des souches en présence. L'attribution des scores doit être faite par le même anatomohistopathologiste pour l'ensemble des tissus, afin de rendre les résultats homogènes : l'importance ne doit pas être accordée au score mais à la différence relative entre les scores.

3. Deux schémas pathogéniques différents

Les tissus du koala 2 montrent des scores lésionnels macro et microscopiques importants pour le tractus urogénital bas traduisant une ascension de l'infection à partir d'une contamination vénérienne. Ceci est le processus d'infection le mieux décrit, processus qui en fait la Maladie Sexuellement Transmissible (MST) la plus répandue dans le monde (Beagley K.W. et Cunningham K.A., 2008). Les résultats du koala 4 traduisent plutôt une infection descendante du tractus urogénital. Dans le deuxième cas, la transmission se serait faite par contact étroit entre les conjonctives et une source infectante (combat entre mâles notamment) ayant entrainé d'importants symptômes oculaires; des *chlamydia* pourraient alors avoir été disséminées dans le flux sanguin et infectées les reins (tissu cible et important filtre sanguin), jusqu'à redescendre au bas appareil urinaire. Ce processus a été mis en évidence chez un koala, infecté expérimentalement au niveau oculaire par *C. psitacci* (seule espèce reconnue chez le koala en 1986) et qui a développé des symptômes urogénitaux par la suite (Brown A.S. et Grice R.G., 1986). La très forte atteinte oculaire a pu permettre une dissémination sanguine des corps élémentaires, notamment via les monocytes, ayant entraîné une infection des cellules épithéliales rénales, pour lesquelles une affinité de *C. pecorum* a été démontrée (Higgins D.P. *et al.*, 2005).

4. Autres analyses envisageables

L'infection du tractus urogénital par la chlamydophilose s'accompagne généralement de surinfection par des bactéries opportunistes de type coques Gram-positif et bacilles Gram-négatif; au niveau rénal, *Bacteroïdes spp.* et *Actinobacillus spp.* ont été retrouvés en association avec *C.*

pecorum (Higgins D.P. et al., 2005). Il serait donc intéressant d'inclure dans l'étude la recherche d'autres agents étiologiques pouvant intervenir en association avec les *chlamydia*, voire seule, dans la pathogénie. En effet, l'évaluation de la virulence est basée sur l'infection par *C. pecorum* mais la mise en évidence d'autres agents pathogènes doit conduire à minimiser ce score le cas échéant. Dans les résultats présentés, il n'y a aucune évidence de l'intervention (unique ou non) de *C. pecorum* dans les processus pathologiques. La présence d'ADN est confirmée par PCR mais une observation directe grâce à l'immunomarquage s'impose afin de pouvoir conclure sur une éventuelle virulence imputable à une souche de *chlamydia*.

Par ailleurs, une partie des lésions est due à la destruction directe des cellules par C. pecorum, mais la plupart des dommages tissulaires sont immuno-dépendants (Kuo C.C., 1988). En effet, certaines cytokines telles interleukine-1, interleukine-6, IFN γ et TNF α , produits en réponse à une infection, ont un pouvoir anti-chlamydien, mais produisent fibrose et destruction cellulaire (Fitzpatrick D.R. et~al., 1990). L'hypersensibilité et l'auto-immunité peuvent également intervenir dans le processus pathologique (Brunham R.C. et Peeling R.W., 1994). Il serait donc utile d'explorer en parallèle de l'étude l'impact de ces cytokines (immunodosage) afin de faire la part entre la virulence directement imputable aux bactéries et les conséquences immunologiques d'une telle infection.

E. <u>Analyse quantitative par PCR en temps réel et identification des souches</u>

1. Analyse des résultats

Des résultats aberrants ont été obtenus pour les réactions PCR des tissus des koalas 1 et 2 (figure 32). Malgré la clinique non équivoque et la forte positivité au test *Clearview* du koala 2, le nombre de copies retrouvées dans les tissus présentant le plus de lésions est très faible (inférieur à 10) et équivalent à celui du koala 1 cliniquement sain (négatif au Clearview test). Par ailleurs aucune anomalie sur les contrôles négatifs et positifs n'est relevée. Une seconde tentative sur les mêmes prélèvements a confirmé les résultats obtenus : très faible quantité de copies pour le koala 2 (25 copies/µl pour la vessie) et quasi absence de copies pour l'ensemble des tissus du koala 1. Il est à noter qu'aucune copie de *C. pneumoniae* n'a été mise en évidence lors des 2 essais, ce qui est en accord avec les études épidémiologiques (faible prévalence de *chlamydia* chez le koala).

La présence de copies pour le koala 1 est imputable soit à la présence d'une faible quantité de *chlamydia* (portage de bas niveau), hypothèse cohérente avec la très forte prévalence de *C. pecorum* existant dans les populations de koalas (infection chronique asymptomatique, *cf.* épidémiologie), soit à la contamination lors de la réalisation des prélèvements ou de l'extraction d'ADN. Ce risque est minimisé par la technique de réalisation de ces différentes étapes et l'hypothèse peut être rejetée étant donné les résultats des contrôles négatifs).

Le très faible nombre de copies obtenu sur le koala 2 est imputable soit :

- Absence de *chlamydia* (ou simple « colonisation ») dans les prélèvements.
- Co-infection à l'origine d'une compétition avec les *chlamydia*.
- Présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase
- Mauvaise qualité d'extraction d'ADN (protocole Trizol ND).

Selon le professeur Timms, la première hypothèse ne peut être retenue au regard des résultats obtenus sur d'autres études en cours, qui suggèrent une forte présence de *chlamydia* sur les koalas cliniquement atteints et positifs au test ELISA. Il aurait été cependant nécessaire de s'assurer de l'absence d'une co-infection, afin d'éliminer l'hypothèse d'une compétition bactérienne. Concernant la présence d'inhibiteurs que peuvent constituer prioritairement le collagène, la myoglobine, l'hémoglobine ou encore l'urée (susceptibles d'être présents dans les tissus prélevés), par interaction directe avec l'ADN ou avec la polymérase (Besetti J., 2007) : cette hypothèse a été testée sur les échantillons des koalas 3 et 4 et le résultat s'est révélé négatif. La dernière hypothèse (problème d'extraction) n'a pas été vérifié sur ces prélèvements mais le protocole d'extraction d'ADN a cependant été modifié pour ceux des koalas 3 et 4.

A l'issue de cette analyse, seule la présence, même en faible quantité, de *chlamydia* chez ces deux individus est confirmée (sensibilité de quasi 100%). En revanche, le nombre de copies trouvé n'a pas de valeur d'interprétation (non cohérent avec les études actuellement menées par le professeur Timms).

A partir de ces observations, le protocole d'analyse PCR a été modifié pour les koalas 3 et 4 :

- L'extraction d'ADN s'est faite selon le protocole QIAamp DNA Mini Kit
- 3 écouvillons (cloaque, urètre, vessie) ont été ajoutés à l'analyse
- La présence d'inhibiteurs pour chaque prélèvement a été testée. Le principe repose sur le mélange de témoin positif et d'échantillons à tester : si l'échantillon contient des inhibiteurs, le résultat est négatif en fin d'analyse.

Les résultats, présentés en figure 33, ne montrent pas de différence significative avec les résultats obtenus pour les koalas 1 et 2 (échantillons tissulaires) : portage de bas niveau (excepté pour l'uretère du koala 4). L'absence d'inhibiteurs a été démontrée pour l'ensemble des échantillons des koalas 3 et 4.

En revanche, les écouvillons réalisés sur le koala 4 montrent des résultats totalement différents de ceux obtenus sur les tissus ; en effet, 142 500 copies par μl ont été obtenues pour l'écouvillon cloacal, ce qui traduit une forte charge bactérienne malgré la faible symptomatologie urogénital de cet individu. Les écouvillons du koala 3 sont quant à eux démonstratifs d'une « colonisation » par *C. pecorum* du tractus urogénital (6 copies/μl pour le cloaque et l'urètre et 13 copies/μl pour la vessie), en accord avec les résultats obtenus sur les tissus. Pour aider à la compréhension, un récapitulatif des résultats est dressé dans le tableau XI.

	Ana	lyse PC	R sur t	issus	Analyse PCR sur	écouvillons
Koalas	1	2	3	4	3	4
Nombre de copies par μl		la majo) copies rité des tillons	-	Entre 8 et 11	Entre 95 et 140000
Interprétation	Po	ortage b	oas nive	аи	« colonisation »	Forte charge bactérienne

Tableau XI : Récapitulatif des résultats de PCR

L'hypothèse d'infection descendante émise pour le koala 4 permet d'expliquer la forte charge bactérienne retrouvée au niveau du bas appareil urogénital (écouvillons cloacal et urétral), sans développement du syndrome « dirty tail ». En effet, la contamination de l'urine se ferait à partir des reins et de l'uretère (où l'infection est active) permettant la dissémination de l'infection à l'étage inferieur, au niveau de la vessie et de l'urètre. Par ailleurs, les écarts importants du nombre de copies de *chlamydia* relevés sur les différents écouvillons (croissants en descendant le tractus urogénital), s'explique par la technique de prélèvement elle-même : l'écouvillonnage cloacal et urétral impliquent un contact plus étroit et plus intense entre l'épithélium et l'écouvillon que pour celui de la vessie, permettant ainsi de piéger le matériel en plus grande proportion.

Ces résultats prouvent l'invalidité d'interprétation de l'analyse PCR quantitative réalisée directement sur les échantillons tissulaires. Malgré la présence de *chlamydia* dans les tissus, leur ADN est infiniment dilué dans celui des cellules du koala lors de l'extraction. Par opposition, l'écouvillonnage permet quant à lui de ne prélever que du matériel au niveau épithélial, ou se concentrent les *chlamydia*: ainsi, lorsque la charge bactérienne est forte, la PCR quantitative va pouvoir le refléter par cette technique de prélèvement.

2. Invalidité de la méthode utilisée

Un des constats majeurs de notre étude concerne le choix de la méthode d'analyse quantitative. La PCR quantitative mesure de manière précise la quantité initiale de la cible. Sa sensibilité permet de détecter un faible nombre de copies (1 copie est théoriquement nécessaire pour être détectée à l'issue de 33 cycles). Cette sensibilité alliée à une grande précision différencie des variations très faibles entre échantillons ou permet de travailler avec des échantillons en très faible quantité (Broutin J., 2007). Malgré son excellente sensibilité, la PCR en temps réel ne s'est pas révélée utile dans le cadre de l'étude.

La recherche de copies de *C. pecorum* sur les écouvillons prélevés des koalas 3 et 4, par méthode PCR quantitative permet de conclure que la PCR manque de performance lorsqu'elle est réalisée sur tissus : en effet, le nombre de copies retrouvées sur ces écouvillons correspondent plus aux attentes, contrairement aux résultats sur tissus. Ceci s'explique par le fait que l'écouvillonnage est une technique de prélèvement superficiel, au niveau des muqueuses, là où se trouvent les *chlamydia*; il s'opère alors un effet de concentration des bactéries, les cellules hôtes étant constituées exclusivement des cellules épithéliales desquamées. Cependant, la technique d'écouvillonnage reste limitée aux muqueuses directement accessibles (urètre, cloaque, voire vessie en *post mortem*), et bien que représentatif de la charge bactérienne présente au niveau mucosal, l'écouvillonnage est opérateur dépendant (temps, pression, rotation...) et il est probable que d'importantes variations de résultats existent pour un même individu.

Il apparaît ainsi nécessaire de modifier le protocole afin de pouvoir analyser la charge bactérienne au niveau de chaque tissu. La forte dilution des copies de *chlamydia* (qui ne se trouvent qu'en surface et non en profondeur) au sein des tissus prélevés est probablement à l'origine des mauvais résultats constatés. Il serait donc nécessaire de réduire la taille des prélèvements et les limiter aux muqueuses selon des critères standardisés. Par ailleurs, une normalisation du nombre de copies obtenus par PCR quantitative est nécessaire : celle-ci permet d'obtenir un ratio entre le nombre de *chlamydia* présents dans le prélèvement et le nombre de cellules hôtes du koala présents dans ce même prélèvement (Markey B. *et al.*, 2007). Cette méthode permet de contourner le biais liée à la technique de prélèvement. Pour cela, le gène codant pour la β-actine du koala est choisi comme la cible d'une PCR quantitative réalisée en parallèle de la PCR quantitative ciblant le gène

16SrRNA (amorces « K beta actin R » et «K beta actin L » ciblant une région de 82 paires de bases).

