

**VETAGRO SUP  
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n°65

***ETUDE DE PREVALENCE D'INFECTION A CYTAUXZOOM SP.  
DANS LA ZONE D'OCCUPATION DU LYNX (LYNX LYNX) EN  
FRANCE.***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 23 octobre 2018  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*Clara BOHIN*



VetAgro Sup





**VETAGRO SUP  
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n°65

***ETUDE DE PREVALENCE D'INFECTION A CYTAUXZOOM SP.  
DANS LA ZONE D'OCCUPATION DU LYNX (LYNX LYNX) EN  
FRANCE.***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)  
et soutenue publiquement le 23 octobre 2018  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*Clara BOHIN*





## Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (1er mars 2018)

Nom	Prénom	Département	Grade
ABITBOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DEMONT	Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JANKOWIAK	Bernard	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
JAUSSAUD	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
JEANNIN	Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Inspecteur en santé publique vétérinaire (ISPV)
JOSSON-SCHRAMME	Anne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Contractuel
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
KODJO	Angeli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDOUX	Dorothee	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Stagiaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MATEOS	Stevana	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
RIVES	Germain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SABATIER	Philippe	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGENTET	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
THOMAS-CANCIAN	Aurélié	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur



## Remerciements au jury

**A Monsieur le Professeur Olivier CLARIS,**  
*de la Faculté de Médecine de Lyon,*  
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse,  
Pour votre disponibilité et votre amabilité,  
Hommages respectueux.

**A Monsieur le Professeur Luc CHABANNE,**  
*de VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon,*  
Pour m'avoir confié ce travail de thèse et m'avoir guidée dans son élaboration,  
Pour son implication, sa disponibilité et sa gentillesse,  
Qu'il trouve ici mes remerciements les plus sincères.

**A Madame la Professeure Emmanuelle GILOT-FROMONT,**  
*de VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon,*  
Pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse,  
Pour sa patience, sa disponibilité et ses conseils  
Mes sincères remerciements.

**A Madame le Docteur Magalie RENE-MARTELLET,**  
*de VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon,*  
Pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse,  
Pour son aide dans la réalisation de toutes les phases expérimentales  
Mes sincères remerciements.









## Table des matières

Table des annexes.....	13
Table des figures .....	15
Table des tableaux.....	17
INTRODUCTION.....	19

### PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Etiologie et situation taxonomique.....	21
1.1. Taxonomie.....	21
1.2. Espèces de <i>Cytauxzoon</i> reconnues : <i>C. felis</i> et <i>C. manul</i> .....	28
1.2.1. <i>Cytauxzoon felis</i> .....	28
1.2.2. <i>Cytauxzoon manul</i> .....	28
2. Cycle et biologie.....	31
2.1. Cycle au sein de l'hôte infecté .....	31
2.2. Transmission au chat à partir du réservoir : le vecteur tique.....	32
2.3. Le lynx ( <i>Lynx sp.</i> ), espèce réservoir de la maladie ?.....	35
2.3.1. Notion de réservoir .....	35
2.3.2. Conditions permettant la constitution d'un réservoir .....	38
2.3.3. Taille critique de la population .....	39
2.3.4. Notion d'agent pathogène multi-hôte .....	39
2.3.5. Conclusion .....	40
2.3.6. <i>Cytauxzoon felis</i> .....	41
2.3.7. Adaptation au modèle européen .....	43
3. Epidémiologie .....	43
3.1. Prévalence des cas d'infection par <i>Cytauxzoon felis</i> .....	43
3.2. Profil de l'animal infecté – Influence du territoire.....	45
3.3. Répartition géographique .....	45
3.3.1. Etats-Unis.....	45
3.3.2. Europe.....	46
3.4. Saisonnalité .....	47
4. Pathogénie et expression clinique chez le chat domestique .....	47

4.1.	Infection expérimentale par <i>Cytauxzoon felis</i> .....	48
4.2.	Infection naturelle par <i>Cytauxzoon felis</i> (Etats-Unis) .....	50
4.3.	Cas d'infection à <i>Cytauxzoon sp.</i> en Europe .....	51
4.3.1.	En France.....	51
4.3.2.	En Italie .....	52
4.3.3.	Au Portugal .....	55
4.3.4.	En Espagne .....	56
4.3.5.	En Suisse .....	57
5.	Diagnostic.....	60
6.	Traitement et pronostic.....	62
6.1.	Traitement de soutien .....	62
6.1.1.	Fluidothérapie .....	62
6.1.2.	Analgésie .....	62
6.1.3.	Oxygénothérapie.....	62
6.1.4.	Alimentation .....	62
6.2.	Traitement spécifique : atovaquone et azithromycine.....	63
6.3.	Etablissement d'un critère pronostic .....	64
6.3.1.	Le rôle du cytochrome b .....	64
6.3.2.	Mise en place d'un test clinique pour identifier le génotype du cytochrome b .....	65
7.	Prévention.....	67
7.1.	Protection contre les morsures de tiques .....	67
7.2.	Prophylaxie médicale .....	67
Conclusion de la première partie.....		70

## **DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

1.	Elaboration du protocole .....	71
1.1.	Objectif du travail.....	71
1.2.	Prélèvements et choix des animaux.....	71
1.2.1.	Chats domestiques ( <i>Felis catus</i> ) .....	71
1.2.2.	Lynx boréal ( <i>Lynx lynx</i> ).....	73
2.	Technique d'analyse moléculaire.....	75

2.1.1.	Extraction de l'ADN.....	75
2.1.2.	Amplification par méthode PCR.....	75
2.1.3.	Lecture des résultats.....	77
3.	Résultats .....	79
3.1.	Prévalence de l'infection à <i>Cytauxzoon sp.</i> .....	79
3.2.	Intervalle de confiance de la prévalence .....	79
3.3.	Caractérisation des chats positifs et négatifs.....	79
3.4.	Caractérisation des lynx positifs et négatifs.....	80
3.5.	Séquençage des échantillons positifs .....	82
4.	Discussion .....	83
4.1.	Le dispositif expérimental.....	83
4.1.1.	Représentativité de l'échantillon .....	83
4.1.2.	Analyse moléculaire .....	83
4.2.	Résultats .....	84
	CONCLUSION .....	87
	Bibliographie.....	89
	Annexes.....	95



## Table des annexes

<b>Annexe 1</b> : Chabanne L, communication personnelle. Table 1.....	97
<b>Annexe 2</b> : Chabanne L, communication personnelle. Table 2.....	99
<b>Annexe 3</b> : Fiche d'information aux vétérinaires.....	100
<b>Annexe 4</b> : fiche de consentement éclairé des propriétaires.....	101
<b>Annexe 5</b> : Fiche d'information aux propriétaires de chats. ....	102
<b>Annexe 6</b> : Questionnaire à faire remplir par les propriétaires et par le vétérinaire.....	103
<b>Annexe 7</b> : Fiche de commémoratif des Lynx.....	104
<b>Annexe 8</b> : Résultats obtenus après extraction et analyse PCR. Echantillons de sang sur EDTA 1A à 2J.....	105
<b>Annexe 9</b> : Résultats obtenus après extraction et analyse PCR. Echantillons de sang sur EDTA 2K à 7J.....	106
<b>Annexe 10</b> : Résultats obtenus après extraction et analyse PCR. Echantillons de sang sur EDTA 7K à 8J.....	107
<b>Annexe 11</b> : Résultats obtenus après extraction et analyse PCR. Echantillons de rate Lx3 et Lx4. ....	108
<b>Annexe 12</b> : Résultats obtenus après extraction et analyse PCR. Echantillons de sang sur EDTA Lx1 à Lx4. ....	109





## Table des figures

<b>Figure 1</b> : Formes intra-érythrocytaire et tissulaire de <i>Cytauxzoon felis</i> (Holman <i>et al.</i> 2009) .....	21
<b>Figure 2</b> : Topologies résumées des arbres phylogénétique de Piroplasmida (Schreeg <i>et al.</i> , 2016). .....	23
<b>Figure 3</b> : Analyse phylogénétique sein de la famille Piroplasmida (Schreeg <i>et al.</i> 2016).....	24
<b>Figure 4</b> : Identification des cinq lignées chez Piroplasmida (Schreeg <i>et al.</i> 2016) .....	25
<b>Figure 5</b> : Biologie des organismes de l'ordre des Piroplasmida (Schreeg <i>et al.</i> 2016).....	26
<b>Figure 6</b> : Biologie des organismes de l'ordre des Piroplasmida (Schreeg <i>et al.</i> 2016).....	27
<b>Figure 7</b> : Arbre phylogénétique établi à partir des séquences d'ARN 18S de <i>Cytauxzoon</i> <i>sp.</i> (Alho <i>et al.</i> , 2016) .....	30
<b>Figure 8</b> : Matière blanche du télencéphale (Clarke <i>et al.</i> , 2015) .....	31
<b>Figure 9</b> : Efficacité de 10% imidaclopride/4,5% post-infestation par <i>Amblyomma</i> <i>americanum</i> adultes infestées par <i>Cytauxzoon felis</i> (Haydon <i>et al.</i> , 2002) .....	33
<b>Figure 10</b> : Carte de distribution par Etat de cas rapportés de cytauxzoonose aux Etats-Unis associé à la distribution de populations de tiques et d'hôte réservoir. (Art by Thel Melton © 2010 University of Georgia Research Foundation Inc.).....	34
<b>Figure 11</b> : Systèmes épidémiologiques incluant des populations réservoirs et des populations cibles (Haydon <i>et al.</i> , 2002) .....	37
<b>Figure 12</b> : Cycle de vie de <i>Cytauxzoon felis</i> (Tarigo <i>et al.</i> , 2013) .....	42
<b>Figure 13</b> : Distribution de <i>Cytauxzoon felis</i> chez le Lynx ( <i>Lynx rufus</i> ) dans 13 états des Etats-Unis (Shock <i>et al.</i> 2011b). .....	44
<b>Figure 14</b> : Nombre total de cas de cytauxzoonose diagnostiqués par l'OADDL et le BVMTH 1995 à 2006 (Reichard <i>et al.</i> , 2008) .....	45
<b>Figure 15</b> : Carte de distribution des cas de cytauxzoonose aux Etats-Unis et évolution sur 31 ans (1976-2007) (Tarigo <i>et al.</i> , 2013). .....	46
<b>Figure 16</b> : Nombre de chats dans les Etats du Sud-Sud-Est chez lesquels une infection à <i>Cytauxzoon felis</i> a été diagnostiquée par le NCSU-VBDDL ou par les laboratoires d'Etat de diagnostic animal à chaque mois de l'année de Mai 1998 à Juin 2004 (Birkenheuer <i>et al.</i> , 2006) .....	47
<b>Figure 17</b> : Représentation des résultats de l'étude réalisée par Krier <i>et al.</i> (1987) .....	48
<b>Figure 18</b> : Signes observés lors de l'étude de Kier <i>et al.</i> (1987). .....	49
<b>Figure 19</b> : Parasite <i>Cytauxzoon sp.</i> au sein d'un érythrocyte (Carli <i>et al.</i> , 2014) .....	53

<b>Figure 20</b> : Localisation géographique des deux zones d'identification de <i>Cytauxzoon sp.</i> en Italie (Carli <i>et al.</i> , 2014).....	55
<b>Figure 21</b> : Carte de l'Europe indiquant la localisation géographique des cas publiés d'infection à <i>Cytauxzoon sp.</i> (Nentwig <i>et al.</i> , 2018) .....	58
<b>Figure 22</b> : Modifications du thalamus pos-infestation par <i>Cytauxzoon felis</i> (Clarke <i>et al.</i> , 2015) .....	59
<b>Figure 23</b> : Frottis sanguin montrant des parasites <i>Cytauxzoon sp.</i> (Sherrill <i>et al.</i> , 2015).....	60
<b>Figure 24</b> : Occlusion vasculaire secondaire à une infiltration des macrophages par <i>Cytauxzoon felis</i> (Sherrill <i>et al.</i> , 2015) .....	61
<b>Figure 25</b> : Gène conservé par synténie entre p67 ( <i>T. parva</i> ) et cf76 ( <i>C. felis</i> ) (Tarigo <i>et al.</i> , 2013) .....	68
<b>Figure 26</b> : Mise en évidence d'une sero-réactivité féline à cf76 et aux fragments de cf76 par Western blot (Tarigo <i>et al.</i> , 2013).....	69
<b>Figure 27</b> : Localisation de l'ensemble des cliniques vétérinaires participant à l'étude.....	72
<b>Figure 28</b> : Répartition du lynx boréal ( <i>Lynx lynx</i> ) en France en 2017 (Bulletin d'information du réseau lynx, Flash info du 31 juillet 2018, ONCFS) .....	72
<b>Figure 29</b> : Géolocalisation des communes où ont été collectés les lynx étudiés. ....	74
<b>Figure 30</b> : Photographie de gel d'électrophorèse après passage dans le transilluminateur....	78
<b>Figure 31</b> : Géolocalisation des lynx positifs et négatifs. ....	81
<b>Figure 32</b> : Sensibilités de la PCR classique et de la PCR nichée obtenues en utilisant une séquence cible de <i>Babesia microti</i> (Kim <i>et al.</i> , 2013). ....	84

## Table des tableaux

<b>Tableau I</b> : Efficacité du collier à base de 10 % imidaclopride/4.5 % fluméthrine appliqué à J0 de l'étude contre <i>Amblyomma americanum</i> chez les chats. ....	33
<b>Tableau II</b> : Résultats des examens hématologiques et biochimiques de 12 chats atteint de cytauxzoonose. ....	51
<b>Tableau III</b> : Synthèse des signes cliniques et paracliniques observables lors d'une infestation par <i>Cytauxzoon sp.</i> ....	59
<b>Tableau IV</b> : Premiers résultats de Cohn et al. (2011) chez les chats infectés par <i>Cytauxzoon felis</i> et traités avec l'association d'atovaquone et azithromycine ou avec de l'imidocarbe (Cohn <i>et al.</i> , 2011). ....	63
<b>Tableau V</b> : Seuil obtenu à partir d'une RT-PCR réalisée sur 79 chats atteints de cytauxzoonose et traités avec soit une association d'atovaquone et d'azithromycine soit avec de l'imidocarbe (Cohn <i>et al.</i> , 2011). ....	64
<b>Tableau VI</b> : Corrélation entre le taux de survie des chats traités par l'association azithromycine/atovaquone (A&A) et le génotype du cytochrome b de <i>Cytauxzoon felis</i> (Cohn <i>et al.</i> , 2011). ....	65
<b>Tableau VII</b> : Spécificités actuelles et prédites de l'échantillonnage PCR. ....	66
<b>Tableau VIII</b> : Valeur prédictive positive pour l'identification du cytochrome b1 de <i>Cytauxzoon felis</i> . ....	66
<b>Tableau IX</b> : Recensement des prélèvements de lynx ( <i>Lynx lynx</i> ) analysés pour la recherche de <i>Cytauxzoon sp.</i> ....	73
<b>Tableau X</b> : Composition du mix utilisé pour la recherche de <i>Cytauxzoon sp.</i> chez les chats domestiques et les lynx. ....	76
<b>Tableau XI</b> : Amorces utilisées lors des deux PCR successives de la PCR nichée. ....	76
<b>Tableau XII</b> : Programmes des 2 PCR utilisés pour la recherche de <i>Cytauxzoon sp.</i> chez les chats domestiques et les lynx. ....	77
<b>Tableau XIII</b> : Prévalence établie sur la base des échantillons (sang, rate, muscle) récoltés. ....	79
<b>Tableau XIV</b> : Analyse des séquences issues d'échantillons de sang positifs en PCR. ....	82



## INTRODUCTION

La cytauxzoonose féline est une protozoose infectieuse, inoculable et non contagieuse affectant les félinés sauvages et domestiques en Amérique du Nord. L'agent responsable de la maladie, *Cytauxzoon felis* (protozoaire du groupe des Apicomplexa ou sporozoaires, ordre des Piroplasmida ou piroplasmes, famille des Theileriidae) se développe dans les érythrocytes et le système réticulo-endothélial. Chez le chat domestique (*Felis catus*), il entraîne l'apparition d'un syndrome pyrétique et hémolytique, caractérisé par une anémie accompagnée d'ictère, avec présence d'inclusions intra-érythrocytaires observables sur le frottis sanguin. La maladie conduit dans une grande majorité des cas à la mort des chats infectés.

Décrite pour la première fois en 1973 dans le Missouri aux Etats-Unis, la cytauxzoonose féline est une maladie vectorielle émergente, présente désormais dans tout le Sud-Est des Etats-Unis. Le vecteur principal semble être la tique *Amblyomma americanum*, mais *Dermacentor variabilis* est également un vecteur compétent. Le lynx roux (*Lynx rufus*) constitue le réservoir. Certains chats peuvent aussi être porteurs asymptomatiques ce qui pose la question d'une transmission entre chats domestiques (*Felis catus*).

En Europe, l'identification d'un agent voisin de *Cytauxzoon felis* a d'abord été effectuée sur des lynx ibériques (*Lynx pardinus*) en Espagne (Díaz-Regañón et al., 2017; Luaces et al., 2005). Depuis, plusieurs cas ont été recensés en Italie (Criado-Fornelio et al., 2003; Veronesi et al., 2016), au Portugal (Alho et al., 2016), en Roumanie (Gallusová et al., 2016a), en France (Legroux et al., 2017) et en Suisse (Nentwig et al., 2018).

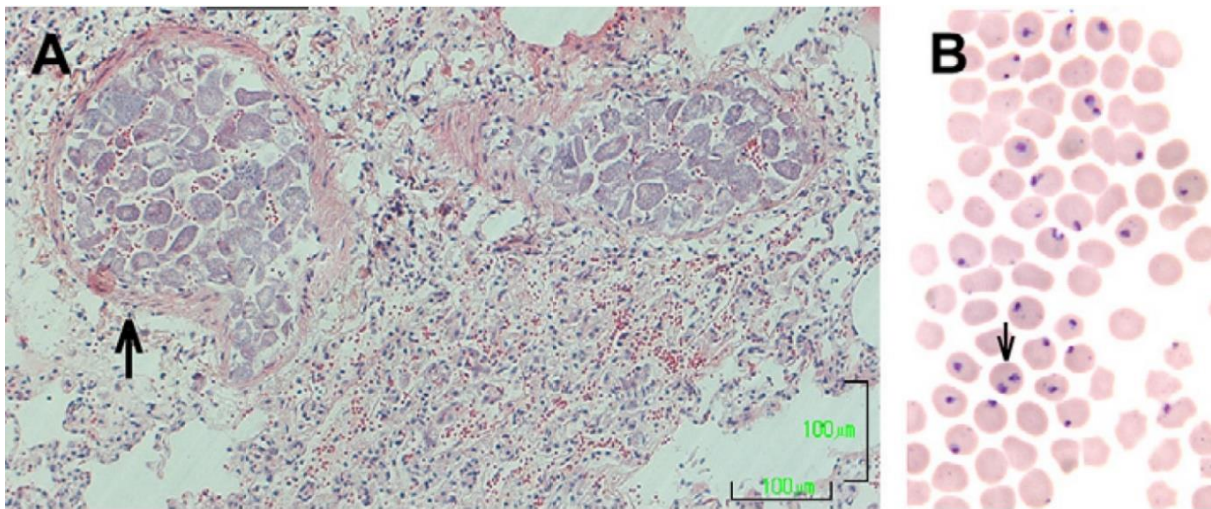
En France, après une première description mettant en évidence la présence d'ADN de *Cytauxzoon sp.* sur des prélèvements sanguins de chat (Criado-Fornelio et al., 2009), un cas de cytauxzoonose est identifié en 2014 chez un chat domestique vivant en Côtes d'Or (Legroux et al., 2017). La description d'un cas de microbabésiose chez un chat en Haute-Saône une vingtaine d'années auparavant (Léger et al., 1992) permet également d'évoquer *Cytauxzoon*. On peut dès lors s'interroger sur l'importance de l'infection du chat (*Felis catus*) et des autres félinés sauvages (*Lynx lynx* et *Felis silvestris*) par *Cytauxzoon sp.* en France.

Ces éléments sont à l'origine d'un travail d'enquête centré sur les départements du Jura, de l'Ain, de la Haute-Savoie et du Doubs, régions habitées en France par le lynx (*Lynx lynx*) prenant comme hypothèse que ce dernier puisse être réservoir de *Cytauxzoon sp.* Après une première partie bibliographique consacrée à l'infection du chat et des autres félidés sauvages par *Cytauxzoon sp.*, nous rendrons compte dans une deuxième partie des résultats de l'enquête effectuée dans le but de déterminer la prévalence de *Cytauxzoon sp.* chez les félidés sauvages et domestiques de cette région ainsi que la pathogénicité potentielle de ce parasite.

# PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Etiologie et situation taxonomique

L'agent causal est un parasite du genre *Cytauxzoon* (Shock *et al.*, 2011; Tarigo *et al.*, 2013; Veronesi *et al.*, 2016), protozoaire du groupe des Apicomplexa ou sporozoaires, rattaché à l'Ordre des Piroplasmida ou piroplasmes, famille des Theileriidae, parasites intra-érythrocytaires ou du système réticulo-endothélial. Il existe sous deux formes distinctes : une forme érythrocytaire (piroplasma) et une forme tissulaire (schizonte) (Figure 1).



**Figure 1** : Formes intra-érythrocytaire et tissulaire de *Cytauxzoon felis*. (A) Schizonte intracellulaire qui obstrue la lumière d'un petit vaisseau sanguin (flèche large) dans un poumon de chat (coloration Hemalun Eosine). (B) Nombreux piroplasmes intracellulaires localisés dans des érythrocytes de sang périphérique de chat (coloration Giemsa, grossissement original x1000). Plusieurs parasites sont souvent observés au sein d'un même érythrocyte (flèche simple) (Holman *et al.*, 2009).