3. Autres analyses envisageables

a. La découverte de nouvelles espèces chlamydiennes chez le koala

L'étude s'est par ailleurs focalisée sur C. pecorum, cette espèce ayant été démontrée comme largement répandue dans les populations de koalas et responsable de conjonctivite, cystite, néphrite et inflammation du tractus urogénital (Jackson A.R. et Cockram P.A., 1981) (Jackson M. et al., 1999) (Timms P., 2005). Pourtant, l'utilisation de nouvelles amorces PCR ciblant de nouvelles familles de Chlamydiales a montré l'existence d'autres espèces que C. pecorum et C. pneumoniae : neuf nouveaux génotypes ont été identifiés, regroupés au sein d'un même groupe nommé Chlamydia-like, séparé des espèces de Chlamydiaceae (Devereaux L.N. et al., 2003). Dans la population sauvage étudiée par Devereaux, une prévalence chlamydienne de 72% a été démontrée, dont 52% pour C.pecorum, 12% pour C.pneumoniae et plus de 50% pour ces néo-chlamydia. La plupart des individus infectés présentaient une co-infection par plusieurs de ces espèces. Les nouveaux génotypes chlamydiens ont été retrouvés au niveau oculaire et urogénital, il est probable qu'ils puissent causer la maladie aussi bien que les espèces connues jusque là. Ainsi, pour les besoins de l'étude, une recherche de ces nouvelles espèces Chlamydia-like devraient être systématiquement entreprises en même temps que C. pecorum et C. pneumoniae, afin d'en évaluer l'implication dans la pathogénie du syndrome. Cette recherche passe par l'utilisation de nouvelles amorces ciblant le gène 16SrRNA, nommées UKC-A, UKC-B et UKC-C (Devereaux L.N. et al., 2003). Malgré cette découverte, la plupart des études actuelles portant sur la chlamydophilose du koala ne s'y intéressent pas. C. pneumoniae reste au premier plan : cette espèce a été reconnue en 1989 et les souches isolées de l'homme (respiratoire et cardiovasculaire) sont génétiquement identiques. Cependant, cela a été montré en utilisant quatre gènes marqueurs, les souches isolées à partir de koalas montrent quelques polymorphismes mineurs comparés aux souches humaines, suggérant une origine différente (Wardrop S. et al., 1999). Pourtant, une équipe de chercheurs, après avoir isolé C. pneumoniae à partir de plaques d'athérosclérose au niveau de la carotide de patients, et génotypé deux fragments de gènes (ompA et ygeDŔurk), s'est aperçue qu'il s'agissait des mêmes souches que celles isolées chez le koala (Cochrane M. et al., 2005). Cette très grande proximité entre les souches humaines et les souches isolées de nombreux animaux à sang chaud et froid (nombreuses espèces d'amphibiens, de reptiles, de faune australienne dont le koala) explique l'intérêt porté à cet agent pathogène malgré sa faible prévalence et sa faible implication clinique chez ces espèces.

b. Identification des souches de C. pecorum

L'analyse des souches n'a pu être réalisée dans le cadre de l'étude par défaut de temps et d'échantillons disponibles. Il était prévu de disposer d'une dizaine d'individus infectés alors que seuls deux koalas remplissaient les critères d'inclusion ont pu être étudiés durant notre présence au laboratoire entre septembre et décembre 2009. Le typage des souches, anciennement réalisé par sérotypage (utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents de la MOMP) comme cela est encore le cas pour *C. trachomatis* (Stephens R.S. *et al.*, 1982), est actuellement réalisé par génotypage. L'analyse de la séquence de nucléotides des gènes 16SrRNA et 23SrRNA a permis de construire la nouvelle classification du genre *Chlamydia* (Everett K.D.E. et al., 1999) du fait de la grande conservation de ce gène, mais son analyse ne permet pas une distinction fine des souches au sein d'une espèce. C'est pour cette raison que ce gène ne peut être utilisé pour génotyper les souches de *C. pecorum*. Il est nécessaire de sélectionner un gène présentant une importante

variabilité au sein de l'espèce, pouvant révéler une potentielle divergence des souches. Le gène codant la partie variable du domaine IV de la MOMP, nommé *VD4-ompA*, est le gène chlamydien le plus polymorphique : ceci est dû à l'importante pression immunitaire s'opérant sur ce domaine protéique ; la MOMP représente en effet la principale cible de la réponse immunitaire de l'hôte (Fitch W.M. *et al.*, 1993). D'ailleurs, l'analyse phylogénétique de ce gène au sein du genre *Chlamydia* est en désaccord avec la classification classique, et tend à prouver que ce gène ne répond pas à une contrainte coévolutive mais à celle d'un pathogène versatile : c'est donc un parfait candidat à l'identification des souches (Fitch W.M. *et al.*, 1993). Cinq génotypes (A, B, C, D et E) obtenus à partir de 15 koalas captifs ou sauvages infectés par *C. pecorum* ont été identifiés (Jackson M. *et al.*, 1997). Ces génotypes sont actuellement pris comme références pour classer les souches *de C. pecorum* infectant le koala, mais des études en cours pourraient les modifier profondément grâce à un échantillonnage plus conséquent (koalas infectés sains) et le séquençage d'autres gènes candidats (Timms P., communication personnelle).

c. Etude génétique de la virulence des souches

Une équipe de recherche française (Mohamad K.Y. et al., 2008) s'est intéressée à l'identification phylogénétique des souches virulentes de C. pecorum chez les ruminants par l'utilisation d'un système MVLST (typage par séquençage de plusieurs locus de virulence). 19 souches de C. pecorum (8 classés pathogènes et 11 considérés comme non-pathogènes, sur des critères cliniques) inclus dans l'étude ont pu être discriminées par le séquençage de 12 gènes (6 supposés de virulence dont ompA et incA, 5 gènes domestiques et le gène ORF663). L'analyse phylogénétique basée uniquement sur ompA, ou sur l'association d'ompA-incA-ORF663, permet de différencier les souches pathogènes des souches non-pathogènes. Ainsi, le système MVLST apparaît comme une méthode prometteuse dans l'identification différentielle des souches virulentes de C. pecorum, et ces gènes constituent d'excellents marqueurs moléculaires pour de prochaines études épidémiologiques sur C. pecorum. Cette corrélation entre la phylogénie du gène ompA et la virulence des souches isolées, n'a pas été démontrée pour les souches de C. pecorum infectant le koala mais devra être étudiée dans la continuité de l'étude présentée dans ce troisième chapitre : à la différence de l'étude de Mohamad (2008), dans laquelle une dichotomie sépare les souches pathogènes des souches non-pathogènes, il pourrait être possible grâce à la méthode développée pour les souches du koala, de discriminer les souches selon leur degré de virulence (critères lésionnels et cliniques).

d. Importance de la chlamydophilose dans la survie des koalas

L'étude de la virulence des souches de *C.pecorum* sur le tractus urogénital du koala mâle s'inscrit dans deux des trois programmes d'avenir pour la sauvegarde de l'espèce que sont le développement d'un vaccin contre la chlamydophilose (mené par l'équipe du professeur Timms) et la recherche sur l'insémination artificielle, notamment la contamination et le traitement de la semence (menée par l'équipe du professeur Johnson). Le troisième axe d'avenir pour la sauvegarde du koala concerne la gestion des populations réservoirs des îles du sud de l'Australie, présentant l'avantage d'être indemnes de maladies émergentes, mais étant fortement consanguines.

Le développement d'un vaccin sous-unitaire donne des premiers résultats satisfaisants, mais les essais les plus importants restent à venir avec notamment l'étude de l'effet sur des populations cliniquement atteintes par la chlamydophilose. Les découvertes éventuelles qu'apporteront l'étude présentée dans cette thèse pourraient permettre de mieux comprendre la pathogénie de la maladie chez le koala, d'identifier des souches plus virulentes que d'autres (intervention de protéines spécifiques) et le cas échéant, améliorer la composition et le protocole vaccinal.

L'insémination artificielle des koalas est déjà maitrisée et utilisée au sein des populations captives de koalas ; ainsi 25 joeys sont nés par cette méthode depuis 2006, qui tend à se développer dans les parcs zoologiques. Cette technique permet d'apporter un pool de gènes sauvages au sein des populations captives, limitant la consanguinité ou le transport des reproducteurs dans les programmes d'échange. Pourtant l'effet de la chlamydophilose sur l'appareil reproducteur du koala mâle est encore mal connu (haut appareil génital) : la semence prélevée pour réaliser l'acte doit être non contaminée par des souches de *C. pecorum*, ou le cas échéant décontaminée par antibiothérapie. L'étude apportera des réponses sur l'effet de la chlamydophilose sur la fertilité du mâle et sur le processus de contamination de la semence selon les différentes souches virulentes ou non. L'objectif étant d'obtenir une semence parfaitement indemne de chlamydophilose malgré l'importante prévalence de la maladie, une transmission de la maladie par insémination artificielle serait l'échec d'un programme ambitieux qui permettra probablement de prolonger la survie de cette espèce.

CONCLUSION

En moins de deux cents ans, la population de koalas s'est réduite de 99%, plaçant cette icône australienne parmi la longue liste des espèces menacées. La perte d'habitat constitue actuellement la principale menace à court terme. Pourtant l'émergence de nouvelles maladies infectieuses, telles que la rétrovirose ou la chlamydiose, pourrait conduire à l'extinction du koala à moyen terme. Due à Chlamydophila pecorum, bactérie pathogène intracellulaire obligatoire transmise par contact étroit, la chlamydiose se traduit cliniquement par des symptômes oculaires (kératoconjonctivite), urinaires (syndrome « dirty tail ») et génitaux (infertilité). Les particularités du cycle de développement des chlamydies expliquent en partie l'épidémiologie de cette affection, caractérisée par une très forte prévalence de l'infection au sein des populations de koalas et une très faible proportion d'individus développant la maladie. Les souches isolées chez le koala présentent de nombreuses analogies avec celles infectant le bétail australien et européen, ce qui tend à prouver l'existence d'une transmission interspécifique. Afin d'étudier la virulence des souches de C. pecorum vis-à-vis du tractus urogénital mâle du koala, une méthode d'évaluation semi-quantitative basée sur des critères cliniques, nécropsiques et histologiques a été développée et testée sur quelques animaux. Les premiers résultats obtenus ont permis de souligner l'intérêt de la démarche et de valider, sous réserve de quelques améliorations, le protocole choisi. Ainsi, l'étude des lésions microscopiques pourrait être réalisée avec d'autres colorations plus spécifiques que l'hématoxyline et éosine. D'autre part, l'utilisation de techniques d'immunomarquage pourrait constituer une alternative intéressante à l'évaluation quantitative réalisée par PCR en temps réel et dont les résultats sur tissus se sont révélés décevants. La méthodologie retenue peut permettre de mieux comprendre certaines interactions entre la bactérie et son hôte. De plus, une meilleure connaissance de la virulence des souches apparaît comme primordiale pour la mise au point d'un vaccin, alternative de choix chez un animal intolérant aux antibiotiques. La portée des études sur la chlamydiose du koala dépasse le simple intérêt pour l'emblème australien, car cette affection constitue également un modèle d'étude de l'infection chez l'Homme.

Le professeur responsable De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

-1. vialge

Lyon

Le Président de la thèse

Vu et permis d'imprimer

2 6 AVR. 2010 Lyon le

Pour le Président de l'Université, Le président du comité de coordination des Etudes Médicales

寅

Professeur F.N. GILLY

Vu : Le Directeur

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de

Par délégation Pr F. Grain - DEVE

VetAgro Sup Campus Vétérinaire

Bibliographie

- AKF. *History of Koalas*. 2009. https://www.savethekoala.com/koalashistory.html (accès le Décembre 6, 2009).
- f . Koala habitat. 2009. https://www.savethekoala.com/koalashabitat.html (accès le September 30, 2009).
- f . *Life cycle of the koala*. 2009. https://www.savethekoala.com/koalaslifecycle.html (accès le Décembre 6, 2009).
- f . *Physical Characteristics of the koala*. 2009. https://www.savethekoala.com/koalasphysic.html (accès le Décembre 6, 2009).
- f . *Taxonomy*. 2009. https://www.savethekoala.com/koalastaxonomy.html (accès le Septembre 30, 2009).
- f . *The Koala Endangered or not?* 2009. https://www.savethekoala.com/koalasendangered.html (accès le Décembre 6, 2009).
- f . *Threats to the Koala*. 2009. https://www.savethekoala.com/koalasthreats.html (accès le Décembre 6, 2009).
- Backhouse, T.C., et A. Bolliger. «Morbidity and Mortality in the koala (Phascolarctos cinereus).» *Australian Journal of Zoology*, 1961: 24-37.
- Beagley, K.W., et K.A. Cunningham. «Male Genital Tract Chlamydial Infection: Implications for Pathology and Infertility.» *Biology of Reproduction*, 2008: 180-189.
- Beaty, W.L., R.P. Morrison, et G.L. Byrne. «Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis.» *Microbiology Review*, 1994: 689-699.
 - Bessetti, J. «An Introduction to PCR Inhibitors.» *Promega*, march 2007: 9-10.
- Bodetti, T.J., K. Hengstberger, S. Johnston, et P. Timms. «Evaluation of tetracycline, erythromycin, penicillin and streptomycin for decontaminating koala semen contaminated in vitro with chlamydiae.» *Veterinary Record*, 2003: 588-591.
- Bodetti, T.J., Timms P., Hengstberger K., et Johnston S. «Evaluation of tetracycline, erythromycin, penicillin and streptomycin for decontaminating koala semen contaminated in vitro with chlamydiae.» *The Veterinary Record*, 2003: 588-591.
- Broutin, Joëlle. «La PCR quantitative en temps réel:outil d'analyse pour la recherche et la clinique.» *LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE*, mars-avril 2007: 23-24.
- Brown, A.S., A.A. Girjes, M.F. Lavin, P. Timms, et Woolcock, J.B. «Chlamydial disease in koalas.» *Australian Veterinary Journal*, 1987: 346-350.

- Brown, A.S., et J.B. Woolcock. *Australian Koala Foundation, Koala Management*. Queensland, 1987.
- Brown, A.S., et R.G. Grice. «Isolation of Chalmydia psittaci from koalas (Phascolarctos cinereus).» *Australian Veterinary Journal*, 1984: 413.
- Brown, A.S., et R.G. Grice. «Experimental transmission of Chlamydia psitacci in the koala.» Dans *Chalamydial infections*. Cambridge University Press, 1986.
- Brown, A.S., F.N. Carrick, G. Gordon, et K. Reynolds. «The diagnosis and epidemiology of an infertility disease in the female koala Phascolarctos cinereus.» *Veterinary Radiology*, 1984: 242-248.
- Brunham, R.C., et R.W. Peeling. «Chlamydia trachomatis antigens: role in immunity and pathogenesis.» *Infectious Agents and Disease*, 1994: 218-133.
- Byrne, G.I., et Ojcius D.M. «Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen.» *Nature*, 2004: 802-808.
- Canfield, P.J., C.J. Oxenford, et G.R. Lomas. «A disease outbreak involving pneumoniae in captive koalas.» *Australian Veterinary Journal*, 1986: 312-313.
- Canfield, P.J., D.N. Love, G. Mearns, et A. Farram. «Chlamydial infection in a colony of captive koalas.» *Australian Veterinary Journal*, 1991: 167-169.
- Canfield, P.J., et S. Hemsley. «The roles of histology and immunohistology in the investigation of marsupial disease and normal lymphoid tissue.» *Developmental and Comparative Immunology*, 2000: 455-471.
- Canfield, P.J., et W.J. Hartley. «Tyzzer's disease (Bacillus piliformis) in Australian marsupials.» *Journal of Comparative Pathology*, 1991: 167-173.
- Canfield, P.J., M.E. O'Neill, et E.F. Smith. «Haematological and biochemical investigations of diseased koalas (Phascolarctos cinereus).» *Australian Veterinary Journal*, 1989: 269-272.
- Carey, A.J., et al. «A multi-subunit chlamydial vaccine induces antibody and cell mediated immunity in immunized koalas (Phascolarctos cinereus): comparaison of three adjuvants.» *Australian Journal of Immunology*, 2009.
- Carrick, F.N., et A.D. Wood. Wildlife Disease Association Conference. Mt Tamborine, 1986. Abstract.
- Cifelli, R.L., et B.M. Davis. «Paleontology. Marsupial origins.» *Science*, 12 December 2003: 1899-900.
- Cochrane, M., P. Walker, H. Gibbs, et P. Timms. «Multiple genotypes of Chlamydia pneumoniae identified in human carotid plaque.» *Microbiology*, 2005: 2285-2290.
- Cockram, F.A., et A.R.B. Jackson. «Isolation of a Chlamydia from cases of kerato-conjonctivitis in koalas.» *Australian Veterinary Journal*, 1974: 82-83.
 - f . «Chlamydial kerato-conjonctivitis in koalas.» Australian Veterinary Practicioner, 1976: 36-38.

- Connolly, J.H., Krockenberger M. B., Malik R., Canfield P. J., Wigney D. I., et Muir D. B. «Asymptomatic carriage of Cryptococcus neoformans in the nasal cavity of the koala (Phascolarctos cinereus).» *International Society for Human and Animal Mycology*, 1999: 331-338.
- Cork, S.J., et J.D. Sanson. «Digestion and nutrition in the koala: a review.» Dans *Biology of the Koala*, 129-144. Sydney: AK Lee, KA Handasyde, GD Sanson, 1990.
 - Cronin, L. Form and Function in the Koala, Australia's Endearing Marsupial. Reed Books, 1987.
- Darougar, S. «The Humoral Immune Response to Chlamydial Infection in Humans.» *Reviews of Infectious Diseases*, 1985: 726-730.
- Degabriele, R., et T.J. Dawson. «Metabolism and heat balance in an arboreal marsupial, the koala (Phascolarctos cinereus).» *Journal of Comparative Physiology*, 1979: 293-301.
- Dessus-Babus, S., Bebear C.M., Charron A., Bebear C., et De Barbeyrac B. «Sequencing of Gyrase and Topoisomerase IV Quinolone-Resistance.» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998: 2474Ř2481.
- Devereaux, L.N., Polkinghorne A., Meijer A., et Timms P. «Molecular evidence for novel chlamydial infections in the koala (Phascolarctos cinereus).» *Systematic and Applied Microbiology*, 2003: 245-253.
- Emmins, J.J. «The Victorian koala : genetics, heterogeneity, immune responsiveness and epizootiology of chlamydiosis.» PhD, Melbourne, 1996.
- Entrican, G., et al. «Induction of inflammatory host immune responses by organisms belonging to the genera Chlamydia/Chlamydophila.» *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004: 179-186.
- Everett, K.D.E, et Bush R. M. «Molecular evolution of the Chlamydiaceae.» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001: 203-220.
- Everett, K.D.E., R.M. Bush, et A.A. Andersen. «Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiales fam.nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five species, and standards for the identification organisms.» *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999: 4415-440.
- Finckh, E.S., et A. Bolliger. «Serous cystadenomata of the ovary in the koala.» *Journal of Pathology and Bacteriology*, 1963: 526-528.
- Fitch, W.M., E. M. Peterson, et L.M. de la Mazat. «Phylogenetic Analysis of the Outer-Membrane-Protein Genes of Chlamydiae, and Its Implication for Vaccine Development.» *Molecular Biological Evolution*, 1993: 892-913.
- Fitzpatrick, D.R., H. Bielefeldt-Ohmann, et I.D. Gardner. «Immune responses to Chlamydia trachomatis infections.» *Today's Life Sciences*, 1990: 18-23.
 - Flannery, T.F. The Future Eaters. Sydney: Reed Books, 1994.
- Fowler, A. «Epidemiological aspects and genetic variation of Chlamydia in two free-range koala populations.» PhD, Brisbane, 1997.
- Fukushi, H., et K. Hirai. «Proposal of Chlamydia pecorum sp Nov. For Chlamydia strains derived from ruminants.» *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992: 306-308.

- Gallegos, G., Ramos B., Santiso R., Goyanes V., Jaime Gosálvez M.D., et Fernández J.L. «Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma.» *Fertility and Sterility*, 2008: 328-334.
- Girjes, A.A., A.F. Hugall, et D.M. Graham. «Comparaison of type I and type II Chlamydia psitacci strains infecting koala Phascolarctos cinereus.» *Veterinary Microbiology*, 1993: 65-83.
- Girjes, A.A., A.F. Hugall, P. Timms, et M.F. Lavin. «Two distinct forms of Chlamydia psitacci associated with disease and infertility in Phascolarctos cinereus (koala).» *Infection and Immunity*, 1988: 1897-1900.
- Girjes, A.A., B.J. Weigler, A.F. Hugall, F.N. Carrick, et M.F. Lavin. «Detection of Chalmydia psitacci in free-ranging koalas (Phascolarctos cinereus): DNA hybridization and immuno-slot blot Analyses.» *Veterinary Microbiology*, 1989: 21-30.
- Girjes, A.A., F.N. Carrick, et M.F. Lavin. «Remarkable sequence relatedness in the DNA encoding the major outer membrane protein of Chlamydia psitacci (koala type I) and Chlamydia pneumoniae.» *Gene*, 1994: 139-142.
- Girjes, A.A., W.A. Ellis, M.F. Lavin, et F.N. Carrick. «Immuno-dot blot as a rapid diagnostic method for detection of chlamydial infection in koalas (Phascolarctos cinereus).» *The Veterinary Record*, 1993: 136-141.
- Godthelp, H., Archer M., Cifelli R., Hand S. J., et Gilkeson C. F. «Earliest known Australian Tertiary mammal fauna.» *Nature*, 1992: 514-516.
- Governement, Queensland. «Nature Conservation (Koala) Plan 2006 and Management Program 2006-2016.» 2006.
- Grayston, J.T. «Chlamydia pneumoniae sp.nov. for Chlamydia sp. TWAR.» *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1989: 88-90.
- Guymer, G., Neldner J., Kunst N., et Williams R. *Environmental Protection Agency. Biodiversity: Species protection.* 2007. http://www.epa.qld.gov.au/environmental_management/state_of_the_environment_queensland 2007 (accès le Décembre 3, 2009).
- Haight, J.R., et J.E. Nelson. «A brain that doesn't fit its skull: a comparative study of the brain and endocranium of the koala, Phascolarctos cinereus (Marsupilia: Phascolarctidae).» Dans *Possums and Opossums: Studies in Evolution*, 331-352. Sydney: M Archer, 1987.
- Hammerschlag, M.D. «The intracellular life of Chlamydiae.» Seminars in Pediatric Infections Diseases, 2002: 239-248.
- Handasyde, K.A., Obendorf D.L., Martin R.W., et MacDonald L.A. «The effect of exogenous oestrogen on fertility and the reproductive tract of the female koala.» Dans *Biology of the Koala*, 243-248. Australia: Surrey Beatty and Sons, 1990.
- Hanger, J.J., Bromham D.L., McKee J.J., O'Brien T. M., et Robinson W. F. «The Nucleotide Sequence of Koala (Phascolarctos cinereus) Retrovirus: a Novel Type C Endogenous Virus Related to Gibbon Ape Leukemia Virus.» *Journal of Virology*, 2000: 4264-4272.