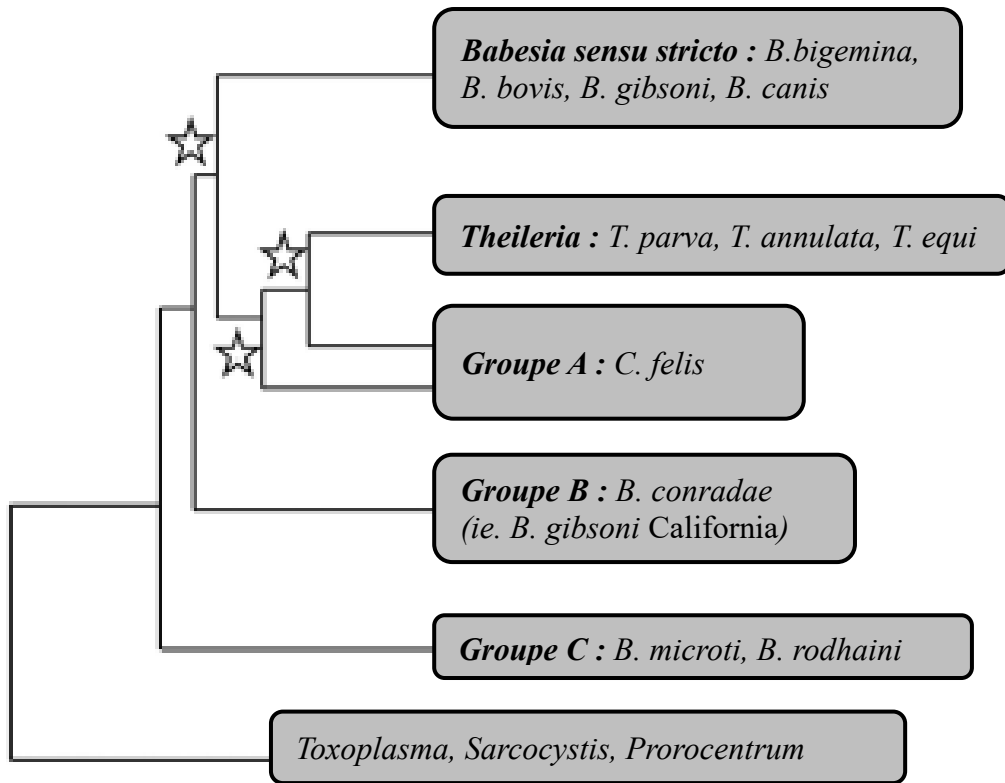
### 1.1. Taxonomie

Le genre *Babesia* se compose de sporozoaires qui infectent une grande diversité de mammifères ainsi que certains oiseaux (Criado *et al.*, 2006). Les différentes espèces de *Babesia* sont responsables de babésioses (Chauvin *et al.*, 2009) entraînant chez l'hôte infecté un éventail de symptômes allant d'un état subclinique à une hyperthermie, voire une anémie hémolytique.

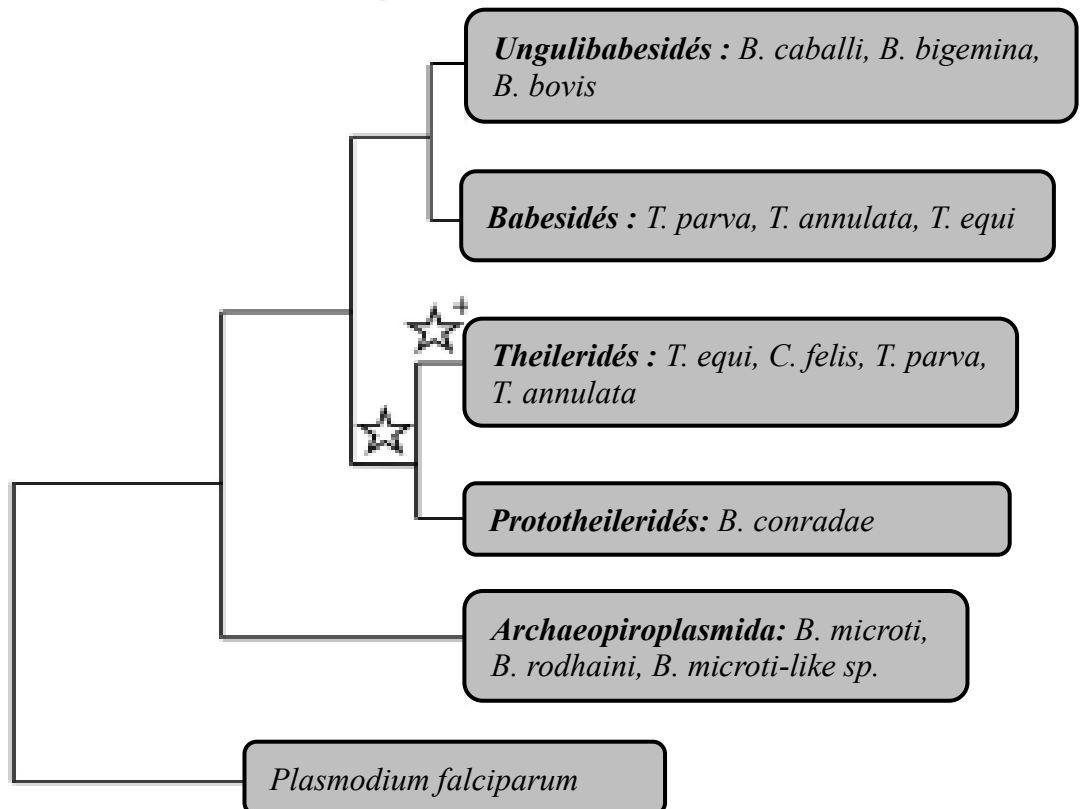
Le critère de classification principal pour identifier les babésies ou piroplasmes est basé historiquement sur la taille du protozoaire. Les apports de la biologie moléculaire ont remis en cause cette classification ces dernières années (Schreeg *et al.*, 2016).

Plusieurs études ont utilisé l'analyse des séquences d'ARN ribosomal 18S pour établir un arbre phylogénétique de l'ordre Piroplasmida (Lack *et al.*, 2012) (Figure 2).

A) Allsopp et Allsopp, 2006

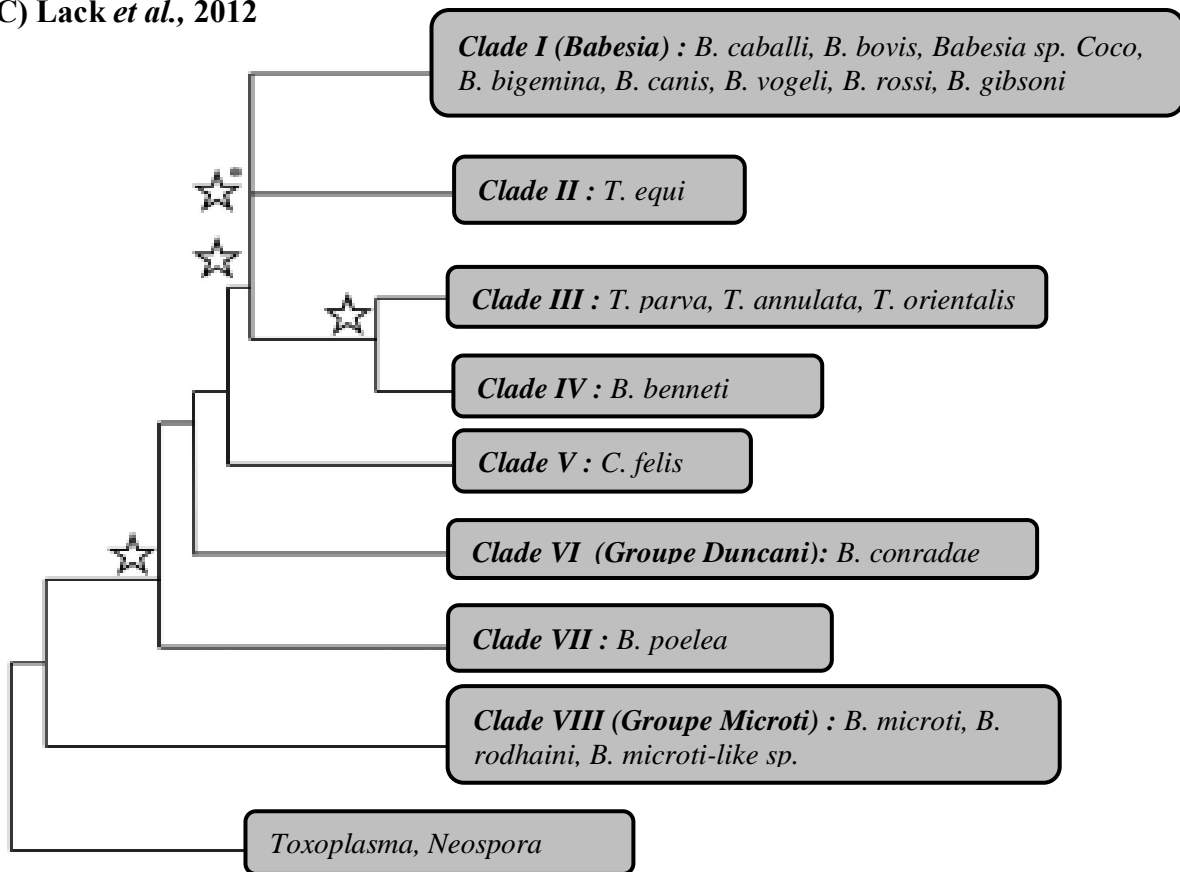


B) Criado-Fornelio et al., 2003

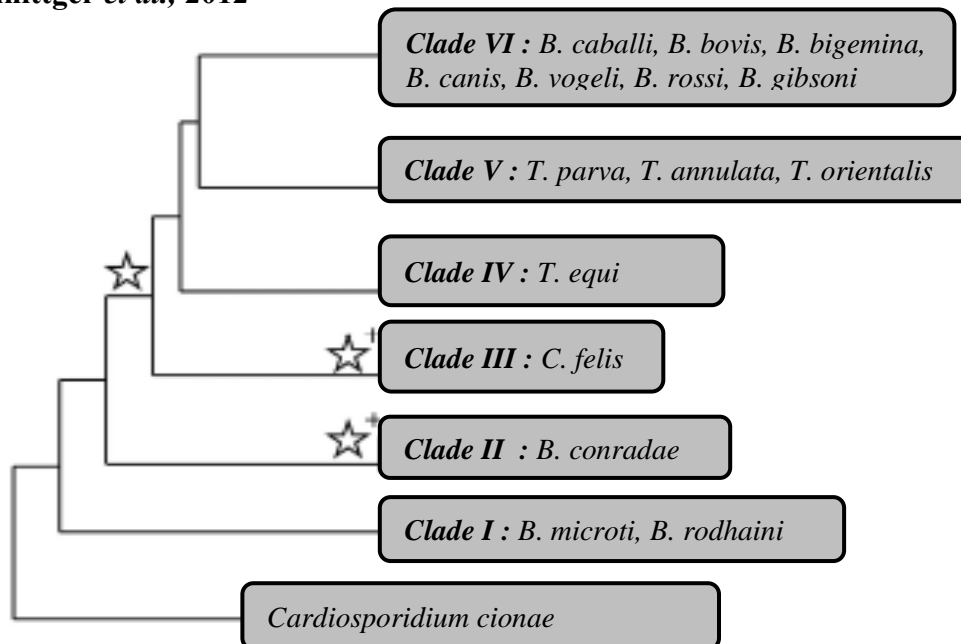




C) Lack *et al.*, 2012



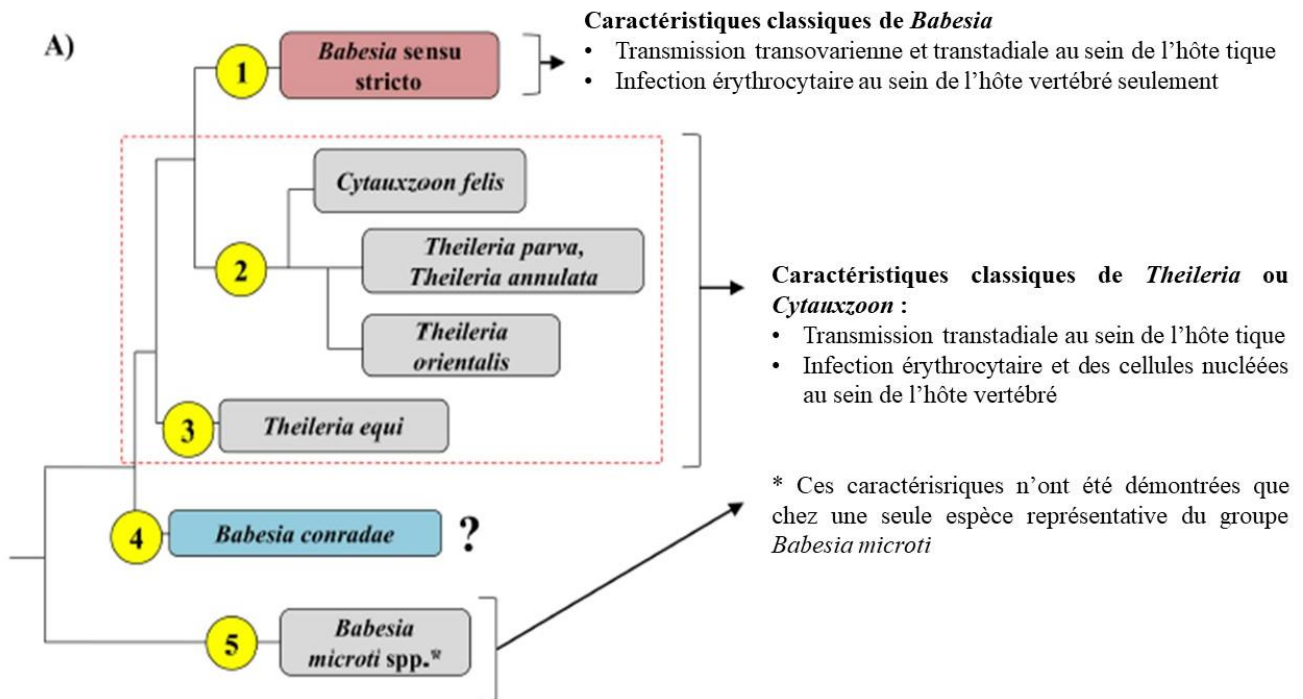
D) Schnittger *et al.*, 2012



**Figure 2 :** Topologies résumées des arbres phylogénétiques de Piroplasmida basées sur l'analyse des séquences d'ARNr 18S dans quatre études. La nomenclature de chaque sous-groupe correspond respectivement aux noms décrits dans les articles correspondants. Les étoiles correspondent aux nœuds ayant une valeur « bootstrap » de moins de 70% (A-C) ou une probabilité postérieure Bayésienne de moins de 95% (C-D). Les valeurs limites pour la valeur « bootstrap » et la probabilité postérieure reflètent les valeurs trouvées par Lack *et al.* Les espèces soulignées correspondent aux espèces analysées dans l'étude de Schreeg *et al.* (2016).

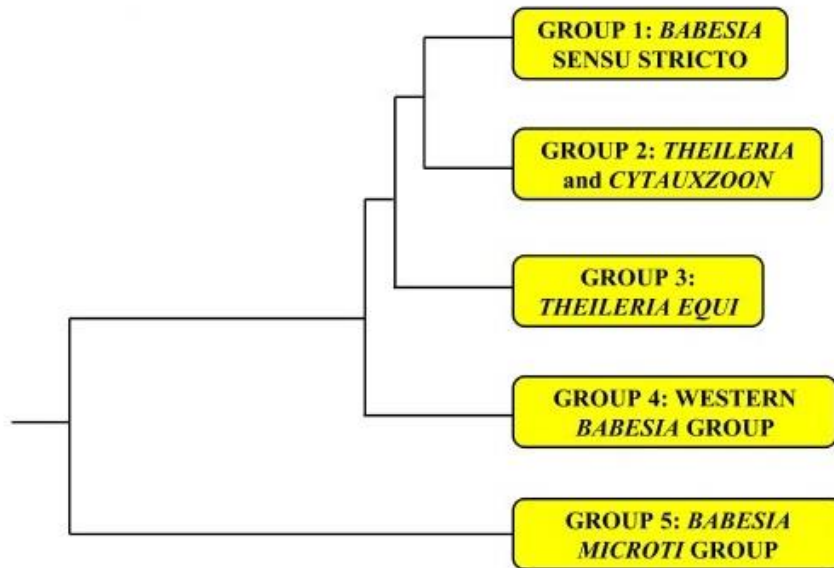


Schreeg *et al.* (2016) mettent ainsi en évidence cinq groupes au sein de l'ordre Piroplasmida. La plupart des clades décrits correspondent aux clades précédemment décrits. En revanche, *Cytauxzoon* et *Theileria* sont regroupés en un seul clade qui est le groupe frère du clade *Babesia sensu stricto*.



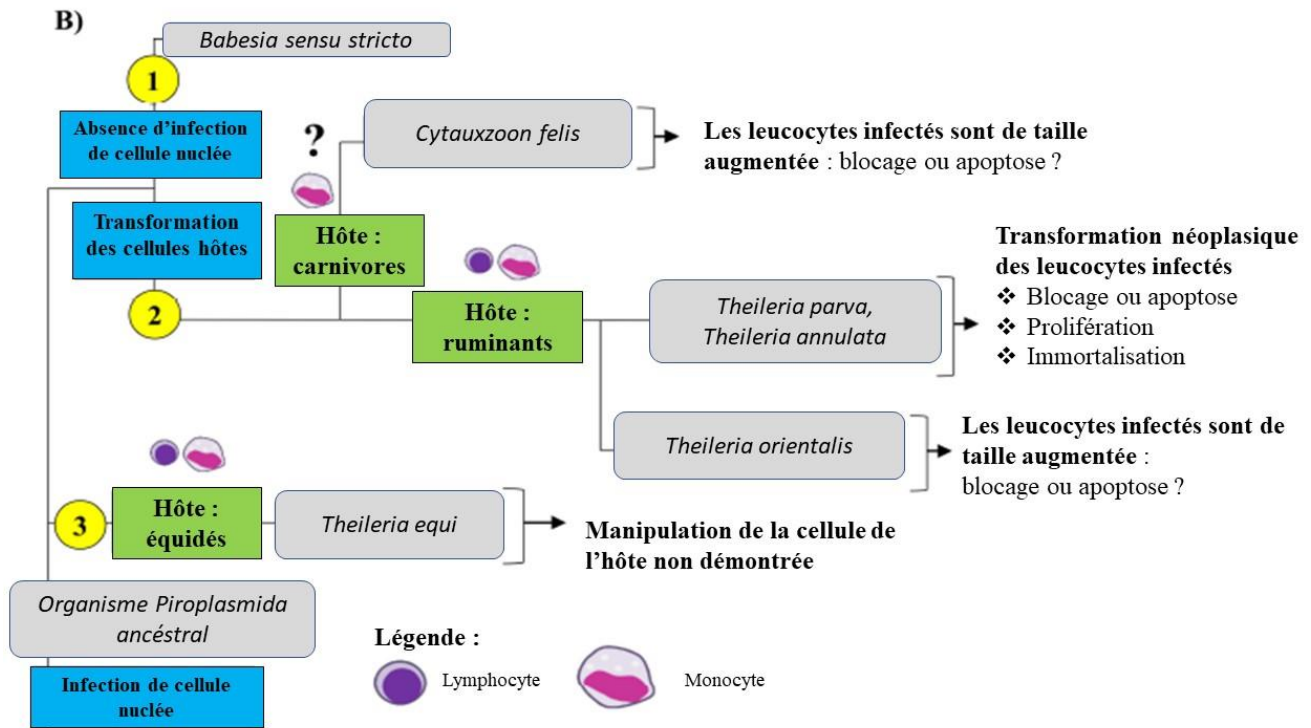
**Figure 4** : Identification des cinq lignées chez Piroplasmida suite à l'analyse concaténant le séquençage d'ARN ribosomal 18S et l'analyse de l'ADN mitochondrial. La longueur des branches n'est pas à l'échelle (Schreeg *et al.* 2016).

En se basant sur la proximité phylogénétique du genre *Cytauxzoon* avec les genres *Babesia* et *Theileria*, nous pouvons en déduire une partie de ses caractéristiques à la fois physiques et fonctionnelles.



**Figure 5** : La biologie des organismes de l'ordre des Piroplasmida est cohérente avec la phylogénie obtenue à partir de la concaténation de l'analyse mitochondriale et des séquences 18S. Les groupes sont indiqués par les cercles jaunes à gauche de chaque clade. Les branches ne sont pas à l'échelle (Schreeg et al. 2016).

A) Organismes du Groupe 1 : infectent uniquement les érythrocytes et ont une transmission transovarienne au sein de l'hôte tique. Organismes des Groupes 2, 3 et 5 : ils seraient limités à une transmission transtadial dans l'hôte tique et infectent les cellules nucléées avant les érythrocytes. Les détails concernant l'hôte tique, la transmission au sein de la tique et l'infection des cellules nucléées sont inconnus concernant le Groupe 4 et l'infection des cellules nucléées de l'hôte a été démontré chez une seule espèce du Groupe 5.



**Figure 6 :** La biologie des organismes de l'ordre des Piropasmida est cohérente avec la phylogénie obtenue à partir de la concaténation de l'analyse mitochondriale et des séquences 18S. Les groupes sont indiqués par les cercles jaunes à gauche de chaque clade. Les branches ne sont pas à l'échelle (Schreeg et al. 2016).

B) Alors qu'il a été démontré qu'un grand nombre d'organismes des Groupes 2 et 3 infectent les leucocytes, le leucocyte spécifiquement infecté n'est pas caractéristique du clade et n'a pas été identifié dans certaines espèces (ex. *Cytauxzoon felis*). De plus, les caractéristiques biologiques patragées par les organismes du groupe 2 permettent la distinction avec les organismes du Groupe 3. *Theileria equi* infecte spécifiquement l'hôte équin et la maladie est causée par l'infection par le parasite des érythrocytes plutôt que par la phase de schizogonie au sein des leucocytes. Cependant, certaines preuves indiquent que les organismes du Groupe 2 ont développé des méthodes plus complexes dans la manipulation des leucocytes de l'hôte. Des espèces du Groupe 2 qui divergeaient auparavant (*Cytauxzoon felis*) infectent exclusivement les carnivores et l'infection par le schizonte entraîne la formation de cellules de taille très augmentée ce qui suggère un blocage de l'apoptose chez la cellule de l'hôte. Les espèces *Theileria* restantes dans le Groupe 2 infecte exclusivement les Ruminants. Les organismes divergeant du Groupe 2 dans le clade suivant, dont *Theileria orientalis*, entraînent aussi la formation de cellules de taille augmentées lors de l'infection par le schizonte. Ce groupe est communément décrit comme le groupe de « non transformant » des espèces *Theileria*. Ceci en opposition des *Theileria* « transformant » (*T. annulata* et *parva*) qui transforment de façon réversible les leucocytes de l'hôte en une cellule néoplasique proliférative ce qui facilite la réplication du parasite.