- Hemsley, S., et P.J. Canfield. «Proctitis associated with chlamydial infection in a koala.» *Australian Veterinary Journal*, 1996: 148-150.
- f . «Histopathological and Immunohistochemical Investigation of Naturally Occuring Chlamydial Conjonctivitis and Urogenital Inflammation Koala (Phascolarctos cinereus).» *Journal of Comparative Pathology*, 1997: 273-290.
 - Henneberg, Macie J. «Fingerprint homoplasy: koalas and humans.» Natural science, 11 March 1997.
- Higgins, D.P., S. Hemsley, et P.J. Canfield. «Immuno-histochemical Demonstration of the Role of Chlamydiaceae in Renal, Uterine and Salpingeal Disease of the Koala, and Demonstration of Chlamydiaceae in Novel Sites.» *Journal of Comparative Pathology*, 2005: 164-174.
- Hori, S., et Y. Tsutsumi. «Histological Differentiation between chlamydial and bacterial epididymitis: non destructive and proloferative versus destructive and abscess forming immunohitochemical and clinicopathological findings.» *Human Pathology*, 1995: 402-407.
- Hulbert, A.J., et P.L. Else. «Membranes as possible pacemakers of metabolism.» *Journal of Theoritical Biology*, 1999: 257-274.
 - Hume, I.D. Marsupial Nutrition. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- Jackson, A.R, et F.A. Cockram. «Keratoconjunctivitis of the koala, Phascolarctos cinereus, caused by Chlamydia psittaci.» *Journal of Wildlife Diseases*, 1981: 497-504.
- Jackson, M., P. Giffard, et P. Timms. «Outer membrane protein A gene sequencing demonstrates the polyphyletic nature of koala Chlamydia pecorum isolates.» *Systematic and Applied Microbiology*, 1997: 187-200.
- Jackson, M., White N., Giffard P., et Timms P. «Epizootiology of Chlamydia infections in two free range koala populations.» *Veterinary Microbiology*, 1999: 255-264.
- Kemp, E.M. «Tertiary paleogeography and the evolution of Australian climate.» Dans *Ecological Biogeography of Australia*, 33-49. The Hague: A.Keast, 1981.
- Kirsch, J.A. «The species of living marsupials: an annatated list.» Dans *The Biology of Marsupials*. London: MacMillian, 1977.
- Kiviat, N.B., et al. «Histopathology of endocervical infection caused by Chlamydia trachomatis, herpes simplex virus, Trichomonas vaginalis, and Neisseria gonorrhoeae.» *Human Pathology*, 1990: 831-837.
- Krockenberger, A.K., I.D. Hume, et S.J. Cork. «Production of milk and nutrition of the dependent young of free-ranging koalas (Phascolarctos cinereus).» *Physiological Zoology*, 1998: 45-56.
- Kuo, C.C. «Host response.» Dans *Microbiology of Chlamydia*, de LA Barron, 193-208. Boca Raton: CRC Press, 1988.
- Longbottom, D., et M. Livingstone. «Vaccination against chlamydial infections of man and animals.» *The Veterinary Journal*, 2006: 263-275.
- Luo, Z.X., Ji Q., Wible J.R., et Yuan C.X. «An Early Cretaceous tribosphenic mammal and metatherian evolution.» *Science*, 12 December 2003: 1934-1940.

- Mahdi, O.S., M. Klayoglu, et G.I. Byrne. «Emerging strategies in the diagnosis, prevention and treatment of chlamydial infections.» *Expert Opinion Therapy Patients*, 2001: 1253-1265.
- Markey, B., Wan C., Hanger J., Phillips C., et Timms P. «Use of quantitative real-time PCR to monitor the shedding and treatment of chlamydiae in the koala (Phascolarctos cinereus).» *Veterinary Microbiology*, 2007: 334-342.
- Marshall, G.J.A., R.M. Hope, et D.W. Cooper. *Mammals from Pouches and Eggs: Genetics, Breeding and Evolution of Marsupials and Monotremes*. Melbourne: CSIRO, 1990.
- Martin, H.A. «The Tertiary flora.» Dans *Ecological Biogeography of Australia*, 393-426. The Hague: A.Keast, 1981.
 - Martin, R., et A.K. Lee. The Koala, a Natural History. Sydney: Uni of NSW Press, 1988.
- Martin, R.W., et A.K. Lee. «The koala, Phascolarctos cinereus, the largest marsupial folivore.» Dans *Possums and Gliders*, 463-467. Sydney: AP Smith and ID Hume, 1984.
- Masters, P., T. Duka, S. Berris, et G. Moss. «Koalas on Kangaroo Island: from introduction to pest status in less than a century.» *Wildlife research*, 2004: 267-272.
- Matthews, R., et al. Evaluation of a New Rapid Immunoassay (Clearview Chlamydia MF) for the Detection of Chlamydia trachomatis in Female Endocervical Swabs and in Male Urine Samples. Australian Society for Microbiology, 1996.
- Matyszak, M.K., J.L. Young, et J.S.H. Gaston. «Uptake and processing of Chlamydia trachomatis by human dendritic cells.» *European Journal of Immunology*, 2002: 742 751.
- McColl, K.A., et Martin R.W. «Wildlife Disease Association Conference.» Royal Melbourne Zoo, 1984.
- McKenzie, W.C. *The genito-urinary system in monotremes and marsupials*. Melbourne: Jenkin, Buxton, 1919.
- McLean, N., et K.A. Handasyde. « Sexual maturity, factors affecting the breeding season and breeding in consecutive seasons in populations of overabundant Victorian koalas (Phascolarctos cinereus).» *Australian Journal of Zoology*, 2007: 385-392.
- Melzer, A. «Koalas and utilisation of Woodlands at Springsure in Central Queensland : a summary of research undertaken from September 1989 to December 1991.» AKF, Brisbane, 1994.
- Melzer, A., Carrick F., Menkhorst P., Lunney D., et John B.S. «Overview, Critical Assessment, and Conservation Implications of Koala Distribution and Abundance.» *Conservation Biology*, 2000: 619-628.
- Mitchell, C.M. Mathews, S.A., C. Theodoropoulos, et P. Peter Timms. «In vitro characterisation of koala Chlamydia pneumoniae: Morphology, inclusion development and doubling time.» *Veterinary Microbiology*, 2009: 91-99.
- Mitchell, P. Social behaviour and communication of koalas. Sydney: A.K.Lee, K.A.Handasyde, G.D.Sanson, 1990.

- Mohamad, K.Y., et al. «Preliminary phylogenetic identification of virulent Chlamydophila pecorum strains.» *Infection, Genetics and Evolution*, 2008: 764-771.
- Moore, B.D., Wallis I.R., Marsh K.J., et Foley W.J. «The role of nutrition in the conservation of the marsupial folivores of eucalypt forests.» Dans *Conservation of Australia's Forest Fauna. 2nd Ed.*, 549-575. Mosman: D Lunney, 2004.
 - Morange, A. «De la psitaccose, ou infection spéciale déterminée par les perruches.» PhD, Paris, 1895.
- Morrison, R.P., et H.D. Caldwell. «Immunity to murine chlamydial Genital infection.» *Infection and Immunity*, 2002: 2741-2751.
- Moulder, J.W. «The relation of the psitacosis group (chlamydiae) to bacteria and viruses.» *Annual Review of Microbiology*, 1966: 107-130.
- Mozzato-Chamay, N., Mahdi O.S. M., Jallow O., Mabey D. C. W., Bailey R. L., et Conway D. J. «Polymorphisms in Candidate Genes and Risk of Scarring Trachoma in a Chlamydia trachomatis-Endemic Population.» *The Journal of Infectious Diseases*, 2000: 1545-1548.
- Mpiga, P., et M. Ravaorinoro. «Chlamydia trachomatis persistence : an update.» *Microbiological Research*, 2006: 9-19.
- Mulcahy, F.M., et al. «Prevalence of chlamydial infection in acute epididymo-orchitis.» *Genitourinary Medecine*, 1987: 16-18.
- Myers, G. S. A., et al. «Evidence that Human Chlamydia pneumoniae Was Zoonotically Acquired.» *Journal of Bacteriology*, 2009: 7225-7233.
- Obendorf, D. L. «Causes of mortality and morbidity of wild koalas, Phascolarctos cinereus (Goldfuss), in Victoria, Australia.» *Journal of Wildlife Disease*, 1983: 123-131.
- Obendorf, D.L. «Pathology of the female reproductive tract in the koala, Phascolactos cinereus (Goldfuss), from Victoria, Australia.» *Journal of Wildlife Diseases*, 1981: 587-592.
- Obendorf, D.L. «The pathogenesis of urogenital tract disease in the koala.» *Australian Wildlife*, 1988: 649-655.
- Obendorf, D.L., et Handasyde K.A. «Pathology of chlamydial infection in the reproductive tract of the female koala (Phascolarctos cinereus).» Dans *Biology of the koala*, 255-259. Australia: Surrey Betty and Sons, 1990.
- Osawa, R. «Tanin-protein complex-degrading enterobacteria isolated from the alimentary tracts of koalas and a selective medium for their enumeration.» *Applied and Environmental Microbiology*, May 1992: 1754-1759.
- Osawa, R., F.N. Carrick, N. Hashimoto, I. Takashima, et T. Takahasi. «Application of blood sampling paper method for complement fixation test detection of antichlamydial antibody in koalas (Phascolarctos cinereus).» Dans *Biology of the koala*, 277-279. Norton: A.K.Lee, 1990.
- Osawa, R., W.H. Blanchard, et P.G. Callaghan. «Microbiological studies of the intestinal microflora of the koala, Phascolarctos cinereus. II. Pap a special maternal faeces consumed by juvenile koalas.» *Australian Journal of Zoology*, 1993: 611-620.

- Osborne, N.G. «Chloramphenicol.» Journal of Gynecologic Surgery, 1992: 107-108.
- Page, L.A. «Proposal of the recognition of two species in the genus Chlamydia.» *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1968: 51-66.
- Palmer, D.G., D. Forshaw, et S.L. Wylie. «Demonstration of Chlamydia psitacci antigen in smears and parrafin tissue sections using a fluorescein isothiocynate labelled monoclonal antibody.» *Australian Veterinary Journal*, 1988: 98-99.
 - Pratt, A. The Call of the koala. Melbourne: Robertson and Mullens, 1937.
- Prescott, L.M., Harley J. P., Klein D. A., Bacq-Calberg C.M., et Dusart J. *Microbiology, Fifth Edition*. Bruxelles: McGraw-Hill Companies, 2002.
- R.C., Brunham, et Rey Ladino J. «Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine.» *Nature Reviews Immunology*, 2005: 149-161.
 - R.K., Dickens. «The Koala in Health and Disease.» Dans University of Fauna Course, 105-117. 1978.
- Rasmussen, S., et P. Timms. «Detection of Chlamydia psittaci using DNA probes and the polymerase chain reaction.» *FEMS Microbiology letters*, 1991: 169-174.
 - San Diego Zoo, Zoo. «AZA Koala SSP Veterinary Manual.» version1.01. San Diego, 26 march 2006.
- Sanders, 1. C J. «Periurethral gland abscess: aetiology and treatment.» *Sexual Infection Transmission*, 1998: 276-278.
 - Sharp, A. The Koala Book. Gretna: Pelican Publishing Company, 1995.
- Sherwin, W.B., Timms P., Wilcken J., et Houlden B. «Analysis and Conservation Implications of Koala Genetics.» *Conservation Biology*, 1997: 639-649.
- Stephens, R.S., M.R.Tam, C.C. Kuo, et R.C. Nowinski. «Monoclonal antibodies to Chlamydia tracomatis: antibody specifities and antigen characterization.» *Journal of Immunology*, 1982: 11083-1089.
- Storz, J. «Pathogenetic events in intestinal chlamydial infections leading to polyarthritis in calves.» *Journal of Infection disease*, 1971: 41-50.
- T.Hundloe, C.Hamilton. Koalas and Tourism, An Economic evaluation. Discussion Paper, The Australia Institute, 1997.
- Tarlinton, R., J. Meers, J. Hanger, et P. Young. «Real-time reverse transcriptase PCR for the endogenous koala retrovirus reveals an association between plasma viral load and neoplastic disease in koalas.» *Journal of General Virology*, 2005: 783-787.
- Tarlinton, R.E., J. Meers, et P.R. Young. «Retroviral invasion of the koala genome.» *Nature*, 2006: 79-81.
 - Thibault, C., et M.C. Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Quae, 2001.

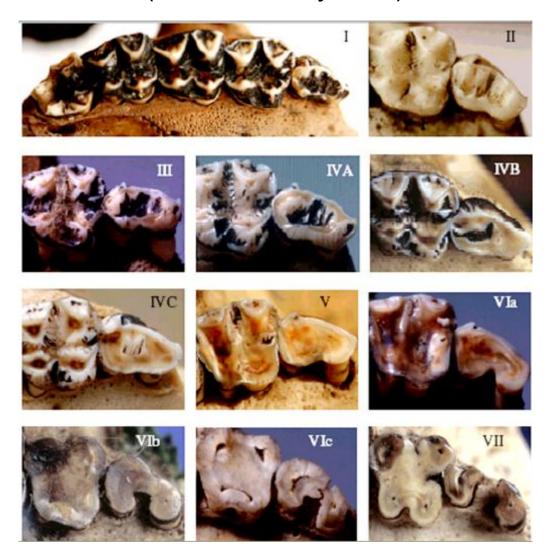
- Timms, P. «Chlamydiosis in birds, wild and domestic animals.» Dans *Australian standard diagnostic techniques for animal diseases*, 1-8. Melbourne: CSIRO, 1993.
 - f . «Chlamydial infection and disease in the koala.» *Microbiology Australia*, June 2005: 65-68.
- Timms, P., et M.M. Wood. «Comparison of nine antigen detection kits for diagnosis of urogenital infections due to Chlamydia psittaci in koalas.» *Journal of Clinical Microbiology*, 1992: 3200-3205.
 - Tyndale-Biscoe, H. Life of Marsupials. Melbourne: CSIRO Publishing, 2005.
- Ueno, H., et al. «Serological assessment of chlamydial infection in the koala by a slide EIA technique.» *Australian Veterinary Journal*, 1990: 393 396.
- Ulrey, D.E., R.T. Robinson, et P.A. Whetter. «Composition of prefered and rejected Eucalyptus browse offered to captive koalas, Phascolarctos cinereus (Marsupialia).» *Australian Journal of Zoology*, 1981: 847-852.
- Vanrompay, D. «Chlamydia psittaci infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis.» *Veterinary Microbiology*, 11 January 1995: 93-119.
- Wardrop, S., Fowler A., O'Callaghan P., Giffard P., et Timms P. «Characterization of the koala biovar of Chlamydia pneumoniae at four gene loci-ompAVD4, ompB, 16S rRNA, groESL spacer region.» *Systematic and Applied Microbiology*, 1999: 22-27.
- f . «Characterization of the koala biovar of Chlamydia pneumoniae at four gene loci--ompAVD4, ompB, 16S rRNA, groESL spacer region.» *Systematic Applied Microbiology*, 1999: 22-27.
- Weigler, B.J., A.A. Girjes, N.A. White, N.D. Kunst, F.N. Carrick, et M.F. Lavin. «Aspects of the epidemiology of Chlamydia psittaci infection in a population of koalas (Phascolarctos cinereus) in southeastern Queensland, Australia.» *Journal of Wildlife Diseases*, 1988: 282-291.
- Weigler, B.J., F.C. Baldock, A.A. Girjes, F.N. Carrick, et M.F. Lavin. «Evaluation of an enzyme immunoassay test for the diagnosis of Chlamydia psitacci infection in free ranging koalas (Phascolarctos cinereus) in south eastern Queensland, Australia.» *Journal of Wildlife Disease*, 1988: 259-263.
- White, N.A., et P. Timms. «Chlamydia psittaci in a koala (Phascolarctos cinereus) population in south-east Queensland.» *Wildlife Res.*, 1994: 41-47.
- Whittington, R. «Chlamydiosis of koalas.» Dans *Infectious diseases of wild mammals*, de Ian K. Barker Elizabeth S. Williams, 423-434. Elizabeth Williams and Ian Barker, 2001.
 - Wikipedia . 21 September 2009. http://fr.wikipedia.org/wiki/Koala (accès le September 30, 2009).
- Wilkinson, R., I. Kotlarski, et M. Barton. «Further characterisation of the immune response of the koala.» *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1994: 325-339.
- f . «Koala lymphoid cells : analysis of antigen-specific responses.» *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1992: 237-247.
 - Williams, E.S. Infectious Diseases in Wild Mammals, third edition. WILLIAMS and BARKER, 2001.

Woodburne, M.O., et J.A. Case. «Dispersal, Vicariance, and the Late Cretaceous to Early.» *Journal of Mammalian Evolution*, 1996: 121-161.

Young, A. H. «Anatomy of the Koala (Phascolarctos cinereus).» *Journal of Anatomy and Physiology*, 1881: 466-474.

Zeichner, S.L. «Isolation and characterization of macrophage phagosomes containing infectious and heat inactivated Chlamydia psitacci: two phagosomes with different intracellular behaviors.» *Infectious Immunology*, 1983: 956-966.

Annexe I : Classes d'usure des dents et évaluation de l'âge (McLean et Handasyde 2007)



Modèles d'usure sur la prémolaire du koala, de l'émail à la dentine, ayant été utilisés pour attribuer une classe d'usure des dents à chaque koala de l'étude

TWC	I	II	III	IVA	IVB	IVC	٧	Vla	VIb	VIc	VII
Years	<1.25	1.25-3.5	3.5-5.5	5.5-6.5	6.5-7.5	7.5-9	9-10	10-14	10-14	10-14	14+
Description	No wear in denture on P4, M4 not fully erupted	Spots / One line of wear (buccal)	Two lines wear (buccal and lingual)	Just formed circle of wear, leaving a large island of enamel	Medium island of enamel	Very small island of enamel	No enamel on structure	Small indentation in shape of tooth	Medium indentation – bean shape	Indentation nearly fully through	Two separate roots showing

Classes d'usure des dents (TWC) du koala afin de déterminer l'âge d'après les modèles d'images ci-dessus

Annexe II : Exemples du dossier d'examination du koala Copper (crédit Wildlife Hospital). 6 pages

<i>j</i> .							
/							
Date	of Examination			Australian W	ildlife Hospital		
1-	19109		I/o		ination She	o.t	
1/	19109		NO	ala Exalli	mation sile	et	
		-			·		
	mal Details		00/				or complete details below)
Anim	nal's Name	COP Male	D For	nale Intersex	Accession No QPWS Form No		777
	dmission	No)
		I NO		res (previous A	ccession No)
	cuer Details				1.600 10	100/	260
	uer Name uer Address	_			Affiliation/Group Telephone (home)	11/1	3KR
E. (1000000000000000000000000000000000000	onal)				Telephone (mobile)	138	
	il Address		1		Transpirence (mobile)		
	ler Details		***************************************				
Calle	er Name				Telephone		
Reas	on for calling						
	cue Details						
	of Rescue	- 1	7/9/0	79	Time of Rescue		AM/PM
Exac	t location of resci		levela	-			
Grid	Reference	6		riu	LG.	Δ	Redlands
	on for Rescue	(ystit	is, conjunct			, (3003 5.)
Posit	tion of koala	F	In tree	On grou			
Ide	ntifying Feat	uroc.	_ other				
Ear 1			No				
3777727.00			MO	Yes - la	g No		Left Right
Micr							Left Right
1000000	rochip		No No		g No		Left Right
1000000							Left Right
Othe	rochip	ures:					Left Right
Othe	ochip er identifying feat	ures:	- No	Yes - No	-		Left Right
Othe	ochip er identifying feat nmary of Dia	ures:	- No	Yes - No	-		Left Right
Other	rochip er identifying feat mmary of Dia Cys†1†1	ures:	- No		-		Left Right
Sun 1. 2.	rochip er identifying feat mmary of Dia Cys†1†1	ures:	- No	Yes - No	-		Left Right
Sun 1. 2. 3. 4.	mmary of Dia Cyshiti Bilatera	ures:	INO Lado (□ Yes - No	S Chlamyo		
Other Sun 1. 2. 3. 4.	mary of Dia Cystiti Bilateia	gnoses:	No (spicion	Yes - No	Chlamya ✓ Eyes	lia	Other Trauma
Sun 1. 2. 3. 4.	mary of Dia Cystiti Bilatel	gnoses:	No (spicion	□ Yes - No	Chlamyo Y Eyes Y Urinary / Ren	lia	Other Trauma Orphan
Sun 1. 2. 3. 4.	rochip er identifying feat mmary of Dia Cystiti Bilatel R Aids Lymphoma Plantar hyperkera	gnoses:	No (spicion	Yes - No	Chlamyo Eyes Virinary / Ren:	lia	Other Trauma
Sum 1. 2. 3. 4.	mary of Dia Cystiti Bilatel	gnoses:	No (spicion	Yes - No	Chlamyo Y Eyes Y Urinary / Ren	lia	Other Trauma Orphan
Other	mmary of Dia Cystifi Bilatera P Aids Lymphoma Plantar hyperkera Leukaemia	gnoses:	No (spicion	Yes - No	Chlamyo Eyes Virinary / Ren:	lia	Other Trauma Orphan
Sun. 1. 2. 3. 4.	mmary of Dia, Cystifi Bilatela P Aids Lymphoma Plantar hyperkera Leukaemia Myelodysplasia	gnoses:	No (spicion	Yes - No	Chlamyo Eyes Virinary / Ren:	ilia al	Other Trauma Orphan
Sun. 1. 2. 3. 4.	Paids Lymphoma Plantar hyperkera Leukaemia Myelodysplasia tial Outcome: Dead on arrival	gnoses:	No (spicion	Yes – No	Chlamya V Eyes V Urinary / Rens Respiratory Reproductive	ilia al	Other Trauma Orphan Healthy tto Hospital
Sun. 1. 2. 3. 4.	Paids Lymphoma Planta hyperkera Leukaemia Myelodysplasia tial Outcome: Dead on arrival Died during exam	gnoses:	No (spicion	Yes – No	Chlamya V Eyes V Urinary / Rens Respiratory Reproductive	ilia al	Other Trauma Orphan Healthy
Sun. 1. 2. 3. 4.	Paids Lymphoma Plantar hyperkera Leukaemia Myelodysplasia tial Outcome: Dead on arrival	gnoses: S KoRV St. ination	spicior (Yes – No	Chlamyo V Eyes V Urinary / Reni Respiratory Reproductive	ilia al	Other Trauma Orphan Healthy tto Hospital
Other Sun 1. 2. 3. 4.	mmary of Dia Cystin By Iolescope Palatar hyperkera Leukaemia Myelodysplasia tial Outcome: Dead on arrival Died during exam ial Outcome: Euthanased on I	gnoses: Korv St. ination	spicion (Yes – No	Chlamyo Eyes Virinary / Ren. Respiratory Reproductive	lia al Admi	Other Trauma Orphan Healthy tto Hospital to Carer on / / 20 seed on / / 20 ferred to
Other Sun 1. 2. 3. 4.	Paids Lymphoma Plantar hyperkera Leukaemia Myelodysplasia tial Outcome: Died during exam all Outcome: Euthanased on [gnoses: Stad Kes KoRV Suntosis ination	spicion (Yes – No	Chlamyo V Eyes V Urinary / Reni Respiratory Reproductive	ilia al Admi	Other Trauma Orphan Healthy to Hospital to Carer on / / 20
Other Sun 1. 2. 3. 4.	mmary of Dia Cystin By Iolescope Palatar hyperkera Leukaemia Myelodysplasia tial Outcome: Dead on arrival Died during exam ial Outcome: Euthanased on I	gnoses: Stad Kes KoRV Suntosis ination	spicion (Yes – No	Chlamyo Eyes Virinary / Ren. Respiratory Reproductive	lia al Admi	Other Trauma Orphan Healthy tto Hospital to Carer on / / 20 seed on / / 20 ferred to
Other Sun 1. 2. 3. 4.	mmary of Dia Cystin By Aids Lymphoma Plantar hyperkera Leukaemia Myelodysplasia tial Outcome: Dead on arrival Died during exam ial Outcome: Euthanased on I	gnoses: S KoRV Statosis ination 7 / 9 /	spicion (Yes – No	Chlamyo Eyes Virinary / Ren. Respiratory Reproductive	lia Admi Sent Relea	Other Trauma Orphan Healthy tto Hospital to Carer on / / 20 seed on / / 20 ferred to
Sun. 1. 2. 3. 4.	Paids Lymphoma Planta hyperkera Leukaemia Myelodysplasia tial Outcome: Buthanased on I' Died on / Jease Details: Jease Date:	gnoses: Start Kerv Startosis ination 7 / 9 /	spicion (Yes – No	Chlamya V Eyes V Urinary / Rensiratory Respiratory Reproductive Reproductive re @	lia Admi Sent Relea	Other Trauma Orphan Healthy tto Hospital to Carer on / / 20 seed on / / 20 ferred to