Ainsi, *Cytauxzoon sp.* est un protozoaire qui a une transmission transtadiale au sein de la tique. Il se distingue ainsi de *Babesia sp.* qui ne possède qu'une forme érythrocytaire (Meinkoth *et al.*, 2005). Il se distingue ensuite de *Theileria sp.* par la localisation de la réplication du schizonte qui se déroule au sein des phagocytes mononucléés pour *Cytauxzoon felis* et principalement au sein des nœuds lymphatiques pour *Theileria sp.* (Shock *et al.*, 2011). Le piroplasma se présente sous la forme d'inclusions de l'ordre du micromètre au sein des érythrocytes et des macrophages (Holman *et al.*, 2009). De plus, les cellules infectées par le schizonte chez les vertébrés sont de taille augmentée ce qui peut suggérer un blocage de l'apoptose de ces cellules.

## 1.2. Espèces de *Cytauxzoon* reconnues : *C. felis* et *C. manul*

### 1.2.1. *Cytauxzoon felis*

*Cytauxzoon felis* est décrit pour la première fois en 1976 par Wagner *et al.* comme un parasite du chat (*Felis catus*) vivant dans les régions boisées du Sud-Ouest du Missouri (Etats-Unis). Le parasite entraîne un syndrome fébrile aigu fatal dans la majorité des cas. Parmi les premiers cas décrits, plusieurs avaient été auparavant diagnostiqués comme une infection à *Hemobartonella felis* du fait de la présence, chez les chats infectés, d'une anémie et d'un ictère accompagnés d'une érythroparasitémie visible au frottis sanguin. Cependant, lors de l'analyse post-mortem, la description de la phase tissulaire du parasite se différencie clairement de l'hémobartonellose. Dans les années qui suivent, la maladie est décrite dans de nombreux états du Sud-Est des Etats-Unis dont l'Arkansas, l'Oklahoma, le Texas, le Mississippi, la Géorgie, la Louisiane et la Floride (Meinkoth *et al.*, 2005).

Dans la suite de cette étude, nous utilisons le parasite *Cytauxzoon felis* comme modèle à confronter aux différents résultats et descriptions en Europe.

### 1.2.2. *Cytauxzoon manul*

En 2005, Reichard *et al.* observent *Cytauxzoon manul* sur des échantillons de 4 chats de Pallas (*Otocolobus manul*) en Mongolie. Sur chacun des frottis sanguins, des piroplasmes intra-érythrocytaires de forme ovale à ronde avec un noyau excentré, morphologiquement identiques à *Cytauxzoon felis*, sont identifiés. L'ADN de deux chats de Pallas (*Otocolobus manul*) infectés par des piroplasmes intra-érythrocytaires est extrait et le gène codant pour l'ARN ribosomal 18S est amplifié et séquencé.

Les analyses phylogénétiques des séquences ADN du parasite révèlent un groupe apparenté à *Cytauxzoon felis*. La moyenne corrigée du pourcentage de divergence entre le parasite des chats de Pallas (*Otocolobus manul*) et *Cytauxzoon felis* est de 1,490% ce qui est supérieur à la plupart des autres piroplasmides pour lesquels le statut d'espèce est accepté. En se basant sur la variation des séquences, ils nomment le parasite *Cytauxzoon manul*. L'analyse de 3 échantillons de *C. manul* à partir de sang de chat de Pallas (*Otocolobus manul*) met en évidence 3 séquences ARNr 18S et ADN identiques (Reichard *et al.*, 2005a).

### 1.2.3. *Cytauxzoon sp.* en Europe

Même s'il n'y a actuellement que deux espèces reconnues de *Cytauxzoon*, *Cytauxzoon felis* et *Cytauxzoon manul*, d'autres protozoaires pouvant appartenir au genre *Cytauxzoon* ont été décrits en Europe, notamment en Italie (Criado-Fornelio *et al.*, 2003), Espagne (Díaz-Regañón *et al.*, 2017), Portugal (Alho *et al.*, 2016), Roumanie (Gallusová *et al.*, 2016b), France (Legroux *et al.*, 2017) et Suisse (Nentwig *et al.*, 2018). Pour chacun d'entre eux, l'hôte semble être un félin sauvage ou domestique et les vecteurs différentes tiques dures. *Ixodes ricinus* semble être un candidat comme vecteur pour le parasite en Europe (Gallusová *et al.*, 2016b).

L'ensemble des piroplasmides du genre *Cytauxzoon* sont regroupés dans l'arbre phylogénétique établi par Nentwig *et al.*, (2018), Figure 7.



**Figure 7 :** Arbre phylogénétique établi à partir des séquences d'ARN 18S de *Cytauxzoon* sp. La méthode HKY85 est appliquée pour le calcul des distances et la topologie via l'algorithme de Neighbor-Joining. Les numéros au niveau des nœuds indiquent la valeur de bootstrap après 1000 tirages. La nouvelle séquence est écrite en gras. (Alho et al., 2016).



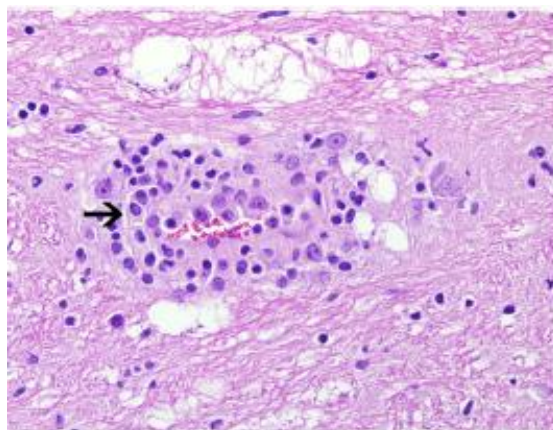
## 2. Cycle et biologie

### 2.1. Cycle au sein de l'hôte infecté

Comme précédemment discuté, il y a un certain consensus concernant la désignation du lynx roux (*Lynx rufus*) comme réservoir de *Cytauxzoon felis* en Amérique du Nord. Les infections à *Cytauxzoon felis* dans les zones enzootiques se produisent lorsque les chats domestiques (*Felis catus*) ou sauvages (*Felis silvestris*) sont incorporés dans le cycle naturel se déroulant entre la tique et le lynx (*Lynx rufus*) (Alvarado-Rybak *et al.*, 2016). Les chats vivants proches de zones boisées ou de zones de faible densité humaine sont plus probablement infectés (Reichard *et al.*, 2009).

Les schizontes se retrouvent au sein de n'importe quel tissu mais ils sont particulièrement nombreux dans les poumons, la rate, le foie et les nœuds lymphatiques (Meinkoth *et al.*, 2005). Ils sont responsables en grande partie des signes cliniques. L'accumulation de schizontes dans les petits vaisseaux entraîne la formation de thrombi dans tout l'organisme. L'occlusion vasculaire et les possibles vasculites sont responsables d'ischémie tissulaire entraînant la mort dans la majorité des cas.

A l'issue de la phase de schizogonie, on obtient des mérozoïtes qui rompent les macrophages de l'hôte avant de pénétrer dans un nouveau macrophage ou dans un érythrocyte. Au sein de l'érythrocyte, le parasite, alors appelé piroplasma, a une apparence caractéristique en anneau et effectue une reproduction asexuée par fission. Le piroplasma peut rompre les érythrocytes mais la réplication des schizontes de *Cytauxzoon felis* au sein des macrophages aboutit à l'occlusion des vaisseaux et à une maladie systémique ce qui est d'autant plus délétère (Reichard *et al.*, 2008).



**Figure 8** : Matière blanche du télencéphale, une petite artériole (flèche) est élargie à cause de l'accumulation de lymphocytes et de cellules plasmatiques (vasculite) (Clarke *et al.*, 2015).

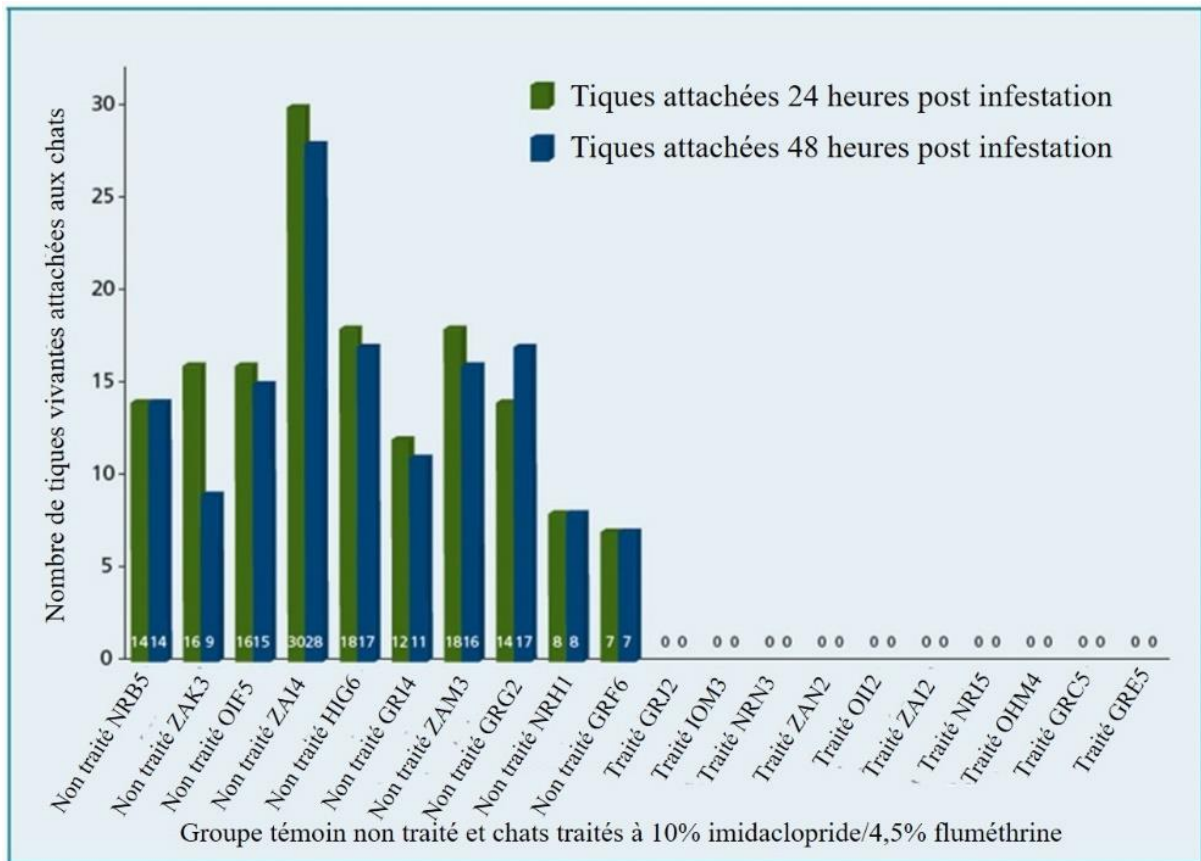
## 2.2. Transmission au chat à partir du réservoir : le vecteur tique

Reichard *et al.* (2013) ont évalué l'efficacité d'un collier contenant 10% d'imidaclopride et 4,5% de fluméthrine (collier Seresto®, Bayer) pour prévenir la transmission de *Cytauxzoon felis* chez les chats (*Felis catus*) en repoussant les tiques.

Vingt-et-un chats sont utilisés dans cette étude. Le chat donneur de *Cytauxzoon felis* est un survivant d'une infestation à *Cytauxzoon felis* provenant d'une étude précédente sur la transmission du parasite (Reichard *et al.*, 2009). Les vingt autres chats sont utilisés pour tester l'efficacité du collier. Ces vingt chats sont séparés en deux groupes de façon aléatoire avec un groupe de chats traités (n=10) et un groupe de chats non traités (n=10). Une analyse de la sensibilité aux tiques de chaque chat a été effectuée et des représentants à forte, moyenne et faible sensibilité sont présents dans chaque groupe.

Les colliers à base de 10% imidaclopride/4,5% fluméthrine sont posés sur les chats traités à J0 et chaque groupe est infesté par des tiques *Amblyomma americanum* infectées par *Cytauxzoon felis* à J30. Ces tiques ont été nourries dès l'état de nymphe avec le sang du chat donneur de *Cytauxzoon felis*.

Un comptage des tiques est réalisé à 24 et 48 heures post infestation (soient J31 et J32). La transmission de *Cytauxzoon felis* est déterminée par analyse sanguine (détection du parasite par analyse PCR).



**Figure 9 :** Nombre de tiques accrochées au groupe de contrôle des chats non traités et aux chats traités avec 10% imidaclopride/4,5% fluméthrine 24 heures (étude à J31) et 48 heures (étude à J32) post-infestation avec des tiques *Amblyomma americanum* adultes infestées par *Cytauxzoon felis*.

Aucun des chats traités n’a présenté de tiques, alors que tous les chats non traités ont présenté des tiques accrochées et ayant réalisé un repas sanguin. Parmi les chats non traités, 9 sur 10 (90%) sont infectés par *Cytauxzoon felis*. *Cytauxzoon felis* n’a été transmis à aucun chat traité. La transmission de *Cytauxzoon felis* chez les chats non traités a été détectée pour la première fois entre les jours 8 et 16 post-infestation. L’efficacité du traitement à base de 10% imidaclopride/4,5% fluméthrine a alors pu être objectivée (Tableau I).

**Tableau I :** Efficacité du collier à base de 10 % imidaclopride/4.5 % fluméthrine appliqué à J0 de l’étude contre *Amblyomma americanum* chez les chats.

$$\text{Efficacité (\%)} = 100 \times (m_c - m_t) / m_c$$

$m_c$  : moyenne géométrique d’*A. americanum* vivant attachées aux chats du groupe témoin non traité.

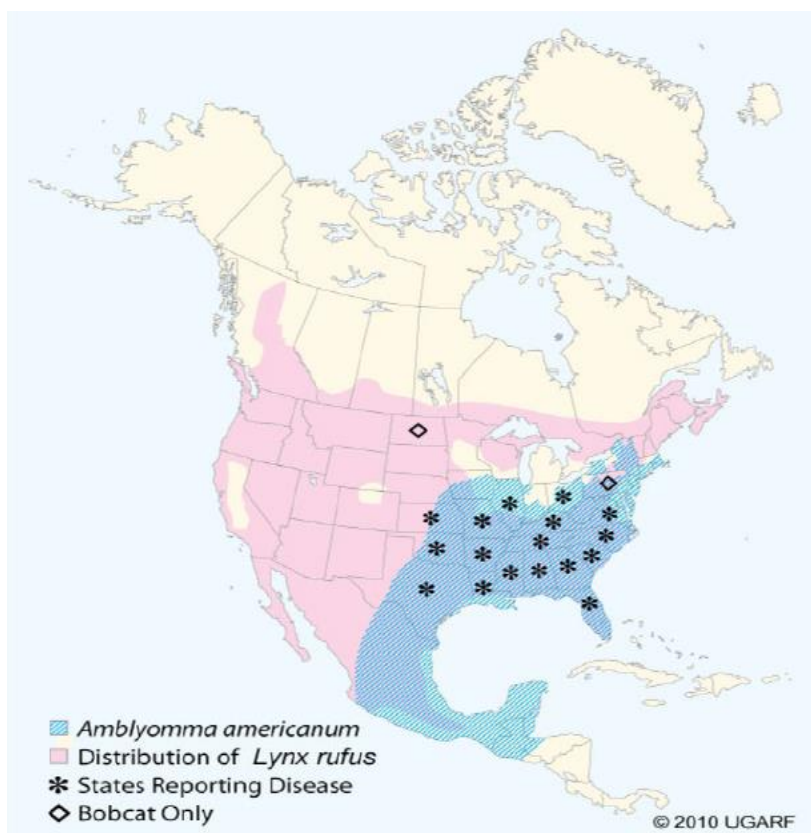
$m_t$  : moyenne géométrique d’*A. americanum* attachées aux chats du groupe traité.

Jour de suivi	Moyenne géométrique du nombre de tiques encore attachées		Efficacité (%)	Valeur p
	Chats témoins non traités	Chats traités au collier		
31	15,3	0	100	p < 0,001
32	14,2	0	100	p < 0,001

Etant donné qu'aucune tique ne s'est accrochée sur les chats traités, l'efficacité du collier est évaluée à 100% à J31 et J32.

Ainsi, les chats qui ne sont pas infestés par les tiques ne sont pas infectés par *Cytauxzoon felis*. Cet article conforte l'idée comme quoi la tique serait le vecteur du protozoaire. Le rôle de la tique *Amblyomma americanum* a été prouvé (Reichard *et al.*, 2009) mais il est possible que *Dermacentor variabilis* joue aussi un rôle.

*Amblyomma americanum* serait un vecteur plus efficace que *Dermacentor variabilis* (Shock *et al.*, 2011). En effet, Shock *et al.* (2011) établissent une corrélation entre la présence de *Amblyomma americanum* et de *Cytauxzoon.felis* ainsi qu'une absence de corrélation avec *Dermacentor variabilis*. L'absence de corrélation avec *Dermacentor variabilis* est à nuancer car *Dermacentor variabilis* est présent de façon homogène sur l'ensemble du territoire (Figure 10).



**Figure 10** : Carte de distribution par Etat de cas rapportés de cytauxzoonose aux Etats-Unis associé à la distribution de populations de tiques et d'hôte réservoir. (Art by Thel Melton © 2010 University of Georgia Research Foundation Inc.)

Concernant les autres *Cytauxzoon* identifiés notamment en Europe, nous ne possédons à notre connaissance aucune donnée permettant d'identifier précisément un vecteur. Néanmoins, la seule tique identifiée chez le lynx boréal (*Lynx lynx*) est la tique dure *Ixodes ricinus* (Gallusová *et al.*, 2016b). Il s'agirait donc du principal vecteur candidat concernant la transmission de *Cytauxzoon sp.* en Europe. De plus, il a été démontré que *Dermacentor variabilis* peut servir de vecteur à *Cytauxzoon felis* (Blouin *et al.*, 1984) or, *Dermacentor variabilis* est présente en Europe. Elle représenterait un autre vecteur potentiel.

### 2.3. Le lynx (*Lynx sp.*), espèce réservoir de la maladie ?

#### 2.3.1. Notion de réservoir

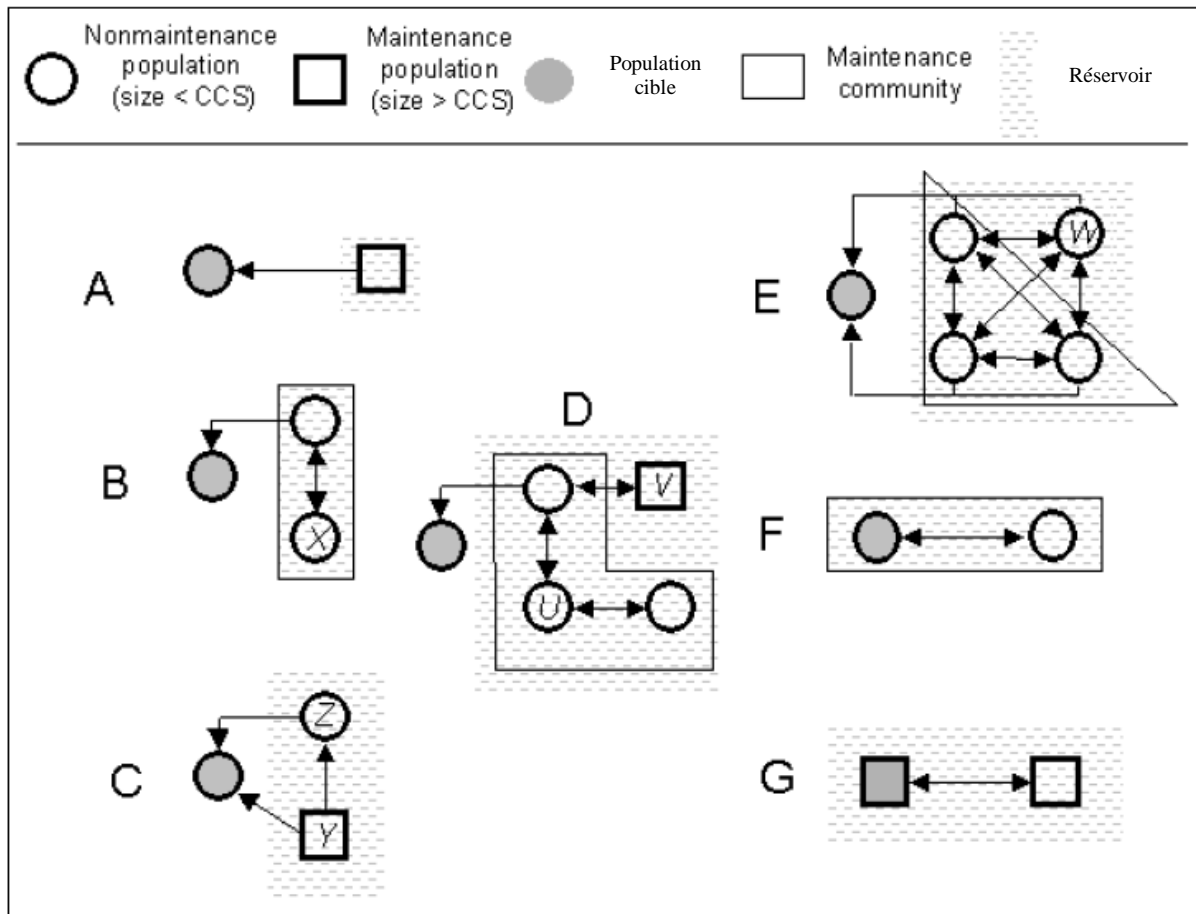
La notion de réservoir peut être associée à la notion d'espèce (Naranjo *et al.*, 2008) ou de population (Ashford, 2003). De plus, un individu d'une espèce peut être le réservoir naturel d'un agent pathogène mais uniquement dans un contexte écologique et environnemental particulier (Payne, 2014). Le maintien d'un agent infectieux dans un réservoir requiert que l'agent soit transmis entre les individus de l'espèce réservoir, soit directement, soit indirectement via des vecteurs (Daniels *et al.*, 2007). Le réservoir peut être aussi affecté par l'agent pathogène, du moment qu'il survit assez longtemps pour ne pas bloquer le cycle de transmission. Il n'est donc pas nécessaire qu'il soit porteur asymptomatique. Un réservoir peut aussi être un vecteur de la maladie, lorsqu'il s'agit d'un arthropode qui entretient le cycle de transmission de l'agent pathogène grâce à la transmission verticale de l'agent des femelles à sa descendance.

Ashford (2003) décrit un réservoir comme un système écologique dans lequel l'agent infectieux peut survivre indéfiniment. Haydon *et al.* (2002) définissent les notions de population source et de population cible, le réservoir représentant une ou plusieurs populations ou environnements connectés (population source) dans lequel le pathogène peut être maintenu en permanence. De plus, dans la définition de Haydon *et al.* (2002), le réservoir peut lui-même être source d'infection pour la population cible et la notion de réservoir peut aussi coïncider ou non avec celle de la population cible.

Dans le cas d'agents multi-hôtes, le réservoir peut être constitué de plusieurs populations d'espèces différentes. L'ensemble forme alors une communauté réservoir de l'infection dans laquelle peuvent se trouver des hôtes non essentiels à la maintenance du pathogène mais jouant un rôle dans sa transmission à la population cible (Ashford, 2003).

Les différents systèmes épidémiologiques incluant des populations cibles et des populations réservoirs sont illustrés à la Figure 11. La population qui nous préoccupe est notée population cible. Toutes les autres populations hôtes potentielles qui sont épidémiologiquement connectées directement ou indirectement à la population cible sont des populations non cibles et peuvent faire partie du réservoir.

La taille critique de communauté (*Community Critical Size, CCS*) correspond à la taille minimale d'une population fermée au sein de laquelle un pathogène peut persister indéfiniment (Haydon *et al.*, 2005). Les pathogènes ne persistent que dans les populations de taille supérieure à la taille critique de communauté. Ce sont des populations d'entretien (*maintenance population*). Les populations de taille inférieure à celle de la taille critique de communauté sont des populations de « non-entretien » (*non-maintenance population*). Dans les systèmes plus complexes, la transmission du pathogène entre plusieurs populations de non entretien peut constituer une communauté d'entretien (*maintenance community*). De plus, toute population qui permet la transmission directe de l'infection à la population cible se définit comme une population source. Les populations sources peuvent elles-mêmes être des populations d'entretien ou, alternativement, peuvent constituer tout ou une partie du lien de transmission de population d'entretien à population cible.



**Figure 11 : Systèmes épidémiologiques incluant des populations réservoirs et des populations cibles.**

Dans le cas le plus simple A, la population de maintenance, permettant la persistance de l'agent pathogène, transmet un agent pathogène à une population cible. Pour le cas B, le réservoir est composé de deux populations de non-maintenance connectées, dont une est la source d'infection. Aucune des deux populations ne pourrait constituer un réservoir à elle seule. Le cas C montre une situation dans laquelle Y est une population de maintenance, mais la transmission peut se produire directement entre Y et la population cible ou par le biais d'une autre population source Z. Même si elle n'est pas essentielle à la maintenance du pathogène, Z fait partie du réservoir car elle contribue à la transmission à la cible. En D, 4 populations non cibles doivent être incluses dans le réservoir si sa dynamique globale veut être étudiée. L'élimination de l'infection en U ne va pas conduire à l'élimination de l'infection pour la cible parce que V est une population de maintenance indépendante. Dans le cas E, toutes les populations sont sources. Si W n'est pas nécessaire pour maintenir l'infection, W ne fait pas partie de la communauté de maintenance mais fait partie du réservoir étant une source. F illustre que la cible peut faire partie du réservoir et G que la population cible peut être une population de maintenance (Haydon et al., 2002).

Le statut de réservoir d'une population dépend donc de la prévalence de l'infection, de la maladie induite par l'agent pathogène et des caractéristiques démographiques, écologiques et comportementales des populations (Marsot, 2011).

La connaissance du réservoir suivant un système cible permet d'élaborer un contrôle de l'infection en agissant au niveau de la population cible (prophylaxie médicale et sanitaire, ...), au niveau de la transmission entre la population source et la population cible (prévention contre les vecteurs, ...) ou encore au niveau du réservoir (traitement, vaccination ...) (Haydon *et al.*, 2002).

### 2.3.2. Conditions permettant la constitution d'un réservoir

#### 2.3.2.1. Taux de reproduction de base

Le réservoir doit pouvoir transmettre l'agent pathogène, car il est une source d'infection. Ainsi, la persistance de l'agent pathogène au sein du réservoir doit être suffisante pour que l'agent puisse être transmis à une population cible. La durée de persistance dépend du système étudié, notamment du mode de transmission (Marsot, 2011).

La capacité du réservoir peut être quantifiée par son taux de reproduction de base ou  $R_0$ . En ce qui concerne les microparasites,  $R_0$  se définit comme le nombre de nouvelles infections obtenues à partir d'une unique infection de départ au sein d'une potentielle population hôte ou communauté d'hôtes (Webster *et al.*, 2017).

Pour qu'un hôte ou une communauté soit réservoir,  $R_0$  doit être égal ou supérieur à 1. Pour un hôte de liaison,  $R_0$  est compris entre 0 et 1 et pour un cul de sac épidémiologique,  $R_0=0$  (Fenton *et al.*, 2015). Dans le cas d'une maladie densité-dépendante,  $R_0$  dépend à la fois du taux de transmission entre individus et du nombre d'individus réceptifs présents à un moment donné. Ces deux paramètres interviennent donc dans la capacité d'une population à être réservoir (Lloyd-Smith *et al.*, 2005 ; Payne, 2014).

Dans le cas d'un système multi-hôtes, le  $R_0$  global du pathogène au sein de la communauté d'hôtes dépend des  $R_0$  de chaque espèce hôte (Fenton *et al.*, 2015 ; Webster *et al.*, 2017).



### 2.3.2.2. Facteurs affectant la transmission d'un agent pathogène

A l'échelle de l'individu, les facteurs affectant la transmission d'un agent pathogène sont la ou les voies d'infection, la dose infectante (elle-même conditionnée par la voie d'infection) ainsi que la localisation et la sévérité des lésions (Corner, 2006).

A l'échelle populationnelle, il faut tenir compte de la prévalence, c'est-à-dire du nombre d'individus infectés et aptes à transmettre l'infection au sein de la population ainsi que du nombre d'individus réceptifs. Dans le cas d'un agent multi-hôtes les niveaux de prévalence de chaque population-hôte et les interactions entre chacune d'elles interviennent également (Corner, 2006 ; Nugent, 2011).

### 2.3.3. Taille critique de la population

Comme décrite précédemment, la taille critique d'une population ou taille critique de communauté est celle en dessous de laquelle l'agent pathogène ne peut persister indéfiniment (Haydon *et al.*, 2002 ; Lloyd-Smith *et al.*, 2005). On peut distinguer la valeur seuil de la population nécessaire à l'établissement d'une infection au sein d'une population de la valeur seuil requise pour faire persister cette infection.

Pour un agent multi-hôtes, cette notion est plus complexe du fait de la coexistence de plusieurs populations-hôtes en interaction. Dans ce cas, l'incertitude concernant à la fois le statut de chaque hôte et la valeur seuil de densité de population tend à être amplifiée (Lloyd-Smith *et al.*, 2005).

La détermination de ces valeurs seuil est délicate car la dynamique d'un agent pathogène au sein d'une population dépend de nombreux facteurs trop fluctuants du point de vue épidémiologique pour pouvoir être utilisés. En effet, cette valeur dépend de la structure sociale, spatiale et temporelle des hôtes, de la dynamique de la population, de la relation hôte-pathogène, qui peuvent varier d'une population à une autre et d'un contexte écologique à un autre. De plus, dans le cas de la faune sauvage, les données empiriques sont souvent inconnues (Lloyd-Smith *et al.*, 2005).

### 2.3.4. Notion d'agent pathogène multi-hôte

La majorité des pathogènes peuvent infecter plus d'une seule espèce. Ce sont les pathogènes multi-hôtes (Woolhouse *et al.*, 2001). Ils représentent 62% des pathogènes zoonotiques et 90% des pathogènes affectant les carnivores domestiques (Cleaveland *et al.*, 2001).

Les agents pathogènes multi-hôtes n'ont généralement pas les mêmes effets chez toutes les espèces qu'ils infectent. Cette capacité à s'adapter à un large spectre d'hôte peut être liée aux voies de transmission de l'agent pathogène (Woolhouse *et al.*, 2001). Ces dernières peuvent être scindées en trois catégories : par contact direct, par contact indirect ou par l'intermédiaire d'un vecteur. Selon le mode de transmission du pathogène, les opportunités d'infection de plusieurs espèces sont plus ou moins importantes. En ce qui concerne la transmission vectorielle, le vecteur lui-même détermine s'il y a ou non des opportunités de transmission interspécifique (Woolhouse *et al.*, 2001).

Fenton *et al.* (2005) définissent le statut d'hôte en termes de transmission intra- et inter-spécifique. Il en découle une classification à base de systèmes de propagation multi-hôtes illustrés par deux types d'hôtes ; les hôtes réservoirs et les hôtes de liaison. La notion d'hôte réservoir est utilisée pour faire référence à une espèce pour laquelle l'infection perdure et qui est source d'infection pour l'espèce cible. Les hôtes de liaison (*spillover host*) sont incapables de maintenir seuls, de façon pérenne, l'infection sans source de contamination extérieure à la population mais peuvent transmettre l'agent pathogène à une autre population. Hôtes réservoirs et hôtes de liaison peuvent amplifier l'infection en augmentant rapidement la charge infectieuse sur une zone donnée, ils sont alors qualifiés d'hôtes amplificateurs, ou encore être des hôtes vecteurs spatiaux (permettant l'extension de l'infection dans l'espace) ou vecteurs temporels (permettant l'extension de l'infection dans le temps).

### 2.3.5. Conclusion

Un réservoir peut être constitué au sein de la faune sauvage si les seuils du taux de reproduction de base ( $R_0$ ) ainsi que de la taille critique de la population sont atteints. Les concepts de taux de reproduction de base et de taille critique de population dépendent de la prévalence de l'agent infectant, de la pathogénie induite par cet agent, du comportement de l'hôte ainsi que du contexte écologique. La compréhension des caractéristiques épidémiologiques et cliniques sont nécessaires à l'identification d'un réservoir au sein de la faune sauvage (Palmer, 2013).

Ces concepts théoriques se heurtent cependant à la complexité de systèmes infectieux dans des populations dont il est difficile de connaître avec précision tous les paramètres requis pour évaluer leur statut épidémiologique. La complexité s'accroît dans les systèmes multi-hôtes où plusieurs populations interagissent et peuvent constituer une communauté réservoir (Lloyd-Smith *et al.*, 2005 ; Marsot, 2011 ; Nugent, 2011).

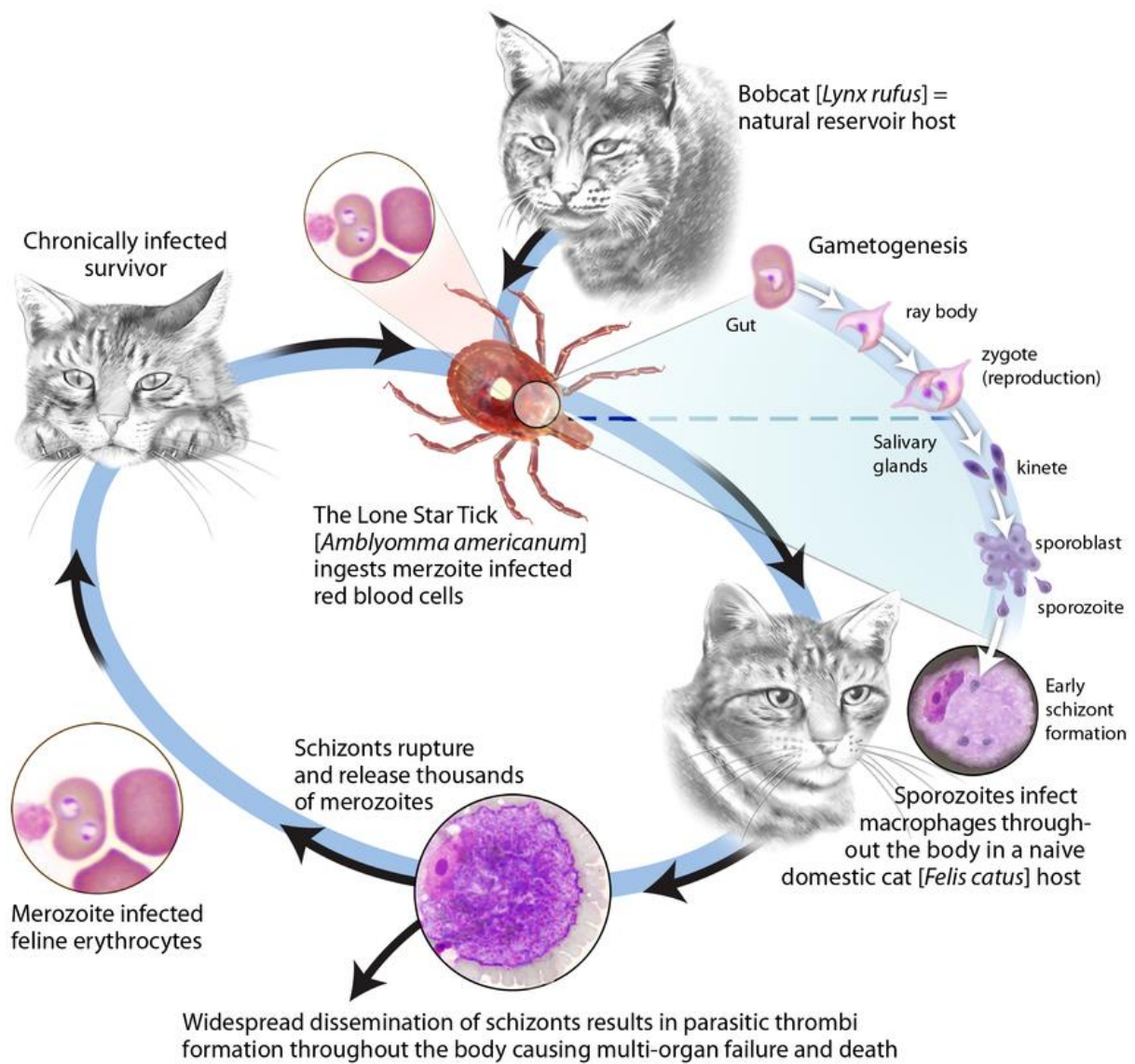
### 2.3.6. *Cytauxzoon felis*

Le lynx (*Lynx rufus*) peut être infecté par *Cytauxzoon felis* par l'intermédiaire d'une tique dure. C'est ce qui a été montré par Blouin *et al.* en 1985. Entre 1982 et 1984, ils ont expérimentalement mis en contact des tiques de l'espèce *Dermacentor variabilis* avec des lynx roux (*Lynx rufus*). Une autopsie de chaque lynx est réalisée à différents temps post exposition avec *Dermacentor variabilis*. Dix lynx présentent des schizontes de *Cytauxzoon felis* onze jours après mise en contact des tiques. Les schizontes sont présents au niveau du foie, des poumons, de la rate et des nœuds lymphatiques. Trente jours après mise en contact avec *Dermacentor variabilis*, les lynx ne présentent plus de schizonte. Ainsi, non seulement le lynx roux (*Lynx rufus*) peut être infesté à partir d'une tique dure mais la phase schizogonale y est courte (d'un maximum de 19 jours).

Blouin *et al.* montrent en 1979 qu'une tique infestée à partir d'un lynx (*Lynx rufus*) peut contaminer un chat domestique (*Felis catus*). L'infection par *Cytauxzoon felis* du chat domestique (*Felis catus*) ou sauvage (*Felis silvestris*) à partir de tiques dures (*Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*) a aussi été démontrée par Reichard *et al.* en 2009.

Ainsi, conditionné par la densité de population, les interactions multi-hôtes et le contexte écologique et démographique, le lynx (*Lynx rufus*) peut être considéré comme un bon candidat comme population réservoir pour *Cytauxzoon felis*.

La Figure 12 reprend les différentes données connues permettant d'établir le cycle de *Cytauxzoon felis*.



**Figure 12 :** Cycle de vie de *Cytauxzoon felis*. La phase tissulaire aiguë (phase de schizogonie) se caractérise par une large dissémination de schizontes qui forment des thrombi parasitaires dans l'intégralité du corps qui résulte en un processus fatal. Les hôtes qui survivent à cette phase tissulaire aiguë développent une érythroparasitémie chronique avec des globules rouges infectés par des mérozoïtes ou piroplasmés (Tarigo et al., 2013).

### 2.3.7. Adaptation au modèle européen

En ce qui concerne le lynx ibérique (*Lynx pardinus*), son rôle en tant que réservoir reste douteux du fait de la faible taille de la population (moins de 300 individus). De plus le seul cas de cytauxzoonose diagnostiqué chez un chat domestique (*Felis catus*) en Espagne était localisé loin de l'habitat du lynx (*Lynx pardinus*). Il est plus probable que le réservoir naturel soit le chat forestier (*Felis silvestris*) qui est présent en plus grand nombre, avec une étendue géographique plus importante qui se recoupe avec les territoires de chats domestiques (*Felis catus*). Bien qu'aucune donnée ne soit disponible sur le chat forestier (*Felis silvestris*) en Espagne, une étude récente rapporte que 19% des chats forestiers (*Felis silvestris*) italiens sont positifs pour une infection par un piroplasma (Veronesi *et al.*, 2016). Ce piroplasma a été identifié par séquençage de 3 amplicons comme appartenant au même groupe que les piroplasma isolés de *Cytauxzoon sp.* en Italie, France et Roumanie ainsi que *Cytauxzoon manul* (Alvarado-Rybak *et al.*, 2016).

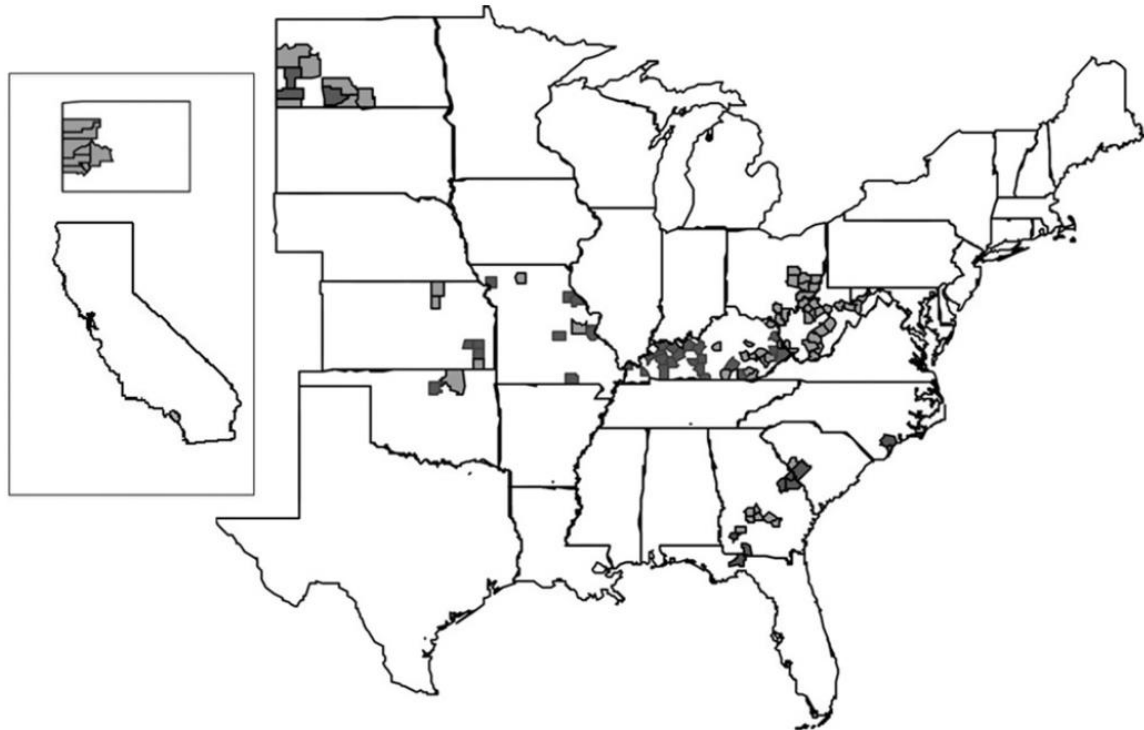
La prédominance d'une érythroparasitémie subclinique est la preuve d'une infection persistante dans la seule zone endémique décrite en Europe ( Carli *et al.*, 2012) chez le chat de rue (*Felis catus*). Ceci supporte l'hypothèse que le chat domestique (*Felis catus*) puisse servir d'hôte réservoir pour cette infection.

## 3. Epidémiologie

### 3.1. Prévalence des cas d'infection par *Cytauxzoon felis*

D'après l'étude de Shock *et al.* (2011) le lynx roux (*Lynx rufus*) est porteur aux Etats-Unis de *Cytauxzoon felis* avec une prévalence de 20%, variable selon les Etats.