Demeanour	☐ B.A.R.
Behaviour	Normal Wabnormal quiet hunshed
Posture	□ Normal Abnormal
Sait	Normal Abnormal Not see water
Symmetry	Abnormal Abnormal
Breathing	Normal Shallow Rapid Laboured
Coat	Normal Malked distrail
Discharges	Nil Present mucoid discharge from eyes
Wounds/Bleeding	☑ Nil ☐ Present
Other lesions:	☑Nil Present
Abdomen:	✓ Normal Bloated Sunken
Anaesthesia	Induction Anaesthetic Agent
Associa	L Route: LVI I I I I I I I I I I I I I I I I I I
Anaesthesia	Induction Anaesthetic Agent
Anaesthesia	Route: J.i.m. I.i.v. Tracemask Tube Iube Iube
Anaesthesia Vital Signs	Route: Vi.m. I.V. Tracemask Tube Tube Tracemask Tube Tu
	Maintenance Anaesthetic Agent. / So / O 2 Dose Route: i.m. i.v. facemask U ube Mucous Membrane: Pink Pale Cyanotic Red Rectal Temp 33 2 c CRT Se S SpO2 10.0.7 Red Rectal Temp Frequent/constant arrhythmia
Vital Signs	Route: M.m. I.V. Fracemask Tube Dose Route: I.m. I.V. Facemask Dose Dose Route: I.m. I.V. Facemask Dose Route: I.m. I.V. Facemask Dose Route: I.m. I.V. Facemask Dose Route: Route: Red Rectal Temp 3.3 2 ° c Rectal Temp 3.3 2 ° c Route: Rout
Vital Signs Hydration Weight / Age /	Route: J.i.m. I.i.v. Tracemask Tube Tracemask Tracemask Tube Tube Tracemask Tube Tracemask Tube Tracemask Tube Tube Tracemask Tube Tube Tracemask Tube Tube Tube Tube Tracemask Tube Tu
Vital Signs Hydration Weight / Age / Body Score Tooth Wear: Chest	Route: J.m. J.V. Fracemask Jube Route: J.m. J.V. Jose Dose Route: J.m. Jose Jose Jose Rectal Temp Jose Jose Jose Jose Jose Rectal Temp Jose
Vital Signs Hydration Weight / Age / Body Score Tooth Wear:	Route: J.I.M. I.V. Tracemask Tube Dose Route: I.I.M. I.V. Facemask Jube Dose Route: I.I.M. I.V. Facemask Jube Dose Route: I.I.M. I.V. Facemask Jube Dose Route: I.I.M. I.I.M. Pale Cyanotic Red Rectal Temp 33 2 °C CRT Se C SpO2 I.O.O. Rectal Temp 33 2 °C CRT Regular Occasional arrhythmia Frequent/constant arrhythmia Amplitude: Normal Increased Decreased Tone: Normal Increased Decreased Decreased Decreased Decreased Section Sec

General Physical Examination (continued):

, is	Normal Abnormal MUSC	to aljophs
Musculoskeletal		
	Head Symmetry Normal Abnormal	
	Nares Normal Abnormal	
	Tongue Normal Abnormal	-
Head / Mouth	Teeth Normal Abnormal	
riead / Modelii	Gingiva Normal Abnormal	
	Fauces Normal Abnormal	
	Palate/tonsils Normal Abnormal	
	Pharynx Normal Abnormal	
	=/	
Eyes:	LEFT Abnormal	/PICUT
		RIGHT
Periorbital skin:	Normal Alopecic Pigmented	Normal Alopecic Pigmented
Eyelids:	Normal Other Udena	Normal Other
Palpebral fissure	Normal Scarred mid) _ 1	□ Normal □ Scarred www.j □ ↑
Conjunctiva:	Normal Proliferated (1) 2 3	Normal Proliferated (1) 2 3
	Other	Other
Nictitating:	□ Normal □ Prolapsed 1 2	Normal Prolapsed (1) 2
Sclera:	Normal Wother MARCHUM	Normal Other March
Cornea:	☑ Nørmal ☐ Abnormal	Normal Abnormal
Opacity:	☐ Cléar ☐ Mild ☐ Marked	☐ Clear ☐ Mild ☐ Marked
Iris & Pupil:	Normal Abnormal	Normal Abnormal
Discharge:	□ Nil □ Serous ☑ Purulent Amt: 1(2)3	
Description:	La L	Nil Serous Purulent Amt 1 2 3
Description.		
Cabirona Tana		· ·
Schirmer Tear Test (60 secs):		
,	Lengthmm	Lengthmm
Fluorescein Test:		
	Colour: Light Grey Brow	
Coat:	Structure: Normal Span Texture: Normal Grea	arantiped) integrical
	Other: Regions of alopecia on cum	no marked ditytail
	Normal Abnormal tick bites +e	gorged ticks
Skin:		
		rged L R Small L R
	Thornton Line	
		rged LR Small LR
Lymph Nodes		rged L R Small L R
3		ged L R Small L R
		ged L R Small L R
10	Notes	
	<u></u>	
		The second secon

Page 5

General Physical Examination (continued): Abdominal Fill Normal Abnormal Stomach Fill 1 – (empty) 2 (½ full) 3 (full) Normal (firm) Soft Bloated V unable to palpate Stomach Consistency Abdominal Empty/ pellets not palpated
nal Abnormal 179 + 10 ug Distal colon Pellets Palpation Proximal colon/caecum Normal Notes /Other abdominal lesions: Normal Clavicle: Abnormal ... Chest Palpation: Ribs: Normal Abnormal .. Left Forearm Normal Abnormal Left Paw/digits: Normal Abnormal ... Left Hindleg Normal Abnormal Left Foot/digits: Normal Abnormal Limbs and Joints Right Forearm Normal Abnormal Right Paw/Digits Normal Abnormal Right Hindleg Normal Abnormal Right Foot/digits: Normal Abnormal Normal Abnormal Scrotum / Pouch V Active Cmildly Inactive Abnormal Scent Gland/ Mammary Glands Cloaca/Clitoris/ Penis (circle score) (2) (marked) Rump stained: 0 (no staining) 1 (mild) Rump wetness: 0 (dry) 1 (damp) (2)(dripping wet) Cloaca: 0 (normal) 1 (red/inflamed - slightly protruding) (2)(marked protrusion – no ulceration) Dirty Tail Score 3 (2 + ulceration/pseudomembrane) Rump: 0 (normal) * (1)(inflamed skin – no decubital ulcers) 2 (decubital ulcers or erosions from urine scalding) Dysuria: (nil/not observed) 1 (apparent discomfort when urinating and/or vocalization) / 10 Total Score: Other Koala Details, History or Previous Treatments:

age 4

CLINICAL PATHOLOGY
Stain: Giemsa Diff-Quick Other Slide Kept? IN Smear: NUCL - new ophiles, mld () shift. Myserregnewich new of the Nuclear Nucle
Smear: JME Matro, explused hyperthana
Maddominal Aspirate Stain: Giemsa Diff-Quick Other Slide Kept? N N Smear: 100 VDC of Working NAP
Faecal Analysis Gross Examination: Shape Normal Abnormal
Tests:
Urinalysis Collection Method: Cysto Catheter Free catch Urinalysis Uriner Sediment Smear UsG 1042 Smear: 4+ vhi 4 rule duma ells , lymlus , mgg
Wrinalysis Collection Method: Cysto Catheter Free catch Wrinalysis Urine Sediment Smear UsG 1042 Smear: 4+ vhc 4x rules bluma cells browles md
Urinalysis Collection Method: Cysto Catheter Free catch Urinalysis Urine Sediment Smear UsG 1.0.4.2 Smear: 4 + Mc 4 r Muls bluma wills kym Ms , m/s Urinalysis: pH: 5 Pr: 3 + Hb/Mb: 4 + Gluc: Other: Chlamydia (Clearview) Test Test site Cyc Cyc Fair politives an a scale of 1 - 4 using the cliffowing pair is reported. Test site Cyc

ULTRASOU	טאוי					11	
		Normal	(VAb	normal thicker	ved	wall	
		Urine/Lume				Lumen	al cast other
		Wall Thickn	ess at point of	of widest lumen (transv	erse se	ction)	
				LEFT		LUMEN	RIGHT
		Horizonta		7.8	1	7.4	8.3
Bladder		Vertical		5.7		11.8	5.6
		Left Diago	nal	7.7	1	4.8	4.6
7		Right Diag	onal	4.4	-	9.3	4.6
		Other rema	irks:				
Female Reprod	uctive	☐ Normal			/mucos	al hyperplasia	
Tract NIA	DICUT						
.= 111	RIGHT						
Female Reprod	uctive	Normal				al hyperplasia	
Tract N/A	155	☐ Abnorm	ıal				
10(17	LEFT	10/-					
		Examine	ed	Not examined	losto [Poor image	1,000 - 1
Prostate		Normal		Abnormal	COPCC	lune,	lumenal cast
				32.5			
	*	Frontal plan	ne diameter .	32.5	mm (a	nt widest diameter	
				Left			Right
	Overall S	tructure:	Normal	1		Normal	
es Ko	1 11 7		A SECTION AND A SECTION	al		Abnormal	
	Measure	ments:	Length			Length	
				eterm	m	Vert. Diameter	
			Horiz. Diam	eterm	m		mm
Kidneys	Parenchy	/ma echo:	Normal			□ Normal (y) ✓ Hyperechoic	
	Danalas	l. day		thoic Hypoechoic	. ^		Hypoechoic
	Renal pe Ureter:	IVIS:	Normal Normal	Dilated (M	(d)_	Normal	Dilated
	Lesions:		Nil	Dilated		Normal	Dilated
	Lesions		=			Present	12
				9			
Notes/Trea	tment/C	-				2 0	
Peo	n BC	. Sever	e clisa	in cerath.	n	metylocal	epicandial
1	olite	Dage	4. Sn	V / -	11	"Pro 1 - h - 1	102
DA A	1	1000	1.0	ince perion a	1 km	ver pal	Kot.
Mult	Jaca	o mila	Scare	my redlina	01	caecin/	prox color
)		61	//	1	//	
Proes	tate	lune	· delat	ed m. bla	ch	necrotic	lumenal
Ca	est.		0				
Com to 1	1. hal	2. 41	ela				
Beth	t. 1	vromi	K.C.				
OHL	020	in X	hum	es your	111	normal	
VIVA	011	low?	- 0 7 00	1000		nomar	
	U			V			

Annexe III : Grille d'évaluation du score général

		Score	/10	/10	/10	/10	/10	/20	/20	/10	/100
			/2 /4 /4	10-BS	Dehydration 0 -> 5 -> 10 1 2 3	Inguinal N/Enlarged L R/Both 0 1 2.5	None 0 1-2 2 2-4 5 4-6 8 7 10	vere oedema 2 1 2 3 psed 1 aemia 1 ow 2 severe 3		Leucocytes Normal 0 / Abnormal 1 ocytes 0 1 2	
weight age		ent	2 2 3 4 Hunched 4	8 9 10	35.5 - Rectal Temperature = D 0 <d<1 1="" 1<d<2="" 2="" 2<d<3="" 3<="" th=""><th>Mandibular N/Enlarged L R/Both 0 1 2.5</th><th><u>Tachypnea</u></th><th>Fight Eyelids Normal 0 / low oedema 1 / severe oedema 2 Conjunctiva Normal 0 / Proliferated 1 2 3 Nictating Normal 0 / Prolapsed 1 Sclera Normal 0 / Hyperaemia 1 Discharge Nil 0 / Serous 1 / Purulent: low 2 severe 3</th><th>on sheet</th><th>s Normal 0 / Abnorma/1 Erythro</th><th></th></d<1>	Mandibular N/Enlarged L R/Both 0 1 2.5	<u>Tachypnea</u>	Fight Eyelids Normal 0 / low oedema 1 / severe oedema 2 Conjunctiva Normal 0 / Proliferated 1 2 3 Nictating Normal 0 / Prolapsed 1 Sclera Normal 0 / Hyperaemia 1 Discharge Nil 0 / Serous 1 / Purulent: low 2 severe 3	on sheet	s Normal 0 / Abnorma/1 Erythro	
origin	General Scoring	Grid assessment	BAR 0 / Depressed 1 / Moribund 2 Not Alert / Quiet / Anorexic / Painful => 0 1 2 3 4 Climbing 0 / Walking 1 / Sit 2 / Lain down 3 / Hunched 4	4 5 6 7	CRT 0s->1s->2s 0 1 2	Rostral Mandibular N/Enlarged L R/Both 0 1 2.5	igh Whistle (auscultation) Tracheitis	e oedema 2 2 3 d 1 nia 1 2 severe 3	See koala examination sheet	in <i>Normal</i> 0 / <i>Abnormal</i> 1 bacteria	TOTAL
Name			B Not Alert Climbing	1 2 3	Mucous Membrane Pink / Red / Cyanotic 0 1 2	Facial N/Enlarged L R/Both 0 1 2.5	<u>Oxspinea</u> Co. Rattling (auscultation)	Eyelids Normal 0 low oedema 1 / severa Conjunctiva Normal 0 Proliferated 1 Nictating Normal 0 Prolapse Sclera Normal 0 Hyperaem Discharge Nil 0 Serous 1 Purulent: low		pH Normal 0/ Abnorma/1 Haemoglob	
		Features	Demeanour Behaviour Gait	Body Score	Vital signs	Lymph nodes	Respiratory Symptoms	Ocular Examination	Dirty Tail Score	Urinalysis Smear	

Annexes IV : Grille d'évaluation du score « vessie »

		Score	/20		/10			/10			Š	/50			/20			/20		/100
age			>200 20	/4	/3	/3	/3	/3	/4	/2	9/	9/	9/	9/	9/	8/	/10	9/	/4	
		ent	% 0-20 20-40 40-60 60-80 80-100 100-120 120-140 140-160 160-180 180-200 >200 c 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20	ere / Necrotic 3 4	irosis 3	d	(clot)	re	unicrobial 4		Rolkgojd, hyperplasia 6	severe 6	severe 6	severe 6	severe 6	metaelasia. 8	Dense +/- confluent sheets +/- submuspsal/ymphoid aggregates 7 8 10	Extending into deep mucosa	Predominant plasma cells	
weight	scoring	Grid Assessment	60-80 80-100 100-120 120-1 6 8 10 12	Normal / Congestion : mild moderate severe / Necrotic 0 1 2 3 4	None / Focal / Diffused / Late fibrosis 0 1 2 3	None / Focal / Diffused / Deep 0 1 2 3	None / few / moderate / severe (dot) 0 1 2 3	None/few/moderate/severe	None / few / moderate / severe / golyggiscobiol 0 1 2 3	Absent Present 0 2	mild moderate <u>Polypojd, I</u>	mild moderate	mild moderate	mild moderate	mild moderate	mild moderate severe 2 4 6	Moderate +/- foci of heavy infiltration +/- lymphoid aggregates 4 5 6	Scattered cells in deeper tissues +/- aggregates 4 5	Lymphocytes, plasma cells and aguttaghils +/- Scattered macrophages 3	
origin	Bladder Scoring		% 0-20 20-40 40-60 Sc 0 2 4	Normal / Co	Nor		Non	`	None/f		Absent n	Absent 0	Absent 0	Absent 0	Absent 0	Absent n	Scattered +/- foci of moderate infiltration +/- small lymphoid aggregates 0 1 2 3	Epithelium +/- lamina RIGRAIA +/- superficial SUBMUSOSA 0 1 2 3	Majority of asyttaphils with lymphocytes +/- occasional macrophages	TOTAL
9		Features	Wall Thickness (percentage of difference with Negative Control)	Colour	Fibrosis	Ulceration	Hemmoragiae.	Macroscopic pus	Smear (bacteria)	Epithelial thickening	Epithelial distortion	Focal loss of epithelial cells	Epithelial metaplasia.	Vessel congestion	Oedema	Smooth muscular hypertrophy	Character	Distribution	Cell type	
Name		Fed	(percentage of di)		Wall Aspect			Urine aspect			1000	mniemor			w a	structure		Leucocytes, Inflammatory infiltrate		
					ÁS	lecrop	N								٧a	olotsi	Н			

Annexes V : Grille d'évaluation du score « urètre »

Nai	Name	origin	weight		age	
		Penile/Prostate Urethra Scoring	rethra Scoring			
Fe	Features		Grid Assessment	ent		Score
	Colour	Normal / Con	Normal / Congestion : mild moderate severe / Necrotic 0 1 2 3 4	ere / Necrotic 3 4	/4	
External aspect	Fibrosis	None 0	None / Focal / Diffused / Late fibrosis 0 1 2 3	rosis 3	/3	/10
	Muscular / prostatic tissue tissue	Nomal / 0	Normal / Inflamed : mild / moderate / severe $0 ext{ 1 } 2$	/ severe 3	/3	
	Hemomogiae	oN .	None/mild/moderate/severe	يو.	/ع	ĭ
memai aspect	Purulent Discharge	on .	None/mild/moderate/severe 0 1 2 3	رو.	1/3	0
	Epithelial thickening		Absent Present 0		1/2	
4	Epithelial distortion	Absent mild 0 2	moderate 4	Rolxpoid, hyperplasia 6	9/	00
Epmellum	Focal loss of epithelial cells	Absent 0	mild moderate	severe 6	9/	07/
	Epithelial metaplasia.	Absent 0	mild moderate 2 4	severe 6	9/	
	Oedema	Absent 0	mild moderate 2 4	severe 6	9/	
Lamina propria	Vessel congestion	Absent 0	mild moderate 2 4	severe 6	9/	/18
	Smooth muscular hypertrophy	Absent 0	mild moderate	severe 6	9/	
Penile/prostate tissue	Inflammation	Absent 0	mild moderate	severe 6	9/	9/
	Character	Scattered +/- foci of moderate infiltration +/- small lymphoid aggregates 0 1 2 3	Moderate +/- foci of heavy infiltration +/- lymphoid aggregates 4 5 6	Dense +/- confluent sheets +/- submucosal lymphoid aggregates 7 8 10	/10	
Leucocytes, Inflammatory infiltrate	Distribution	Epithelium +/- lamina propria +/- superficial submucosa 0 1 2 3	Scattered cells in deeper tissues +/- aggregates 4 5	Extending into deep mucosa	9/	/20
	Cell type	Majority of neutrophils and lymphocytes +/- occasional macrophages 0 1 2	Lymphocytes, plasma cells and neutrophils +/- Scattered macrophages 3	Predominant plasma cells	/4	
		TOTAL				/80
						/100

Annexes VI : Grille d'évaluation du score « uretère »

Name		origin weight	age	3e	
		Ureter Scoring			
Features		Grid Assessment	ent		Score
Colour		Normal / Congestion : mild moderate severe / Necrotic 0 1 2 3 4	re / Necrotic 4	/4	
External Fibrosis aspect		None / Focal / Diffused / Late fibrosis 0 2 4 6	sįso	9/	/13
Size		Normal / increasing : mild / moderate /severe 0 2 4 6	/severe 6	/3	
Hemomajae		None / $mild$ / $moderate$ / $severe$ 0 1 2 3	ນ	/3	7/
memai uspect Purulent Discharge		None / mild / moderate / severe 0 1 2 3		/3	/0
Epithelial thickening		Absent Present 0 2		/2	
Epithelial distortion		Absent mild moderate <u>Polygoid</u> h 0 2 4 6	Polypoid, hyperplasia 6	9/	,
Focal loss of epithelial cells		Absent mild moderate s 0 2 4	severe 6	9/	/2/
Epithelial metaplasia		Absent mild moderate s 0 2 4	severe 6	9/	
Dedema		Absent mild moderate s 0 2 4	severe 6	9/	27
propria Vessel congestion		Absent mild moderate s 0 2 4	severe 6	9/	/12
Smooth Hypertrophy muscle layers		Absent mild moderate s 0 2 4	severe 6	9/	9/
Character sma	s mo ma	Scattered +/- foci of Moderate +/- foci of moderate infiltration +/- small lymphoid aggregates lymphoid aggregates 0 1 2 3 4 5 6	Dense +/- confluent sheets +/- submucosal lymphoid aggregates 7 8 10	/10	
Leucocytes, Distribution Finfiltrate	l l	Epithelium +/- lamina Scattered cells in deeper propria +/- superficial tissues +/- aggregates submucosa 4 5	Extending into deep mucosa 6	9/	/20
Maje Iymp	faji /m;	Majority of neutrophils with Lymphocytes, plasma lymphocytes +/- occasional cells and neutrophils +/- macrophages Scattered macrophages 0 1 2	Predominant plasma cells	/4	
		TOTAL			/100

Annexes VII : grille d'évaluation du score « rein »

	Nam	e	origin	weight		age	
			Kidney S	Scoring			
	Fe	atures		Grid Assessme	ent		Score
. <u>u</u> ; a	Functional	BUN		Ref [4 – 12]		/1	
Paraclinic (if available)	runcuonai	Creatinine		Ref [1.00 – 1.40]		/1	/4
Para	Structural	Ultrasound Exam	0	on of size and structure : mil 1	2 3	/3	·
		Colour	0		3 4	/4	
		Fibrosis	0	ne / Focal / Diffused / Late fib 1 2 3		/3	
	External aspect	Consula	No adheren 0	ce / focal adherence / diffus 1	se adherence 3	/3	/16
) bey		Capsule	0	ocal none smooth / diffuse r 1	3	/3	
Necropsy		Size	Normal / 0	increasing : mild / moderat 1 2	te / severe 3	/3	
		Cortex / medulla ratio	Normal / mo	derate modification / severe 2	modification 4	/4	
	Internal aspect	Lesions	***	farctus / hematomas / Necro	osis / other + 2	/8	/20
		Pyelic discharge	Non 0	e / scattered / moderate / d	lense 8	/8	
		Arteriole walls hypertrophy		None / focal / diffused Mild / moderate / severe		/5	
		Glomerules atrophy		None / focal / diffused / Mild / moderate / severe		/5	
	Structural modification	Interstitial fibrosis	None / focal	/ diffused / spread to cortex Mild / moderate / severe	and medulla	/6	/24
		Loss of tubular structure		diffused / spread to cortex Mild / moderate / severe Association with oedema		/8	
Histology		Character	Scattered +/- foci of moderate infiltration +/- small lymphoid aggregates 0 1 2 3	Moderate +/- foci of heavy infiltration +/-lymphoid aggregates 4 5 6	Dense +/- confluent sheets +/- submucosal lymphoid aggregates 7 8 10	/10	
	Leucocytes,	Repartition	0-30% 2	30-60% 4	60-100% 6	/6	
	Inflammatory infiltrate	Distribution	Focal in medulla interstitium 2	diffuse in medulla and cortex interstitium 4	tubule duct obliteration 6	/6	/26
		Cell type	Majority of neutrophils with lymphocytes +/- occasional macrophages 0 1 2	Lymphocytes, plasma cells and neutrophils +/- Scattered macrophages 3	Predominant plasma cells 4	/4	
			TOTAL				/90 /100

Annexes VIII : Grille d'évaluation du score « prostate »