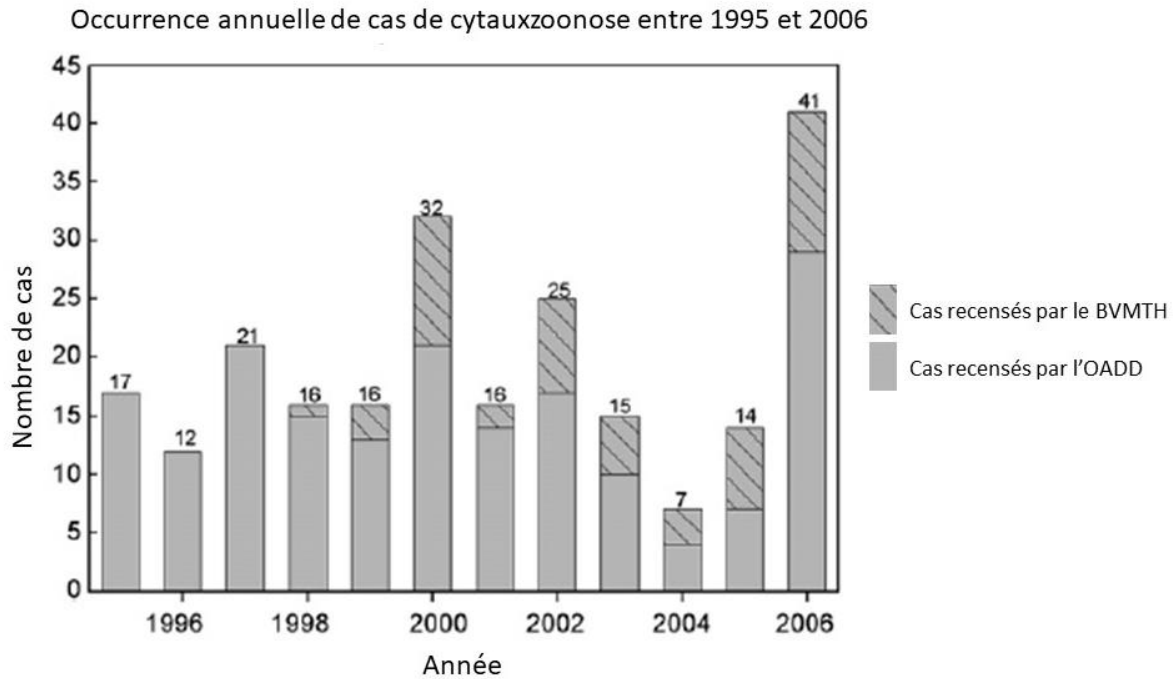
L'étude porte sur 696 lynx roux (*Lynx rufus*), 7 cougars (*Puma concolor*) et 1 serval (*Leptailurus serval*) sur 13 états des Etats-Unis. Parmi les lynx (*Lynx rufus*), 138 soit 20% sont positifs pour une infection à *C. felis*. Aucune différence n'est montrée entre mâles et femelles. La Figure 13 reprend la localisation géographique des individus testés.



**Figure 13 :** Distribution de *Cytosuxoon felis* chez le Lynx (*Lynx rufus*) dans 13 états des Etats-Unis. Pour faciliter la lecture, le Colorado (au-dessus) et la Californie (en-dessous) sont présentés dans l'encart à gauche de la carte. Les zones en gris clair représentent les territoires où les Lynx ont été prélevés. Les zones en gris foncé représentent les territoires où au moins un cas de Lynx positif a été recensé (Shock et al. 2011b).

D'autres félinés sauvages peuvent être porteurs asymptomatiques de *Cytosuxoon felis*. En effet, le puma (*Puma concolor*) est porteur avec une prévalence de 15% dans cette étude limitée toutefois à un faible effectif (7 pumas). Des cas ont aussi été rapportés chez un tigre blanc (*Panthera tigris*) (Garner et al., 1996) et un tigre du Bengal (*Panthera tigris tigris*) (Jakob et al., 1996) et des pumas (*Puma concolor*) au sein de zoos américains (Meinkoth et al., 2005).

Chez le chat domestique (*Felis catus*), Reichard et al. (2008) ont recensé les cas enregistrés à la fois auprès de l'Oklahoma Animal Disease Diagnostic Laboratory (OADDL) et du Boren Veterinary Medical Teaching Hospital (BVMTH) entre 1998 et 2006. Les résultats sont regroupés dans la Figure 14.



**Figure 14** : Nombre total de cas de cytauxzoonose diagnostiqués par l'OADDL ( $n=180$  de 1995 à 2006) et par le BVMTH ( $n=52$  de 1998 à 2006) (Reichard *et al.*, 2008).

### 3.2. Profil de l'animal infecté – Influence du territoire

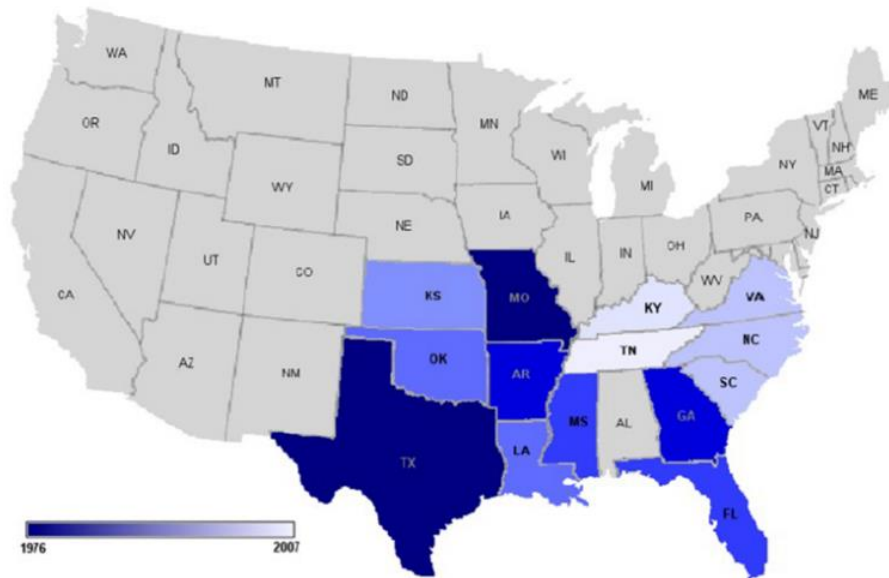
La majorité des cas enregistrés de cytauxzoonose féline sont situés dans les zones rurales à faible densité de population. L'infection est rapportée chez des chats couvrant un territoire s'étendant sur un rayon d'au moins cent mètres autour du domicile. La présence de *Cytauxzoon felis* dépend de la présence du lynx, ce dernier se trouvant principalement dans les zones boisées de montagne (Reichard *et al.*, 2008).

Il n'y a pas de différence entre mâle et femelle chez le lynx (*Lynx rufus*) en termes de prévalence et la maladie touche les chats sans prédisposition d'âge, de sexe ou de race (Reichard *et al.*, 2008).

### 3.3. Répartition géographique

#### 3.3.1. Etats-Unis

Aux Etats-Unis, seule une espèce, *Cytauxzoon felis*, a été identifiée chez le chat domestique (*Felis catus*) dans les Etats du Sud-Est, du Centre-Ouest et de la côte Atlantique (Figure 15).



**Figure 15** : Carte de distribution des cas de cytauxzoonose aux Etats-Unis et évolution sur 31 ans (1976-2007) (Tarigo *et al.*, 2013).

L'activité des tiques varie aussi selon les régions ce qui influe sur la présence du parasite. Elle dépend de la disponibilité en hôtes vertébrés, en végétaux et de l'espèce de tique concernée (Reichard *et al.*, 2008). Une forte densité en *Amblyomma americanum* est associée à une forte prévalence de *Cytauxzoon felis* chez le lynx roux (*Lynx rufus*) alors que cela n'est pas nécessairement le cas pour *Dermacentor variabilis* (Shock *et al.*, 2011).

### 3.3.2. Europe

La première zone endémique d'Europe a été mise en évidence par Carli *et al.* (2012) dans le Nord-Est de l'Italie. En 2016, Veronesi *et al.* étudient la prévalence de *Cytauxzoon sp.* chez les cadavres de chats sauvages (*Felis silvestris*). Le parasite a ainsi été identifié au Centre ainsi qu'au Nord-Est de l'Italie.

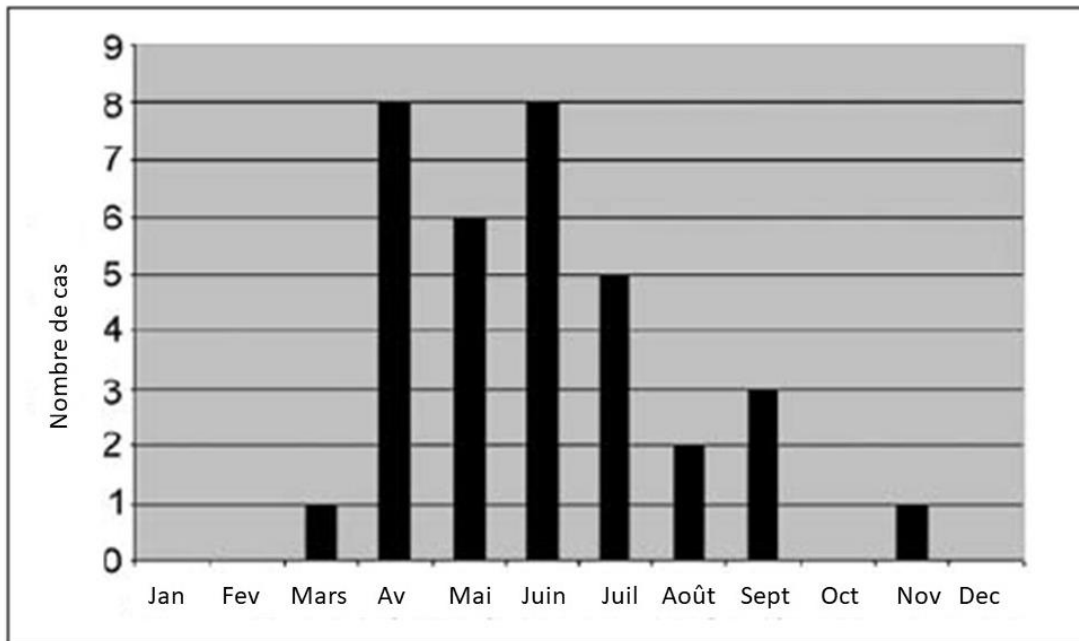
En 2015, un cas de cytauxzoonose a été diagnostiqué chez un chat domestique (*Felis catus*) au Portugal (Alho *et al.*, 2016). Díaz-Regañón *et al.* (2017) ont mis en évidence la présence de *Cytauxzoon sp.* dans le centre de l'Espagne (région de Madrid). Ils réalisent une analyse sur 644 échantillons de chats domestiques (n=506) et sauvages (n= 138). La prévalence de l'infection est de 1,2% sur l'ensemble des échantillons.

En France, un cas de babésiose féline a été décrit en 1992 (Léger *et al.*, 1992) mais l'ADN du parasite a été pour la première fois mis en évidence en 2009 au cours d'une étude regroupant 116 chats sur l'ensemble du territoire français. Parmi eux, un seul chat présentait de l'ADN de *Cytauxzoon sp.* dans le sang soit une prévalence de 0,8% (Criado *et al.*, 2009). Depuis, un cas a été diagnostiqué en 2014 dans le département de Côte d'Or (Legroux *et al.*, 2017).



### 3.4. Saisonnalité

Le plus grand nombre de cas est rapporté en avril, mai et juin. On constate un second pic, plus petit, en août et septembre (Figure 16). Etant donné que le lynx est actif toute l'année et que les tiques ont une activité saisonnière, les différences rapportées dans les cas de cytauxzoonose féline sont donc le reflet des variations climatiques et du cycle d'activité annuel du vecteur (Reichard *et al.*, 2008).



**Figure 16 :** Nombre de chats dans les Etats du Sud-Sud-Est chez lesquels une infection à *Cytauxzoon felis* a été diagnostiquée par le NCSU-VBDDL ou par les laboratoires d'Etat de diagnostic animal à chaque mois de l'année de mai 1998 à juin 2004. Durant cette période, 34 chats sont identifiés (Birkenheuer *et al.*, 2006).

## 4. Pathogénie et expression clinique chez le chat domestique

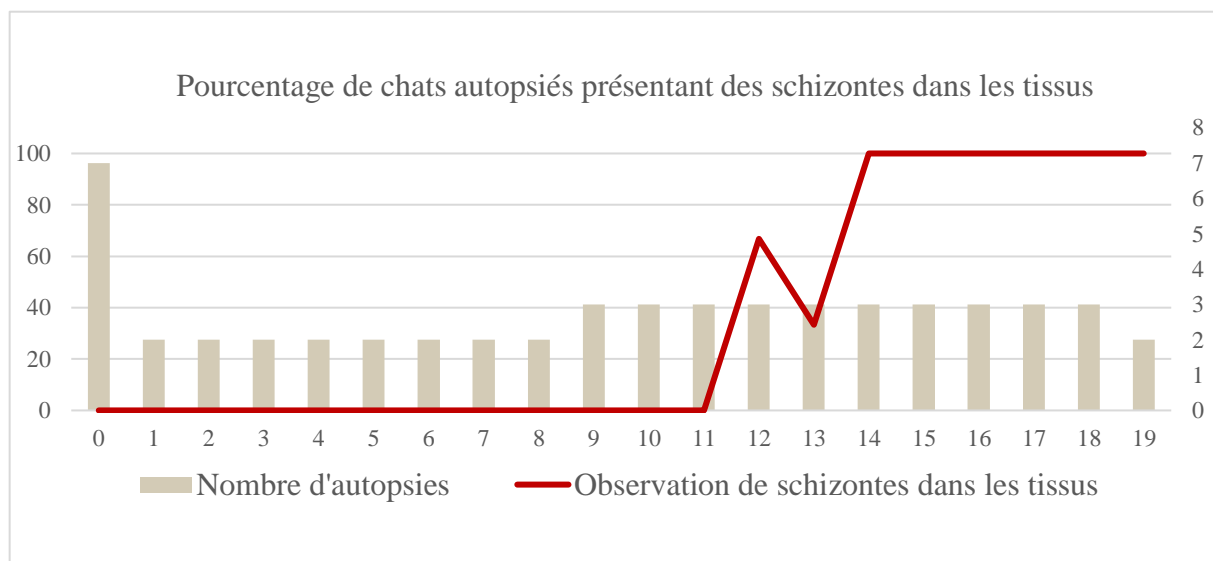
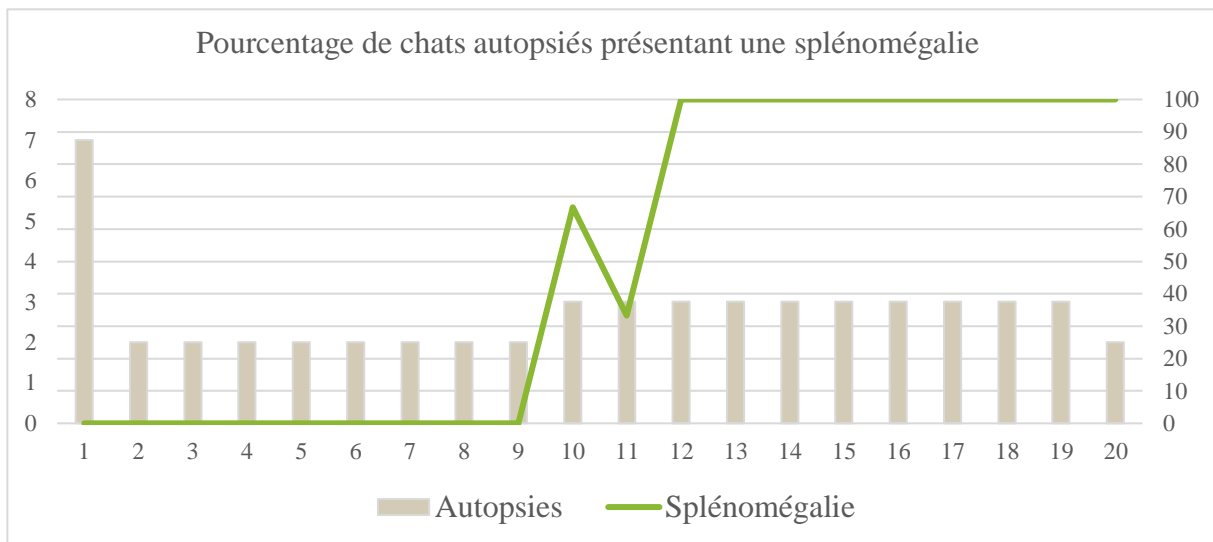
**Pathogénie :** Étude du processus par lequel une cause pathogène agit sur l'organisme et détermine une maladie.

**Pathogénicité :** Pouvoir pathogène, capacité (d'un agent infectieux) de causer une maladie.

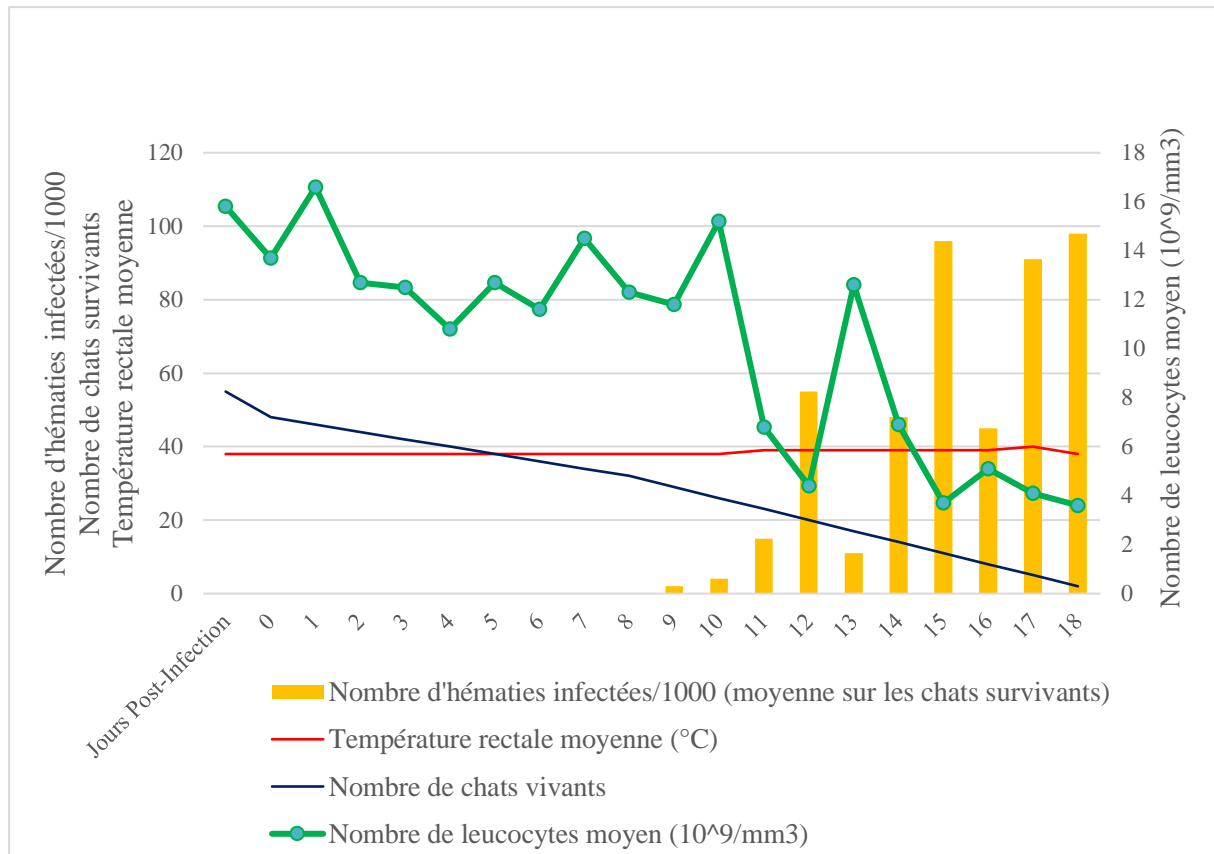
#### 4.1. Infection expérimentale par *Cytauxzoon felis*

Kier *et al.* (1987) ont décrit la pathogénie du parasite en infectant expérimentalement 55 chats. Les chats sont tous infectés avec un inoculum de *Cytauxzoon felis*. L'inoculum correspond à une « dose létale minimum » standardisée déterminée par Wagner *et al.* (1980).

Dans les études précédentes, avec cet inoculum, les chats adultes décédaient entre 16 et 22 jours post-inoculation. Deux à trois chats sont euthanasiés chaque jour, du jour 1 (J1) au jour 19 (J19) post-inoculation. Les résultats sont représentés dans les figures 17 et 18.



**Figure 17 :** Représentation des résultats de l'étude réalisée par Krier *et al.* (1987)



**Figure 18** : Signes observés lors de l'étude de Kier et al. (1987).

*Des parasites pléomorphes intra-érythrocytaires sont observés chez certains chats infectés à partir du jour 10 post-infection (ou J10) puis les organismes deviennent de plus en plus nombreux par la suite. La quantité la plus importante d'hématies infectées pour 1000 cellules est observée chez un chat à J19 post-infection. Chez les chats infectés, le nombre de leucocytes décroît progressivement et ce particulièrement après J14 post-infection.*

Le schizonte, présent lors de la phase tissulaire, a été décrit au sein des histiocytes, des cellules réticuloendothéliales, des cellules endothéliales et des macrophages (Kier *et al.*, 1987). Ils sont mis en évidence à partir du jour 11 post-infection. La taille des rates dans le groupe de contrôle varie de 1,5 par 4,2 centimètres à 2,3 par 6,1 centimètres avec une moyenne de 1,9 par 5,2 centimètres. Les chats inoculés avec du *Cytauxzoon felis* présentent des rates de plus grande taille que les chats du groupe contrôle après le jour 8 post-infection (associées des bords arrondis et bigarrés).

De plus, apparaît une adénomégalie généralisée et un œdème après le jour 12 post-infection. Les nœuds lymphatiques mésentériques et poplités (vers le lieu d'inoculation) apparaissent majoritairement de taille augmentée et œdématisés dès le jour 2 post-infection et deviennent progressivement plus œdématisés.

Une polyadénomégalie s'installe jusqu'à ce que les nœuds lymphatiques atteignent une taille trois fois supérieure à celle des chats témoins au jour 19 post-infection. Un œdème extensif et une congestion des poumons apparaissent à partir du jour 15 post-infection. Quatre chats euthanasiés après le jour 15 post-infection ont présenté des pétéchies sur les séreuses. Dans la même période, la taille du foie devient progressivement augmentée avec des bords arrondis et une apparence bigarrée. On note que les reins sont œdématiés à partir du jour 15 post-infection.

Une distension progressive des veines est observée après J15, notamment les veines rénales, mésentériques et la veine cave postérieure. Les vaisseaux présentent un diamètre trois fois supérieur à ceux des chats témoins à J19 post-infection. On observe une légère dilatation et un amincissement de la paroi du ventricule droit chez les chats euthanasiés à J18 et J19. L'apex de chacun de ces chats est déformé (arrondi). Un épanchement péricardique (environ 25 millilitres d'un liquide séro-hémorragique) est observé chez un chat euthanasié à J19. Des pétéchies sont observées sur le péricarde de ce chat ainsi que chez un chat euthanasié à J17.