	Nam	e		origin	weight		age	
				Prostate S	Scoring			
	Fe	atures			Grid Assessmen	t		Score
Paraclinical	Ultrasound Exam		ication and size)		one / mild / moderate / severe	2	/6	/6
		Si.	ze	Normal /	increasing : mild / moderate 2 4	/severe 6	/6	
>	External aspect	Col	lour	Normal / Con	gestion : mild moderate sever 1 2 3	•	/4	/16
Necropsy		Fibr	rosis	None 0	/ Focal / Diffused / Late fibro	osis	/6	
ž		Нето	rragiae.	No	ne / mild / moderate / severe 0 1 2 3	:	/3	15
	Internal aspect	Purulent	Discharge		ne / mild / moderate / severe 0 1 2 3	:	/3	/6
		Epithelial	thickening		ne / mild / moderate / severe 0 1 2 3	:	/3	
		Epithei	lial loss		ne / mild / moderate / severe 0 1 2 3	:	/3	
	Tubulo-	Duct di	stortion	None 0	0-30% 30-60% 60-10 2 4 6	10%	/6	
	glandular mucosa		Oedema		ne/mild/moderate/severe 0 1 2 3	2	/3	
		Lamina	Vessel congestion		ne/mild/moderate/severe 0 1 2 3	?	/3	/27
		propria	Smooth muscle hypertrophy		one / mild / moderate / severe 0 1 2 3	•	/3	
Histology	C-1	Oed	lema		ne/mild/moderate/severe 0 1 2 3	2	/3	
÷	Submucosa	vessel co	ongestion		ne/mild/moderate/severe 0 1 2 3	:	/3	
		Char	acter	Scattered +/- foci of moderate infiltration +/- small lymphoid aggregates 0 1 2 3	Moderate +/- foci of heavy infiltration +/-lymphoid aggregates 4 5 6	Dense +/- confluent sheets +/- submucosal lymphoid aggregates 7 8 10	/10	
	Leucocytes,	Distrii	bution	Lumen and epithelium 2	Interstitivm 4	Extending into deep tissue 6	/6	las
	Inflammatory infiltrate	Repai	rtition	0-30% 2	30-60% 4	60-100% 6	/6	/26
		Cell	type	Majority of neutrophils with lymphocytes +/- occasional macrophages 0 1 2	Lymphocytes, plasma cells and neutrophils +/- Scattered macrophages 3	Predominant plasma cells	/4	
				TOTAL				/81
				TOTAL				/100

Annexes IX : Grille d'évaluation du score « canal déférent »

	Name	ше	origin	weight		age	
			Vas Deferens Scoring	s Scoring			
	Fe	Features		Grid Assessment	ent		Score
		Size	Normal /	Normal / increasing : mild / moderate /severe 0	: /severe 6	9/	
٨s	External aspect	Colour	Normal / Con	Normal / Congestion : mild moderate severe / Necrotic $0 1 2 3 4$	rere / Necrotic 3 4	/4	/16
ecrops		Fibrosis	None 0	None / Focal / Diffused / Late fibrosis 0 2 4 6	rosis	9/	
N		Hemamajae	No.	None/mild/moderate/severe	re	٤/	10
	internal aspect	Purulent Discharge	No	None/mild/moderate/severe 0 1 2 3	re	8/	9/
		Epithelial thickening		Absent Present 0		1/2	
	Epithelium	Epithelial distortion (cuboidal epithelium stereoollied)	Absent 0	mild moderate 2 4	severe 6	9/	/20
		Focal loss of epithelial cells	Absent 0	mild moderate 2 4	severe 6	9/	
		Epithelial metaplasia	Absent 0	mild moderate	severe 6	9/	
	Lamina	Oedema		Absent Present 0		1/2	Ş
٧8	propria	Vessel congestion	Absent 0	mild moderate 2 4	severe 6	9/	8/
olotsiH	Smooth Muscular Layers	Нуресторћу	noN 0	None / intemal / central / external 0 2 4 6	nal	9/	9/
		Character	Scattered +/- foci of moderate infiltration +/- small lymphoid aggregates 0 1 2 3	Moderate +/- foci of heavy infiltration +/- lymphoid aggregates 4 5 6	Dense +/- confluent sheets +/- submucosal lymphoid aggregates 7 8 10	/10	
	Leucocytes, Inflammatory infiltrate	Distribution	Epithelium +/- lamina propria +/- superficial submucosa 0 1 2 3	Scattered cells in deeper tissues +/- aggregates 4 5	Extending into deep mucosa 6	9/	/20
		Cell type	Majority of neutrophils with lymphocytes +/- occasional macrophages 0 1 2	Lymphocytes, plasma cells and neutrophils +/- Scattered macrophages 3	Predominant plasma cells	/4	
			TOTAL				176
							/100

Annexe X : Grille d'évaluation du score « épididyme »

	Name	le .	origin	weight		age	
			Epididymis Scoring	Scoring			
	Fe	Features		Grid Assessment	ent		Score
Λs		Colour	Normal / Cong	Normal / Congestion : mild moderate severe / Necrotic 0 1 2 3 4	ere / Necrotic 4	/4	
douse	External aspect	Fibrosis	None	None/Focal/Diffused/Late fibrosis 0 2 4 6	rosis	9/	/16
P N		Size	Normal /	Normal / increasing : mild / moderate /severe 0 4 6	?/severe 6	9/	
		Epithelial thickening		Absent Present 0 2		/2	
	Epithelium	Epithelial distortion (pseudo stratified, vesicles, stereocils)	Abse 0	nt mild moderate	severe 6	9/	/20
		Focal loss of epithelial cells	Absent 0	mild moderate	severe 6	9/	
		Epithelial metaplasia	Absent 0	mild moderate 2 4	severe 6	9/	
	Smooth Muscle	Thickening	NoN 0	None/internal/central/external 0 2 4 6	nal	9/	9/
νgο	Interstitial	Oedema	Non	Normal/mild/moderate/severe 0 2 4 6	ere	9/	72
lotsiH	tissue	Vessel congestion	Non	Normal/mild/moderate/severe 0 2 4 6	ere	9/	/17
ı		Character	Scattered +/- foci of moderate infiltration +/- small lymphoid aggregates 0 1 2 3	Moderate +/-foci of heavy infiltration +/- lymphoid aggregates 4 5 6	Dense +/- confluent sheets +/- submucosal lymphoid aggregates 7 8 10	/10	
	Leucocytes, Inflammatory infiltrate	Distribution	Epithelium +/- smooth muscle +/- interstitium 0 1 2 3	Scattered cells in deeper tissues +/- aggregates 4 5	Extending into loose connective tissue	9/	/20
		Cell type	Majority of neutrophils with lymphocytes +/- occasional macrophages 0 1 2	Lymphocytes, plasma cells and neutrophils +/- Scattered macrophages	Predominant plasma cells	/4	
			TOTAL				/74

Annexe XI: Grille d'évaluation du score « testicule »

Name	me	origin	weight		age	
		Testis Scoring	oring			
Fe	Features		Grid Assessment			Score
	Size	Nomal /	Normal / increasing : mild / moderate /severe 0	evere 6	9/	
External aspect	Colour	Normal / Con	Normal / Congestion : mild moderate severe / Necrotic 0 1 2 3 4	/ Necrotic	/4	/16
	Fibrosis	None	None / Focal / Diffused / Late fibrosis 0 2 4 6	is	9/	
	Hemorragiae	NO	None / mild / moderate / severe 0 1 2 3		/3	2
Internal aspect	Purulent Discharge	No	None / mild / moderate / severe 0 1 2 3		/3	9/
	Epithelial thickening		Absent Present 0 2		/2	
Seminiferaus	Epithelial loss (stratified, <u>spermatocutes,</u> <u>Sertoli</u> cells)	No.	None / mild / moderate / severe 0 1 2 3		/3	
0	Tubules distortion	None	None 0-30% 30-60% 60-100% 0 2 4 6	%	9/	/23
	Spermatogenesis	Fi	Functional / non functional 0 6		9/	
	Metaplosia	O O	None / mild / moderate / severe 0 1 2 3		/3	
Interstitum	Vessel congestion	Non 0	None / mild / moderate / severe 0 1 2 3		/3	
	Character	Scattered +/- foci of moderate infiltration +/- small lymphoid aggregates 0 1 2 3	Moderate +/- foci of heavy infiltration +/-lymphoid aggregates 4 5 6	Dense +/- confluent sheets +/- submucosal lymphoid aggregates 7 8 10	/10	
Leucocytes, Inflammatory	Distribution	Epithelium 2	laterstitium 4	Extending into deep tissues 6	9/	/26
infiltrate	Repartition in the testis	0-30%	30-60% 4	60-100% 6	9/	
	Cell type	Majority of neutrophils with lymphocytes +/- occasional macrophages 0 1 2	Lymphocytes, plasma cells and neutrophils +/- Scattered macrophages 3	Predominant plasma cells	/4	
		TOTAL				/71
						not /

Annexe XII: Technique d'identification des souches

Une PCR conventionnelle est appliquée aux prélèvements positifs pour *C. pecorum* lors de la PCR quantitative. Le gène amplifié est le gène ompA codant le domaine IV de la MOMP. Les amorces utilisées sont CpeNTVD3 (5'- GTT CTT TCT AAC GTA GC - 3') et CpeNTVD4 (5' Ŕ TGA AGA GAA ACA ATT TG - 3'), respectivement sens et anti-sens, permettant l'amplification d'une séquence de 380 paires de bases.

Le mélange réactionnel est composé de :

- 5 μl de solution tampon (x10 buffer)
- 5 μl de MgCl₂
- 5 μl de solution de nucléotides dNTP
- 1.5 µl d'amorces sens et anti sens
- 26 µl de ddH₂O
- 0.8 μl de FastStart Taq polymérase
- 5 μl d'extraits d'ADN (prélèvements et témoin positif) et 5 μl ddH₂O pour les 3 témoins négatifs

Après une phase d'initiation à 94°C pendant 3 min, 45 cycles sont appliqués (30 s à 94°C, 30 s à 40°C et 90 s à 72°C) avant une phase finale d'élongation à 72°C pendant 10 minutes.

Le produit de PCR est ensuite purifié au moyen du kit PureLinkND, basé sur le principe de colonne en plaque infiltrante à centrifuger : le principe est basé sur la fixation sélective des acides nucléiques à la colonne de silice en présence de fortes concentrations salines ; les impuretés (enzymes amorces, dNTP) sont éliminées par lavage et centrifugation.

Le séquençage est réalisé par la méthode de Sanger sur les produits de PCR purifiés.

Les souches de *C. pecorum* sont identifiées par comparaison (calcul du taux d'homologie) entre la séquence amplifiée et les séquences de souches référencées grâce à *Geneius Bioinformatics*. Actuellement 5 souches de *C.pecorum* sont reconnues (Jackson M. *et al.*, 1999) mais de nouvelles souches sont en cours d'identification.

BOULLANGER Alexandre

Contribution à l'étude de la virulence des souches de *Chlamydophila pecorum* sur le tractus urogénital mâle du koala

Thèse Vétérinaire : Lyon, le 19 mai 2010

RESUME:

La chlamydophilose est une des deux maladies émergentes représentant une nouvelle menace pour le koala. Deux espèces ont été mises en évidence : *Chlamydophila pecorum* la plus répandue et *Chlamydophila pneumoniae* de façon bien plus minoritaire. Elles sont à l'origine de différents symptômes tels que kératoconjonctivite, incontinence urinaire et infertilité. De récentes découvertes sur cette maladie ont mis en évidence une très forte prévalence de l'infection mais une faible proportion de cas cliniques. Cette thèse s'intéresse à l'étude de la virulence que pourraient avoir certaines souches de *C. pecorum*; seuls la méthodologie, les premiers résultats et certaines améliorations à apporter sont décrits.

MOTS CLES:

- Phascolarctidae
- Infections à chlamydia
- Virulence
- Appareil urogénital

JURY:

Président : Monsieur le Professeur PEYRAMOND 1er Assesseur : Madame le Professeur VIALARD

2ème Assesseur : Madame le Professeur CALLAIT-CARDINAL

Membre invité : Monsieur le Professeur Patrick BELLI

DATE DE SOUTENANCE:

19 mai 2010

ADRESSE DE L'AUTEUR:

90 rue du Faubourg la Grappe 28000 CHARTRES