#### 4.2. Infection naturelle par *Cytauxzoon felis* (Etats-Unis)

Birkenheuer *et al.* (2006) ont étudié des cas de cytauxzoonose diagnostiqués entre 1998 et 2004 aux Etats-Unis. Pour qu'un chat soit intégré à l'étude, il est nécessaire qu'il y ait détection de schizontes au sein des macrophages à l'examen des tissus ou de mérozoïtes au sein des érythrocytes à l'examen du frottis sanguin. Notons que sans analyse moléculaire, *Cytauxzoon felis* ne peut être différencié de *Babesia felis* lors de la phase intra-érythrocytaire. Cependant, *Babesia felis* n'ayant jamais été identifié aux Etats-Unis, il a été considéré comme improbable qu'il soit la cause de la maladie de ces chats. 34 chats ont ainsi été inclus dans l'étude.

Les résultats des examens hématologiques et biochimiques obtenus à partir de la consultation des dossiers médicaux de 12 des chats participant à l'étude sont représentés dans le Tableau II.

**Tableau II :** Résultats des examens hématologiques et biochimiques de 12 chats atteints de cytauxzoonose. Les dossiers médicaux révèlent une anémie hémolytique due au fait de l'hyperbilirubinémie associée à un faible hémocrite, une leucopénie, une thrombopénie et une hyperglycémie.

	Hématocrite (%) (n=11)	Leucocytes (cellules/ $\mu$ L) (n=11)	Plaquettes (K/ $\mu$ L) (n=9)	Bilirubinémie (mg/dL) (n=7)	Glycémie (mg/dL) (n=9)	Urémie (mg/dL) (n=7)
<i>Moyenne</i>	24 $\pm$ 5,5	3900 $\pm$ 2600	43,1 $\pm$ 30,2	4,6 $\pm$ 3,7	181 $\pm$ 38	40,3 $\pm$ 24,4
<i>Valeurs usuelles</i>	[ 31 ; 50 ]	[ 5400 ; 23600 ]	[ 300 ; 800 ]	[ 0 ; 0,5 ]	[ 63 ; 150 ]	[ 15 ; 35 ]

A l'issue de cette étude, 32 chats sont décédés ou ont été euthanasiés du fait de leur état clinique. Dix d'entre eux ont été autopsiés. Les autopsies ont révélé la présence d'un ictère (7/10), d'une splénomégalie (5/10) et de lymphadénopathies (5/10).

Des analyses histologiques ont été effectuées sur 19 chats. Ils présentaient des schizontes dans la petite vascularisation hépatique (18/19) ainsi que dans la vascularisation pulmonaire (16/19), la rate (14/19), les reins (13/19) et le parenchyme pulmonaire (11/19).

De plus, la présence du parasite au niveau du tissu cérébral peut entraîner des ischémies à l'origine de la nécrose du parenchyme (Clarke *et al.*, 2017; Clarke *et al.*, 2015).

### 4.3. Cas d'infection à *Cytauxzoon sp.* en Europe

#### 4.3.1. En France

En 2014, un cas de d'infection par *Cytauxzoon sp.* est diagnostiqué en France chez un chat domestique (*Felis catus*) vivant dans une zone rurale du Département de la Côte d'Or à Saint Sauveur (47°48'N, 6°23'E). Les premiers signes cliniques sont une hyperthermie (41°C), une léthargie et une anorexie associées à une perte de poids et une déshydratation. Une antibiothérapie à base d'amoxicilline et d'acide clavulanique (15mg/kg PO BID 10 jours) est mise en place. Quinze jours plus tard (J0), l'état du patient se dégrade avec l'apparition d'une diarrhée hémorragique, de douleurs abdominales et d'un hématome sous-cutané au niveau de l'abdomen. L'antibiothérapie est alors prolongée avec de la marbofloxacin (2mg/kg PO SID 10 jours) accompagnée d'un traitement anti-inflammatoire (meloxicam 0.05mg/kg PO SID 5 jours et carprofène 4mg/kg SC). Devant l'inefficacité des traitements mis en place et l'apparition d'une stomatite et de vomissements, des examens complémentaires sont réalisés à J7.

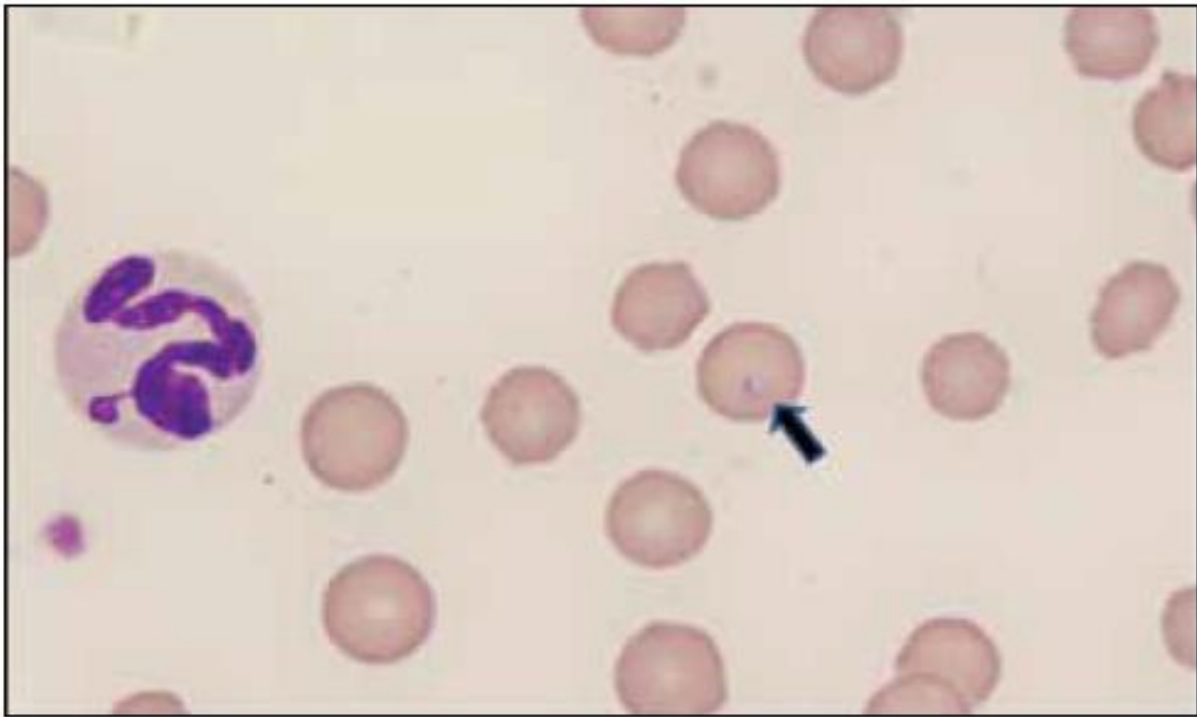
Le bilan sanguin met en évidence une leucocytose neutrophilique associée à la visualisation de corps de Döhle au sein du cytoplasme des neutrophiles ainsi qu'une hypertriglycémie marquée (7,2mmol/L ; VU < 1,7mmol/L). L'échographie abdominale révèle une splénomégalie. Le test FeLV-FIV (Witness®, Synbiotics corp.) est négatif. L'animal est hospitalisé sous citrate de maropitant à 1mg/kg SC et amoxicilline 15mg/kg SC. A J9, seule l'anorexie persiste. Le patient est remis à ses propriétaires sous amoxicilline (Duphamox LA®, 15mg/kg SC 1 jour sur 2 pendant 1 semaine). A J18, alors que l'anorexie persiste, le frottis sanguin met en évidence des inclusions érythrocytaires. Plusieurs analyses PCR sont réalisées qui reviennent positives pour *Babesia/Theileria spp.*. Les épisodes de vomissement et d'hyperthermie reprennent à J29. A J38, le séquençage réalisé suite à l'analyse PCR indique qu'il s'agit de *Cytauxzoon sp.*. Un traitement à base d'imidocarbe est alors mis en place (dipropionate d'imidocarbe 3,5mg/kg SC). Les signes cliniques régressent et l'état général de l'animal s'améliore. Le bilan sanguin (numération-formule sanguine, urée, créatinine, ALAT) est dans les valeurs de référence à J46. A J55, le chat présente un bon état général et le frottis sanguin ne révèle aucune inclusion érythrocytaire mais à J72, une hyperthermie associée à une léthargie, une anorexie et une stomatite sont diagnostiquées. L'analyse PCR confirme la présence de *Cytauxzoon sp.* dans le sang. Les autres examens complémentaires réalisés (radiographie thoracique, radiographie dentaire, PCR calicivirus et herpesvirus félin sur prélèvement buccal) ne montrent aucune anomalie. Le traitement à base d'imidocarbe (dipropionate d'imidocarbe 3,5mg/kg SC) est renouvelé. A J78, l'état clinique de l'animal s'améliore. Quelques jours plus tard, le chat décède à la suite d'un accident de la voie publique. Une autopsie permet des prélèvements histologiques de foie, rein, rate, nœuds lymphatiques iliaques, poumons et médulla. Des analyses PCR sont réalisées sur les poumons, la rate et la moelle osseuse.

A noter la description d'un autre cas potentiel d'infection à *Cytauxzoon sp.* décrit dans les années 80 en Haute-Saône (Léger *et al.*, 1992) , mais faiblement documenté.

#### 4.3.2. En Italie

En octobre 2009, 2 cas d'infection à *Cytauxzoon sp.* sont diagnostiqués chez des chats domestiques (race *European shorthair*) mâles originaires de la même fratrie en Italie centrale (Figure 20) (Carli *et al.*, 2014). Cette région présente une forte densité de tiques.

Le chat no.1 présente une légère anémie non régénérative ainsi qu'une légère leucocytose, monocytose et thrombocytose. Des inclusions intra-érythrocytaires sont observées (Figure 19).



**Figure 19 :** Parasite *Cytospora sp.* Au sein d'un érythrocyte (flèche) chez le chat no.1 au frottis sanguin par la technique de Wright modifiée (Aerospray slide stainer 7120 Delcon®, 1000x). *Cytospora sp.* apparaît comme une inclusion de 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre circulaire à ovale avec un noyau basophile excentré et un cytoplasme légèrement basophile.

Une analyse PCR suivie d'un séquençage ADN sont réalisés. La séquence ADN obtenue est identique à 99% aux séquences de *Cytospora sp.* enregistrées dans la base de données GenBank®. L'identification la plus proche correspond aux séquences enregistrées en Italie (Carli *et al.*, 2012), Espagne (Díaz-Regañón *et al.*, 2017), France (Legroux *et al.*, 2017) et Mongolie (Reichard *et al.*, 2005a). Cependant, la correspondance avec *Cytospora felis* n'est que de 93%. Les autres recherches de parasites (*Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*, *Bartonella henselae* et *Leishmania infantum*) ainsi que les test sérologiques FIV/FeLV sont négatifs.

Un traitement à base de doxycycline (Vibravet, Pfizer, New York, USA, 10 mg/kg/ q12h PO 3 semaines) est mis en place suite à la visualisation des inclusions intra-érythrocytaires. Après confirmation de cytosporose par l'analyse PCR et le séquençage, un traitement à base d'imidocarbe dipropionate est instauré (Carbesia®, 5 mg/kg IM à 2 semaines d'intervalle). Le chat est suivi (numération-formule sanguine, analyse biochimique et électrophorèse des protéines) pendant 175 jours. Deux semaines suivant la dernière injection d'imidocarbe dipropionate, *Cytospora sp.* n'est plus détecté au frottis sanguin, ni à l'analyse PCR.

Cependant, à J57, l'état clinique du chat se dégrade. Il présente une léthargie, une anorexie et une leucopénie sévère. *Cytauxzoon sp.* n'est pas identifié (frottis sanguin et PCR) mais une infection à parvovirus est mise en évidence par analyse PCR. Une antibiothérapie et une fluidothérapie sont mises en place. Les signes cliniques régressent.

Le chat no.2 présente lui aussi une diarrhée et les analyses sanguines confirment la présence de *Cytauxzoon sp.*. Il présente une parasitémie légère ainsi qu'une leucocytose associée à une neutrophilie, une monocytose et une thrombocytose. Le traitement à base de doxycycline (10 mg/kg PO SID) est arrêté par le propriétaire au bout d'une semaine. Ensuite, l'animal reçoit 2 injections d'imidocarbe dipropionate (5 mg/kg IM) à 2 semaines d'intervalle. A J130 on note uniquement une légère érythrocytose. Les autres paramètres sanguins sont dans les normes et le chat ne présente plus aucun signe clinique.

L'un des 2 chats semble s'être débarrassé de l'infection tandis que le second présente une érythroparasitémie persistante ce qui suggère un rôle de réservoir du chat domestique (*Felis catus*) en tant qu'hôte intermédiaire dans le cycle de vie du parasite (Carli *et al.*, 2014).

De plus, Carli *et al.* (2012) décrivent pour la première fois une zone endémique à *Cytauxzoon sp.* en Italie, dans la région de Trieste où la présence du lynx boréal (*Lynx lynx*) est rapportée (Molinari *et al.*, 2012). Ainsi, trois cas d'infection à *Cytauxzoon sp.* ont été identifiés par frottis sanguin, analyse PCR et séquençage ADN. L'anamnèse, les commémoratifs, l'examen clinique et les analyses biologiques comprenant une numération-formule sanguine, un profil biochimique, une électrophorèse des protéines, un profil d'hémostase, une analyse d'urine ainsi que les traitements médicaux administrés et le suivi de l'évolution sont enregistrés et analysés. Des tests rapides FIV/FeLV sont aussi réalisés.

A partir des données récoltées sur ces 3 cas cliniques, Carli *et al.* (2012) mettent en place une étude épidémiologique concernant des chats de rue (*Felis catus*) (n=63) et des chats domestiques (*Felis catus*) (n=52). Soit un total de 118 chats étudiés avec les 3 cas cliniques. Les chats des deux groupes sont tous localisés dans la ville de Trieste en Italie. L'infection à *Cytauxzoon sp.* est diagnostiquée par amplification PCR du gène rARN 18S chez 23% des individus (27/118) et par frottis sanguin chez 15% des individus (18/118).

Les séquences rARN 18S obtenues sont identiques à 99% avec les séquences déposées sur GenBank® à partir des études réalisées en Espagne (Díaz-Regañón *et al.*, 2017), France (Criado-Fornelio *et al.*, 2009) et Mongolie (Reichard *et al.*, 2005a).



L'érythroparasitémie est principalement observée chez des chats (*Felis catus*) ne présentant pas de signe clinique. La prédominance d'érythroparasitémie subclinique et la mise en évidence d'une infection persistante supporte l'hypothèse comme quoi le chat domestique (*Felis catus*) pourrait jouer le rôle de réservoir de l'infection à *Cytauxzoon sp.*

Ainsi, l'infection à *Cytauxzoon sp.* est présente au Nord-Est de l'Italie (Carli *et al.*, 2012) et en Italie centrale (Carli *et al.*, 2014) chez le chat domestique (*Felis catus*) comme représenté sur la Figure 20.



**Figure 20 :** Localisation géographique d'Acquapendente (42°44'41"N, 11°51'54"E, Viterbo) (point bleu) en Italie centrale où les chats no.1 et no.2 sont nés et ont vécu jusqu'à leur adoption. Localisation géographique de Trieste (point rouge) où une zone endémique de *Cytauxzoon sp.* a été décrite (Carli *et al.*, 2014).

#### 4.3.3. Au Portugal

En février 2015, un chat mâle entier de 2 ans est présenté au centre hospitalier vétérinaire de Lisbonne pour léthargie, anorexie et hyperthermie. Ce chat ne présente aucun antécédent médical. A l'examen clinique, sont diagnostiquées une tachycardie, une dyspnée et une tachypnée. Les muqueuses sont pâles, le temps de recoloration capillaire supérieur à 2 secondes et la température rectale est de 40,0°C.

La numération-formule sanguine révèle une anémie sévère ainsi qu'une leucocytose et une thrombopénie. Aucune inclusion intra-érythrocytaire n'est observée au frottis sanguin. L'analyse biochimique montre une azotémie et une hyperbilirubinémie. Les tests sérologiques FIV/FeLV sont négatifs. Des radiographies thoraciques associées à une échographie abdominale mettent en évidence un épanchement pleural, un épanchement abdominal et une splénomégalie. L'analyse des liquides pleural et abdominal est compatible avec un exsudat non septique.

L'animal est hospitalisé et placé sous fluidothérapie et oxygénothérapie. Une antibiothérapie à base de ceftriazone (25 mg/kg IV BID) et doxycycline (10mg/kg PO SID) est réalisée. Du midazolam est administré dans le but d'améliorer l'appétit (0,2mg/kg IM SID). Etant donné l'anémie sévère, une transfusion à base de concentré érythrocytaire est réalisée.

La recherche des parasites du genre *Mycoplasma*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia* par analyse PCR revient négative mais les résultats sont positifs en ce qui concerne les Piroplasmidés (*Babesia*, *Cytauxzoon*, *Theileria*). La recherche dans la base de données GenBank® montre 99,9% de similitudes avec les séquences de *C. manul* (Reichard *et al.*, 2005), 100% de similitudes avec les séquences de *Cytauxzoon sp.* enregistrées en Italie (Carli *et al.*, 2014) et 99,9% avec les séquences provenant d'Espagne (Díaz-Regañón *et al.*, 2017) et France (Criado-Fornelio *et al.*, 2009).

#### 4.3.4. En Espagne

Entre septembre 2005 et décembre 2008, une étude est réalisée sur 644 chats en partenariat avec le centre hospitalier vétérinaire de l'université de Madrid, trois cliniques vétérinaires privées et cinq associations de protection animale sur la région de Madrid (Díaz-Regañón *et al.*, 2017). Les prélèvements de sang sont analysés par PCR afin de déterminer la présence de *Hepatozoon sp.* ou *Cytauxzoon sp.*

Parmi les 644 chats, l'ADN de *Cytauxzoon sp.* est identifié chez 8 chats soit une prévalence de 1,2%. Le séquençage de cet ADN montre entre 99 et 100% de similitudes avec les séquences enregistrées en France (Criado-Fornelio *et al.*, 2009), en Mongolie (Reichard *et al.*, 2005b) et en Espagne (Barandika *et al.*, 2016). Les résultats de l'étude n'ont cependant pas permis d'établir les caractéristiques cliniques de la maladie.

#### 4.3.5. En Suisse

Nentwig *et al.* (2018) décrivent les cas de 5 individus : 3 chatons de 2 mois (individus 1 à 3) et 2 chats adultes (race *European shorthair*) (individus 4 et 5).

Les 3 chatons sont présentés avec une anémie régénérative légère à modérée accompagnée d'inclusions intra-érythrocytaires observables au frottis sanguin. La présence de *Cytauxzoon sp.* est confirmée par PCR et séquençage ADN. Les chatons ne présentent plus aucun signe clinique ou hématologique après la mise en place d'une transfusion et/ou d'un traitement à base d'azithromycine et atovaquone. Néanmoins, l'érythroparasitémie persiste (Nentwig *et al.*, 2018).

L'individu 4 présente une anémie non régénérative sévère. L'individu 5, en bon état clinique, est utilisé comme donneur de sang pour l'individu 4. A la suite de la transfusion, l'individu 4 montre au frottis sanguin des inclusions intra-érythrocytaires. De plus, l'infection par *Cytauxzoon sp.* est confirmée chez les individus 4 et 5 par analyse PCR et séquençage. L'individu 4 présente une rémission clinique et hématologique à la suite d'un traitement à base d'azithromycine (10 mg/kg PO SID 26 jours), atovaquone (15 mg/kg PO TID 11 jours) et de molécules à action immunosuppressive (prednisolone, 2 mg/kg/j et cyclosporine, 5 mg/kg/j, à dose décroissante sur 2 mois). Huit mois plus tard, l'individu 4 présente à nouveau une anémie mais la PCR est négative concernant *Cytauxzoon sp.* (Nentwig *et al.*, 2018).

Le séquençage de l'ADN isolé à partir des cas 1 à 5 montre une identité de la souche de 99% avec les autres cas décrits en Europe. L'analyse phylogénétique montre que la souche isolée est très proche des souches mises en évidence chez les chats domestiques et sauvages en France, Espagne et Roumanie ainsi qu'avec *Cytauxzoon manul*, mis en évidence chez le Chat de Pallas (*Otocolobus manul*) (Nentwig *et al.*, 2018).

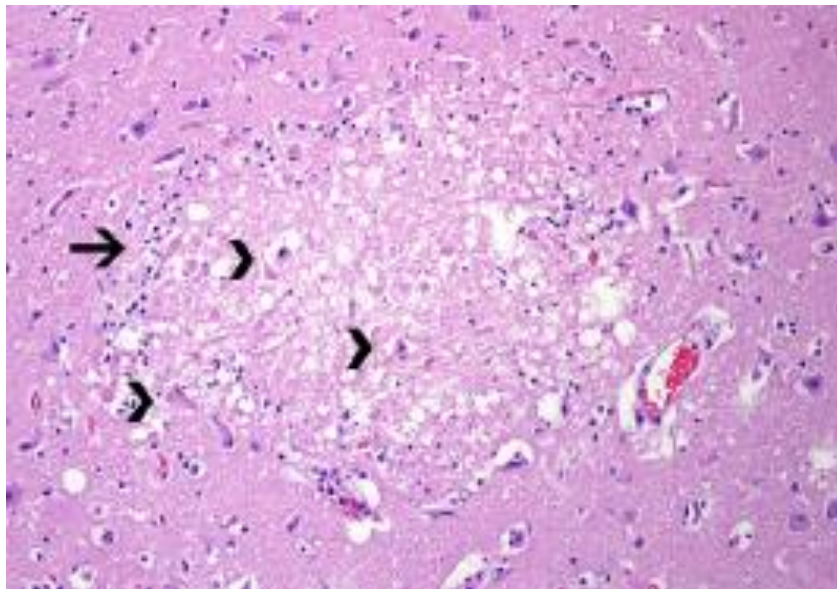
L'ensemble des cas recensés d'infection à *Cytauxzoon sp.* en Europe est représenté sur la Figure 21 et les caractéristiques cliniques et diagnostiques des différents cas cliniques étudiés sont regroupées dans le Tableau III.



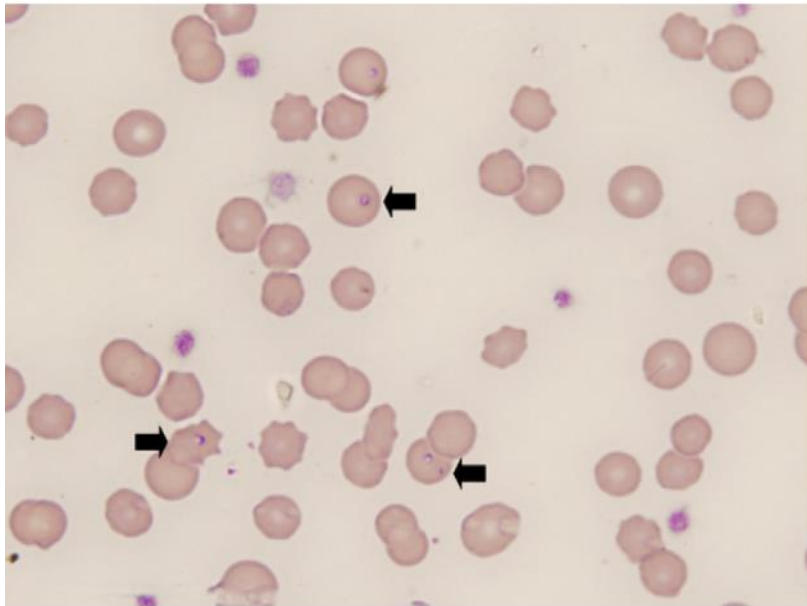
**Figure 21 :** Carte de l'Europe indiquant la localisation géographique des cas publiés d'infection à *Cytauxzoon* sp. chez les chats (*Felis catus*) et les lynx (*Lynx* sp.) représentés respectivement par des points et des étoiles. Deux cas décrits de chats domestiques (*Felis catus*) pour lesquels la localisation au sein du pays n'était pas précisée sont indiqués au niveau de la capitale du pays en question par des cercles vides. Abréviations : PRT, Portugal ; ESP, Espagne ; FRA, France ; CH, Suisse ; ITA, Italie ; ROU, Roumanie. (Nentwig et al. 2018).

**Tableau III :** Synthèse des signes cliniques et paracliniques observables lors d'une infestation par *Cytauxzoon sp.*.

<b>Signes cliniques</b>	Hyperthermie Anorexie Apathie Muqueuses pâles Ictère Polyadénomégalie Tachypnée, dyspnée voire détresse respiratoire Troubles nerveux (Figure 22)
<b>Imagerie (échographie et/ou radiographie)</b>	Splénomégalie Hépatomégalie Poumons : opacité interstitielle et/ou alvéolaire Epanchement pleural
<b>Paramètres biologiques</b>	Anémie Inclusions intra-érythrocytaires (Figure 23) Thrombopénie Leucopénie : neutropénie, lymphopénie Hyperbilirubinémie Hypoprotéinémie Hypocalcémie Hyperglycémie



**Figure 22 :** Thalamus, zone de nécrose neuronale au sein de la matière grise (au centre) accompagnée d'un processus de vacuolisation et de perte de matière grise (Hemalun Eosine, x100) (Clarke et al., 2015).



**Figure 23** : Frottis sanguin montrant des parasites *Cytauxzoon sp.* en position intra-érythrocytaire (Giemsa, x1000) (Sherrill *et al.*, 2015).

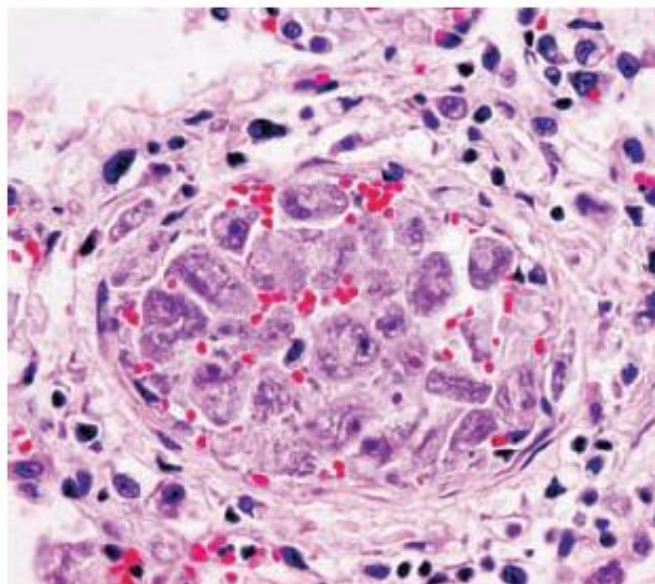
## 5. Diagnostic

### 5.1. Cytologie, hématologie

Sur frottis sanguin, on observe des inclusions intra-érythrocytaires (Figure 24) après coloration de type Giesma (Sherrill *et al.*, 2015). Les piroplasmes de *Cytauxzoon felis* sont communément décrit en « chevalière » ; la chromatine est périphérique avec la présence de cytoplasme en faible quantité au centre. Ils peuvent aussi se présenter sous une forme ovale bipolaire avec la présence de corps anaplasmoïdes ou encore en forme de tétrade. Typiquement, le diamètre varie de 0,2 à 2,5  $\mu\text{m}$  (Sherrill *et al.*, 2015). C'est une technique peu chère mais qui a plusieurs inconvénients. En effet, la simple observation d'inclusions intra-érythrocytaires ne permet pas d'établir un diagnostic étiologique précis ; une confusion est possible avec *Babesia sp.* ou *Theileria sp.*. De plus, si le frottis sanguin est réalisé trop précocement, il est possible de ne pas observer de parasite car en nombre encore trop insuffisants dans le tissu sanguin (Meinkoth *et al.*, 2005).

### 5.2. Histologie

Le diagnostic histologique consiste en une identification des schizontes dans les macrophages intravasculaires à partir de biopsies du foie et/ou de la rate et/ou des poumons (Figure 24).



**Figure 24** : Occlusion vasculaire secondaire à une infiltration des macrophages par *Cytauxzoon felis*. Une veine pulmonaire de taille moyenne est distendue et presque complètement obstruée par une grande quantité de monocytes fortement élargis par la présence de schizontes (Sherrill *et al.*, 2015).

### 5.3. Biologie moléculaire

Le diagnostic de certitude est établi par amplification génique par la technique PCR.

Classiquement, l'analyse PCR se base sur la recherche de l'ARN ribosomal 18S. Schreeg *et al.* (2016) font l'hypothèse d'une sensibilité supérieure de l'analyse PCR par la recherche de l'ADN mitochondrial du cytochrome c sous-unité III (cox3). Ils démontrent non seulement une plus grande sensibilité du test en début d'infection mais aussi un nombre de copies de cox3 augmenté par rapport à l'ARN ribosomal 18S à la fois dans les échantillons de sang et de tissus d'animaux infectés. De plus, la PCR ciblée sur cox3 peut détecter jusqu'à une seule copie d'ADN et ce au sein d'échantillons présentant une hétérogénéité des séquences mitochondriales (Schreeg *et al.*, 2016).

### 5.4. Examen nécropsique

Du fait de la survenue rapide de la mort, les chats sont en général en bonne condition physique. Les muqueuses sont pâles et ictériques. La plupart des animaux présentent une splénomégalie, des nœuds lymphatiques hypertrophiés et des poumons congestionnés et œdématisés. On retrouve des ecchymoses et des pétéchies dans de nombreux tissus dont les poumons, la vessie, les reins, le cœur et les méninges. Les veines abdominales ont un diamètre augmenté. On retrouve un épanchement pleural, péricardique ou abdominal chez certains animaux (Meinkoth *et al.*, 2005).

## 6. Traitement et pronostic

### 6.1. Traitement de soutien

L'efficacité et l'utilité d'un traitement de soutien n'ont pas été démontré. Les recommandations sont davantage basées sur l'expérience personnelle des auteurs.

#### 6.1.1. Fluidothérapie

Il est conseillé de réaliser une supplémentation en potassium adaptée aux besoins pour permettre une bonne fluidothérapie et ainsi corriger la déshydratation et les pertes potentielles. Une fluidothérapie agressive est à proscrire pour éviter d'aggraver la pneumonie et l'œdème potentiellement présents.

Bien que l'utilisation de soluté hépariné ou de traitement contre la déshydratation intracellulaire soit controversée, les auteurs ont souvent mis en place ces mesures ainsi que des transfusions de plasma lorsque des anomalies de la coagulation sont observées. Chez les chats atteints d'anémie chronique, il est possible de réaliser une transfusion de sang total ou d'hématies (Sherrill *et al.*, 2015).

#### 6.1.2. Analgésie

Les chats atteints de cytauxzoonose semblent souvent être douloureux, l'utilisation d'un analgésique tel que la buprénorphine est alors indiquée (Sherrill *et al.*, 2015).

#### 6.1.3. Oxygénothérapie

Chez les chats présentant une détresse respiratoire ou une tachypnée, la supplémentation en oxygène est indiquée. La thoracocentèse peut être réalisée dans le cas d'épanchement pulmonaire (Sherrill *et al.*, 2015).

#### 6.1.4. Alimentation

La mise en place d'une sonde naso-oesophagienne permet une alimentation entérale et limite le stress. De plus, bien que les vomissements ne soient pas un symptôme classique de la cytauxzoonose, du maropitant peut être administré chez les chats présentant des vomissements ou de l'hypersalivation (Sherrill *et al.*, 2015).



## 6.2. Traitement spécifique : atovaquone et azithromycine

L'azithromycine est un antibiotique de la famille des macrolides qui cible les ribosomes mitochondriaux du parasite alors que l'atovaquone, un analogue de l'ubiquinone, cible le cytochrome b, désorganisant le transport d'électrons dans la mitochondrie du parasite (Schreeg *et al.*, 2013).

Cohn *et al.* (2011) ont comparé l'efficacité de l'imidocarbe, traitement classiquement utilisé sur les babésies, par rapport à une association d'atovaquone et d'azithromycine. Les résultats sont présentés dans les Tableaux IV et V.

**Tableau IV** : Premiers résultats de Cohn *et al.* (2011) chez les chats infectés par *Cytauxzoon felis* et traités avec l'association d'atovaquone et azithromycine ou avec de l'imidocarbe (Cohn *et al.*, 2011).

	Tous les chats	A&A	Imidocarbe
<b>Hématocrite (%)</b>	25,5 ± 5,9 (74)	25,95 ± 6,3 (49)	24,3 ± 4,5 (25)
<b>Leucocytes (10<sup>3</sup>/μL)</b>	5,1 ± 2,8 (73)	5,26 ± 2,6 (48)	4,53 ± 3,0 (25)
<b>Protéines totales (g/dL)</b>	6,6 ± 1,0 (51)	6,7 ± 1,0 (35)	6,3 ± 0,7 (16)
<b>Bilirubine totale (mg/dL)</b>	2,3 ± 2,0 (50)	2,15 ± 1,8 (36)	2,74 ± 2,4 (14)
<b>Glucose (mg/dL)</b>	169 ± 43 (55)	169 ± 42 (38)	169 ± 45 (17)
<b>Calcium (mg/dL)</b>	8,4 ± 0,9 (47)	8,4 ± 0,9 (32)	8,1 ± 0,8 (15)
<b>Urée (mg/dL)</b>	29,0 ± 21,3 (56)	27,5 ± 18,4 (38)	32,2 ± 26,5 (18)
<b>AlAT (U/L)</b>	68,3 ± 99,4 (55)	58,9 ± 65,2 (37)	102 ± 143 (18)

A&A : atovaquone et azithromycine ; AlAT : alanine transaminase  
Moyenne ± écart-type

Les anomalies cellulaires incluent une leucopénie et une anémie. Une thrombopénie est diagnostiquée chez 59 échantillons mais aucun contrôle du frottis sanguin n'a été réalisé. Nous ne pouvons donc en tirer aucune conclusion. Les anomalies biochimiques incluent l'hyperbilirubinémie, l'hyperglycémie et l'hypocalcémie. Le taux de protéines totales se trouve sous le seuil des valeurs usuelles (6,0 g/dL) chez 12 chats sur 51. Contrairement à d'autres études, aucune anomalie significative concernant l'urémie et le taux d'AlAT n'a été observée.

**Tableau V** : Seuil obtenu à partir d'une RT-PCR réalisée sur 79 chats atteints de *Cytauxzoonose* et traités avec soit une association d'atovaquone et d'azithromycine soit avec de l'imidocarbe (Cohn et al., 2011).

	A&A	Imidocarbe	Tout traitement confondus
<b>Survivants</b>	26,5 ± 4,3 (17 – 37,5)	31,3 ± 2,7 (28,1 – 36,7)	27,4 ± 4,4* (17-37,5)
<b>Non-survivants</b>	24,6 ± 4,1 (19,8 – 36,0)	24,4 ± 2,7 (20,9 – 2,7)	24,5 ± 3,4* (19,8 – 36,0)
<b>Ensemble des animaux</b>	25,8 ± 4,24 (17 – 37,5)	26,2 ± 4,0 (20,9 – 36,7)	25,9 ± 4,2 (17 – 37,5)

A&A : atovaquone et azithromycine

Moyenne ± écart-type

\*p=0,0012

Sur les 53 chats traités avec l'association atovaquone et azithromycine, 60% (32/53) ont survécu et 40% (21/53) sont décédés au cours de l'hospitalisation. Sur les 27 chats traités avec de l'imidocarbe, 26% (7/27) ont survécu et 74% (20/27) sont décédés. Ainsi, le pourcentage de survie est significativement plus important chez les patients traités avec l'association atovaquone et azithromycine plutôt qu'avec l'imidocarbe (P=0,0036 ; odds ratio = 7,2 ; 95%).

### 6.3. Etablissement d'un critère pronostic

#### 6.3.1. Le rôle du cytochrome b

Schreeg *et al.* (2013) ont recherché la relation entre la réponse au traitement à base d'azithromycine et atovaquone et le génotype du cytochrome b du *Cytauxzoon felis* infestant.

La majorité des échantillons (46/69) a mis en évidence, chez *Cytauxzoon felis*, la présence d'un seul génotype de cytochrome b. Cependant, les autres échantillons (23/69) possédaient au moins deux génotypes de cytochrome b. Un génotype identique de cytochrome b a été retrouvé chez 13 échantillons de *Cytauxzoon felis* et fut désigné cytochrome b génotype 1 (cytb1).

Le taux de survie des chats infectés par *Cytauxzoon felis* à cytochrome b génotype 1 est comparé au taux de survie des chats infectés possédant tous les autres génotypes possibles de cytochrome b (« non-cytb1 »). Les résultats sont analysés via un test de probabilité exact de Fisher (Tableau VI).

**Tableau VI :** *Corrélation entre le taux de survie des chats traités par l'association azithromycine/atovaquone (A&A) et le génotype du cytochrome b de *Cytauxzoon felis* (Cohn et al., 2011).*

Traitement	Génotype	Nombre de chats		
		Survivants	Morts	Total
A&A	Cytb1	8	0	8
	Non-cytb1	20	17	37
	Total	28	17	45 (p=0,017)
Imidocarbe dipropionate	Cytb1	2	3	5
	Non-cytb1	5	14	19
	Total	7	17	24 (p=0,608)

La présence du génotype cytb1 est corrélée avec un taux de survie significativement plus important ( $P = 0,017$ ) contrairement aux autres génotypes chez les chats traités par l'association azithromycine/atovaquone. Cependant, il n'y a aucun lien entre la présence du cytb1 et le taux de survie ( $P = 0,608$ ) dans le cas des chats traités avec de l'imidocarbe. Du fait du faible échantillonnage, seul cytb1 fut identifié comme étant associé à la survie de chaque groupe de traitement.

Ainsi, l'identification du génotype du cytochrome b apparaît comme prometteur pour pouvoir prédire la survie des chats infectés par *Cytauxzoon felis* et traités par l'association azithromycine/atovaquone.

Le futur développement d'un test rapide pour identifier le cytochrome b1 de *Cytauxzoon felis* chez les chats infectés permettrait d'estimer plus précisément le pronostic à la suite du traitement.

### 6.3.2. Mise en place d'un test clinique pour identifier le génotype du cytochrome b

Il est possible de détecter le génotype cytb1 de façon rapide et fiable chez des individus atteints par *Cytauxzoon felis* à partir d'un échantillon sanguin. Schreeg *et al.* (2015) utilisent une technique quantitative de RT-PCR associée à une analyse HMR (High-Resolution Melting).

L'analyse HMR utilise la RT-PCR pour évaluer les variations de la séquence ADN. Il s'agit d'une analyse peu coûteuse, en une étape, ne nécessitant qu'un seul échantillon sanguin. Cette analyse est réalisée immédiatement après l'analyse PCR (Tong *et al.*, 2012).

**Tableau VII : Spécificités actuelles et prédites de l'échantillonnage PCR.**

<sup>a</sup> les valeurs entre parenthèses représentent le nombre de vrais négatifs incluant les nombre de vrais négatifs et de faux positifs.

Nucléotide(s) cytb analysé(s)	Spécificité de détection de cytb1 (%)	Valeur prédictive positive (%)		
		Population avec une prévalence de cytb1 de 8%	Population avec une prévalence de cytb1 de 18,8%	Population avec une prévalence de cytb1 de 26,7%
<b>750A</b>	75	25,8	48,1	59,3
<b>750A + 947T</b>	85,7	37,8	61,8	71,8
<b>750A + 947T + 399A</b>	91,1	49,4	72,2	80,4
<b>750A + 947T + 399A + 274C</b>	96,4	70,7	86,5	91
<b>750A + 947T + 399A + 274C + 858G</b>	98,2	82,9	92,8	95,3

Le panel PCR a une sensibilité de 100% (13/13 cytb1 ont été correctement identifiés) et une spécificité de 98,2% (55/56 non-cytb1 correctement identifiés) (Tableau VII). Les valeurs prédictives positives pour l'identification du cytochrome b1 de *Cytauxzoon felis* par analyse cumulative de chaque rang de position de nucléotide varie de 25,8% à 95,3% et sont résumés dans le VIII.

**Tableau VIII : La valeur prédictive positive pour l'identification du cytochrome b1 de *Cytauxzoon felis* est plus haute lorsque les cinq positions des nucléotides du panel PCR sont analysées.**

Nucléotide(s) cytb analysé(s)	Spécificité cytb1 prévisionnelle (%) <sup>a</sup>	Spécificité cytb1 réelle (%) <sup>a</sup>
<b>750A</b>	80,4 (45/56)	75 (42/56)
<b>750A + 947T</b>	92,9 (52/56)	85,7 (48/56)
<b>750A + 947T + 399A</b>	96,4 (54/56)	91,1 (51/56)
<b>750A + 947T + 399A + 274C</b>	98,2 (55/56)	96,4 (54/56)
<b>750A + 947T + 399A + 274C + 858G</b>	100 (56/56)	98,2 (55/56)

Ainsi, le test permet de détecter le cytochrome b1 de *Cytauxzoon felis* à partir d'un échantillon sanguin de chat avec 100% de sensibilité et 98,2% de spécificité. Ceci permet notamment l'établissement d'une valeur pronostic pour les propriétaires de chats infectés par *Cytauxzoon felis*.

## 7. Prévention

### 7.1. Protection contre les morsures de tiques

La protection contre les ectoparasites est la seule technique vraiment efficace en termes de prévention de la maladie. Garder les chats à l'intérieur réduit le risque d'exposition aux ectoparasites et peut être conseillé dans les régions d'endémie.

La durée du repas sanguin nécessaire à la tique pour transmettre le pathogène étant inconnue, il est conseillé de prévenir la morsure de la tique plutôt que de se contenter de tuer celle-ci une fois qu'elle a mordu (Sherrill *et al.*, 2015).

### 7.2. Prophylaxie médicale

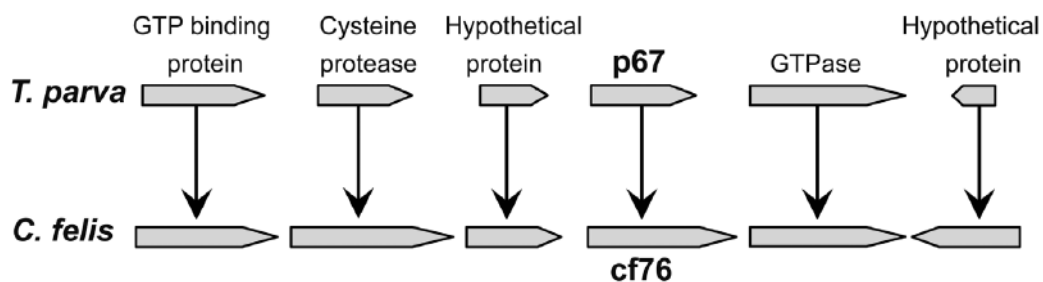
Une réponse immunitaire est observée lors de l'infection par *Cytauxzoon felis* (Kier *et al.*, 1987) supposant ainsi que le développement d'un vaccin est envisageable. Cependant, l'agent causal entraînant la réponse immunitaire doit être mis en culture *in vitro* ce qui, dans ce cas, rend l'approche traditionnelle de développement de vaccin impossible.

Afin de surmonter les limites techniques et de faciliter la reconnaissance de l'antigène candidat au vaccin. Tarigo *et al.* (2013) ont séquencé les 9,1 Mpb du génome de *Cytauxzoon felis* et ont identifié environ 4300 gènes codants, chacun représentant un potentiel antigène immunogène.

*Cytauxzoon felis* est génétiquement proche d'autres Apicomplexa tels que *Theileria parva* et *Theileria annulata*, les agents étiologiques respectivement de la theilériose bovine et de la theilériose tropicale. Tarigo *et al.* (2013) se sont basés sur l'identification des orthologues p67 et SPAG-1 de *Babesia bovis* (BOV57). Une recherche BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) est réalisée. Il s'agit d'une méthode de recherche permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés et de réaliser un alignement de ces régions homologues.

Dans cette étude, aucun gène significativement proche de p67 ou SPAG-1 n'a été identifié au sein du génome de *Cytauxzoon felis*. Le principe de conservation du génome par synténie est appliqué afin d'exposer l'orthologue de p67/SPAG-1 chez *Cytauxzoon felis*. Une unique copie d'un gène synténique de p67 de 2172 pb est alors identifiée. Ce gène est nommé cf76. Trois critères sont importants à prendre en compte pour établir que cf76 peut être un candidat à la vaccination : la reconnaissance par le système immunitaire félin ; le degré de similitude des séquences isolées de *Cytauxzoon felis* ; une expression lors du cycle de *Cytauxzoon felis* considérée comme critique pour le développement de la réponse immunitaire.

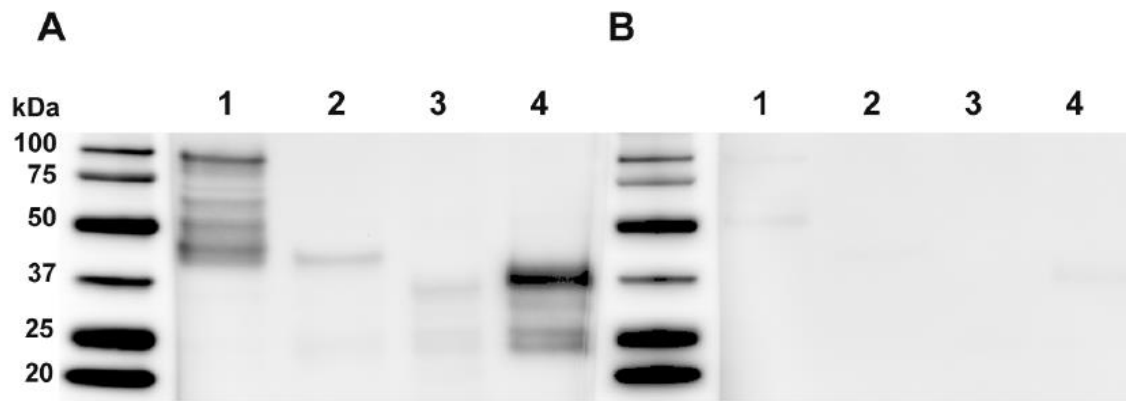
Les antigènes p67 (*T. parva*), SPAG-1 (*T. annulata*) et BOV57 (*B. bovis*) sont codés par des gènes localisés au niveau d'un bloc synténique qui présente une forte conservation entre les trois espèces. Un bloc synténique similaire est identifié au sein du génome de *Cytauxzoon felis*.



**Figure 25** : Gène conservé par synténie entre p67 (*T. parva*) et cf76 (*C. felis*). cf76 est identifié *in silico* au sein d'un bloc synténique de forte conservation comprenant des gènes similaires au candidat vaccin pour *T. parva*, p67.

D'après les résultats du BLAST, cf76 ne partage que 22%, 23% et 23% d'identité nucléotidique avec respectivement p67, SPAG-1 et BOV57. Il y a 13%, 13% et 14% de similarités des acides aminés avec respectivement p67, SPAG-1 et BOV57. De plus, de la même façon que p67, SPAG-1 et BOV57, cf76 code une protéine qui possède une séquence peptidique signal en position terminale de la chaîne d'acides aminés ce qui suggère qu'il s'agit d'une protéine sécrétée.

Une analyse *Western blot* réalisée avec le sérum de 10 chats survivants de l'infection par *Cytauxzoon felis* révèle une forte séroréactivité au recombinant purifié cf76 ainsi qu'à la région C-terminale. De plus, aucune séroréactivité n'est observée lors de l'analyse du sérum des 10 chats testés négatifs pour *Cytauxzoon felis* (le faible signal observé est attribué à une faible réaction croisée avec d'autres anticorps que ceux de *Cytauxzoon felis*) (Figure 26).



**Figure 26** : Mise en évidence d'une séroréactivité féline à cf76 et aux fragments de cf76 par Western blot. Le brin purifié de cf76 (1), la région N-terminale (2), la région centrale (3) et la région C-terminale (4) sont analysés avec du sérum de chats survivants à l'infection par *C. felis* (A) ou des chats naïfs (B).

Ces données indiquent que la région C-terminale de cf76 est fortement immunogène lors de l'infection par *Cytauxzoon felis*.

Afin de vérifier le degré de conservation parmi les échantillons de *Cytauxzoon felis* de différentes régions, onze échantillons différents provenant de 8 états différents au Sud et Sud-Est des Etats-Unis sont prélevés et le gène cf76 est amplifié et séquencé. Ceci révèle un haut degré de conservation de 92,2 à 100 % entre les échantillons.

Les schizontes sont associés à la phase de réponse immunitaire. En effet, une forte immunité est observée chez les chats ayant survécu à la phase schizogonale de la cytauxzoonose. Les antigènes associés aux schizontes sont donc des cibles vaccinales pour *Cytauxzoon felis*. De plus, Tarigo *et al.* (2013) ont trouvé un fort niveau de transcrits de cf76 dans les tissus des schizontes supportant l'hypothèse que cet antigène est un bon candidat pour la mise en place d'une vaccination.

## Conclusion de la première partie

L'infection à *Cytauxzoon felis* est à l'origine aux Etats-Unis d'une maladie décrite chez le chat domestique (*Felis catus*) qui entraîne la destruction des érythrocytes et des leucocytes et conduit à la mort dans la majorité des cas. Le lynx roux (*Lynx rufus*) constitue le réservoir pour cette infection qui est transmise par des tiques dures (*Amblyomma americanum* et *Dermacentor variabilis*).

En Europe (et en Mongolie), d'autres parasites du genre *Cytauxzoon* ont été identifiés chez des félidés : chats domestiques (*Felis catus*), chats sauvages (*Felis silvestris*), lynx boréal (*Lynx lynx*) et lynx ibérique (*Lynx pardinus*). Après une première description mettant en évidence la présence d'ADN de *Cytauxzoon sp.* sur des prélèvements sanguins de chat (Criado-Fornelio *et al.*, 2009), un cas de cytauxzoonose est identifié en 2014 chez un chat domestique (Legroux *et al.*, 2017) en France. La description d'un cas de microbabésiose chez un chat en Haute-Saône une vingtaine d'années auparavant (Léger *et al.*, 1992) permet également d'évoquer *Cytauxzoon*. A l'image de l'infection à *Cytauxzoon felis* en Amérique du Nord, le rôle du lynx (*Lynx lynx*) et du chat sauvage (*Felis silvestris*) comme réservoir des infections à *Cytauxzoon sp.* en Europe est suspecté. Quant aux vecteurs éventuels, ils demeurent non identifiés.

Ces éléments sont à l'origine d'une enquête – objet de la 2<sup>ème</sup> partie de notre travail – destinée à avoir une première approche sur l'importance de l'infection à *Cytauxzoon sp.* chez le chat domestique (*Felis catus*) et le lynx (*Lynx lynx*) dans la zone d'habitation du lynx en France (départements du Jura, de l'Ain, de la Haute-Savoie et du Doubs).



## DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

### 1. Elaboration du protocole

#### 1.1. Objectif du travail

Le but de l'étude est de déterminer la présence du parasite *Cytauxzoon felis* chez le chat domestique (*Felis catus*) (appelé chat dans la suite du travail) et le lynx boréal (*Lynx lynx*) (appelé lynx dans la suite du travail) dans les zones d'habitation du lynx en France. Il s'agit d'une étude descriptive transversale permettant d'établir un taux de prévalence concernant l'infection à *Cytauxzoon sp.*

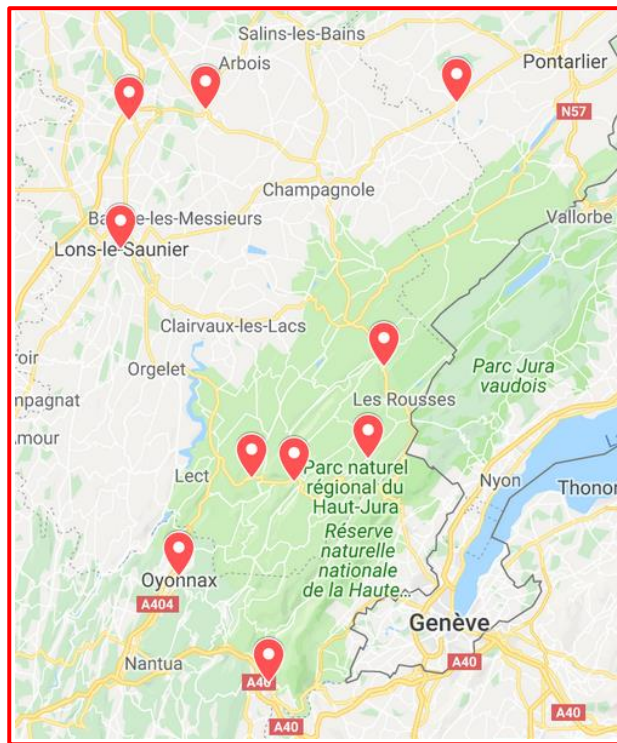
#### 1.2. Prélèvements et choix des animaux

##### 1.2.1. Chats domestiques (*Felis catus*)

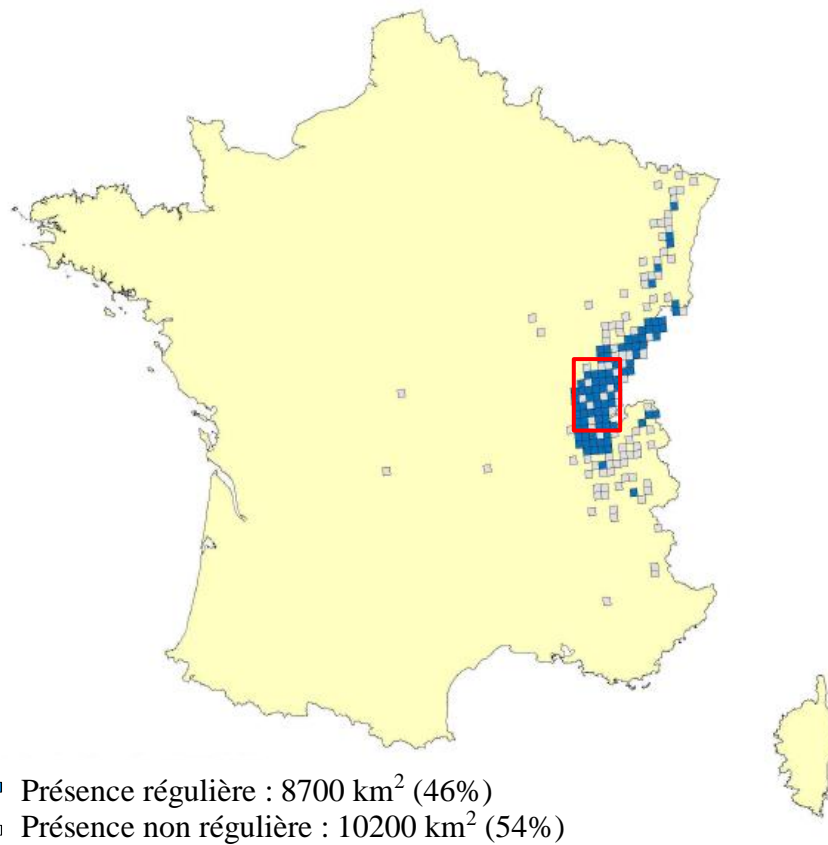
L'ensemble des échantillons sanguins récoltés proviennent de chats domestiques présentés dans une clinique vétérinaire appartenant à la zone étudiée. A la suite d'une première réunion d'information au Laboratoire Départemental Vétérinaire du Jura, les cliniques vétérinaires ont été contactées et invitées à assister à une conférence de sensibilisation sur l'infection à *Cytauxzoon sp.* chez le chat. Les objectifs de l'étude ont alors été présentés aux vétérinaires intéressés. Dans un premier temps, les propriétaires de chats potentiellement exposés ont été sollicités pour réaliser une prise de sang pour la recherche de *Cytauxzoon sp.* (Annexes 4, 5 et 6). Cependant, cette phase n'ayant permis de réunir que 5 cas, la recherche a ensuite été élargie aux chats qui faisaient l'objet d'un prélèvement sanguin pour d'autres raisons, mais dont le vétérinaire conservait le reste pour l'analyse. Lorsque les propriétaires acceptaient qu'une prise de sang soit réalisée dans le seul but de l'étude, il leur a été demandé de remplir un questionnaire afin de connaître précisément le mode de vie de leur animal (Annexe 6).

Tous les chats prélevés étaient des chats domestiques ayant accès libre à l'extérieur et vivants dans la zone géographique d'intérêt.

Ainsi, 101 échantillons sanguins sur tube EDTA répartis sur 10 cliniques vétérinaires ont été collectés et centralisés à Vetagro Sup pour la recherche de *Cytauxzoon sp.* Les figures 27 et 28 mettent en relation la localisation géographique des cliniques participant à l'étude avec la répartition géographique du lynx boréal en France.



**Figure 27 :** Localisation de l'ensemble des cliniques vétérinaires participant à l'étude.



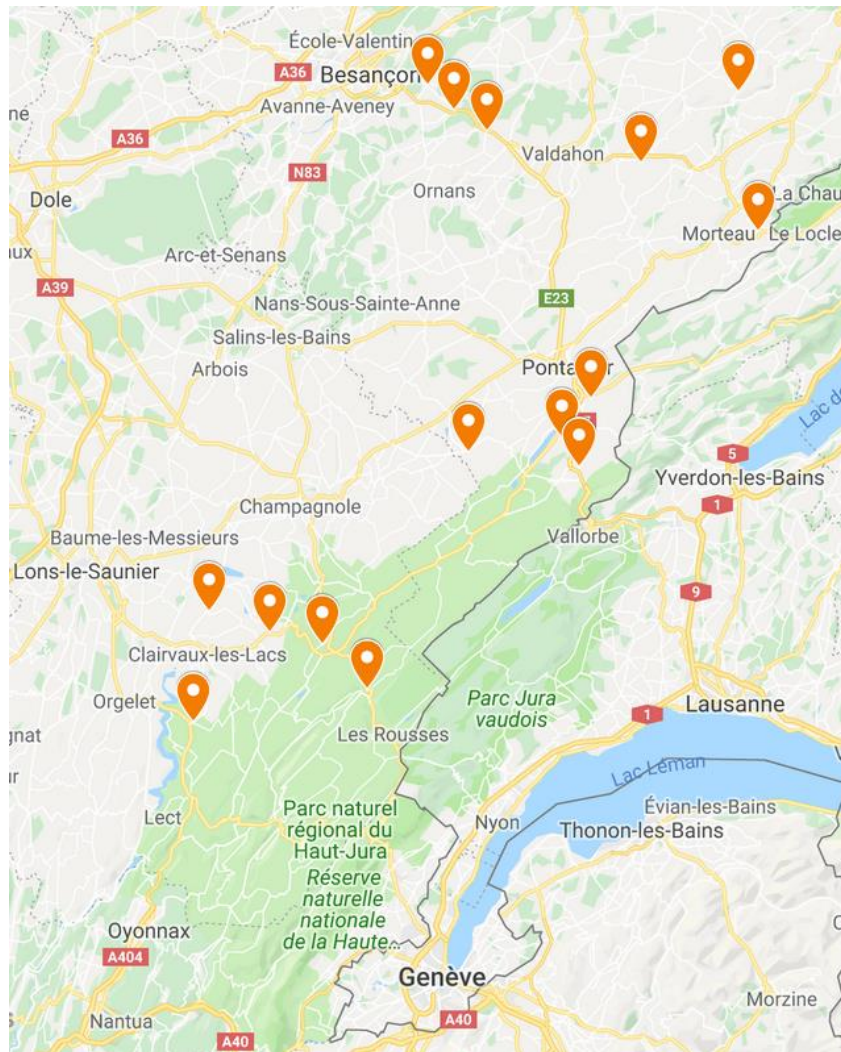
**Figure 28 :** Répartition du lynx boréal (*Lynx lynx*) en France en 2017 représentée selon des mailles élémentaires de 10x10 km (grille standardisée de 100 km<sup>2</sup> de l'Agence Européenne de l'Environnement). L'encadré rouge correspond à la zone géographique délimitée par la figure 28 (Bulletin d'information du réseau lynx, Flash info du 31 juillet 2018, ONCFS).

### 1.2.2. Lynx boréal (*Lynx lynx*)

L'ensemble des prélèvements de lynx provient d'animaux sauvages collectés dans le cadre du réseau SAGIR, réseau de surveillance sanitaire de la faune sauvage en France ([www.oncfs.gouv.fr/Reseau-SAGIR-ru105](http://www.oncfs.gouv.fr/Reseau-SAGIR-ru105)). Les animaux ont été collectés dans le milieu naturel par des agents de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS) ou par des agents des Fédérations Départementales des Chasseurs. Ils ont tous subi une autopsie dans les laboratoires départementaux du Jura (39) ou du Doubs (25). A l'issue de cet examen, des prélèvements de sang, rate et muscle ont été réalisés. Un compte-rendu d'autopsie détaillé était également disponible, ce qui a permis de chercher si les lynx présentaient des signes caractéristiques d'une infection par *Cytauxzoon sp.*, notamment une splénomégalie ou une adénomégalie. Les laboratoires départementaux du Jura et du Doubs nous ont ainsi fourni des échantillons provenant de 15 lynx. Les détails des prélèvements sont précisés dans le Tableau IX.

**Tableau IX :** Recensement des prélèvements de lynx analysés pour la recherche de *Cytauxzoon sp.*

<i>Animal</i>	<b>Tissu analysé</b>			<b>Origine</b>
<i>Lynx 1</i>	Sang			Laboratoire départemental du Jura (39)
<i>Lynx 2</i>	Sang			
<i>Lynx 3</i>	Sang	Rate		
<i>Lynx 4</i>	Sang	Rate		
<i>Lynx 12</i>	Sang			
<i>Lynx 5</i>		Rate		Laboratoire départemental du Doubs (71)
<i>Lynx 6</i>		Rate		
<i>Lynx 7</i>			Muscle	
<i>Lynx 8</i>		Rate		
<i>Lynx 9</i>	Sang	Rate		
<i>Lynx 10</i>		Rate		
<i>Lynx 11</i>	Sang			
<i>Lynx 13</i>	Sang	Rate		
<i>Lynx 14</i>	Sang	Rate		
<i>Lynx 15</i>	Sang	Rate		



**Figure 29 :** Géolocalisation des communes où ont été collectés les lynx étudiés.

L'ensemble des prélèvements de chats et de lynx ont été centralisés et analysés au laboratoire de parasitologie de Vetagro Sup. La figure 29 regroupe la localisation d'origine de chacun des lynx étudiés.

Les informations issues des autopsies nous ont été communiquées pour les 15 lynx (dont 14 rapports d'autopsie). L'échantillon était composé de 5 femelles et 10 mâles. Pour 13 des lynx, une collision routière était suspectée dès la récolte (animaux trouvés morts ou mourant sur le bord de la route avec pour certains des commémoratifs de collision) et est confirmée comme cause principale de la mort. Ils avaient tous une bonne condition physiologique au moment du décès, l'état d'engraissement étant considéré comme « normal » à « excellent ». Les autopsies n'ont révélé aucune organomégalie en dehors d'adénomégalies localisées qui pouvaient être expliquées par d'autres causes que *Cytauxzoon sp.* (ascaridiose notamment).

## 2. Technique d'analyse moléculaire

### 2.1.1. Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait en utilisant un kit d'extraction sur colonne (QIAmp DNA mini Kit, Qiagen, Allemagne) pour les échantillons de sang, de rate et de muscle selon les recommandations du laboratoire producteur. L'élution finale a été réalisée sur 18,375µL d'eau et les ADN ainsi extraits ont été congelés à -20°C.

### 2.1.2. Amplification par méthode PCR

#### 2.1.2.1. Principe général

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une méthode découverte en 1983 et mise au point par Mullis en 1985, qui permet de sélectionner un fragment d'ADN de 100 à plusieurs milliers de bases nucléotidiques à partir d'un génome complexe et de l'amplifier *in vitro* (Visée, 2008). Il s'agit d'une technique d'amplification d'un segment d'ADN compris entre 2 régions de séquences connues. Elle utilise une des propriétés des ADN polymérase qui est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'une séquence qu'à partir d'une amorce. On utilise deux amorces oligonucléotidiques de synthèse complémentaires des extrémités 5' des 2 brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Une de ces amorces est complémentaire du brin codant et une autre du brin non codant. Sous l'action d'une ADN polymérase, chaque amorce est allongée dans le sens 5'-3' (Visée, 2008).

Un cycle PCR est composé de trois étapes : une séparation des brins d'ADN, une hybridation des amorces et enfin une élongation par une ADN polymérase. La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible (Visée, 2008).

Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé une « PCR nichée » (*Nested PCR*). Développée initialement pour l'amplification d'un fragment d'environ 800 paires de bases de l'ADNr18S des piroplasmes des genres *Babesia* et *Theileria* du chien (Jefferies *et al.*, 2007), cette méthode a montré sa capacité à amplifier les protozoaires du genre *Cytauxzoon* des félins lors d'une précédente étude réalisée en France (Legroux *et al.*, 2017). La PCR nichée consiste à réaliser deux PCR successives en utilisant des couples d'amorces différents, le deuxième couple d'amorces encadrant une séquence incluse dans celle qui est amplifiée par le premier couple d'amorces. Ainsi, si le premier couple d'amorces est artéfactuel, lors de la deuxième PCR les amorces du deuxième couple ne pourront pas s'hybrider et il n'y aura pas d'amplification. Cette technique permet d'augmenter dans le même temps la spécificité et le taux d'amplification.

### 2.1.2.2. Amplification de l'ADN extrait des échantillons de chats et de lynx (PCR nichée)

Pour chaque échantillon récolté (sang, rate ou muscle), nous utilisons 1 $\mu$ L d'ADN extrait associé à 24 $\mu$ L d'un mélange (dit « MIX ») de réactifs contenant notamment des nucléotides (ATGC), les amorces et l'ADN polymérase.

La composition du mix utilisé dans le cadre de cette étude est présentée dans le Tableau X.

**Tableau X :** Composition du mix utilisé pour la recherche de *Cytauxzoon sp.* chez les chats domestiques et les lynx.

<b>REACTIFS</b>	<b>Unité</b>	<b>Concentration initiale</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Volume par échantillon (<math>\mu</math>L)</b>
<b>H2O</b>				18,375
<b>Tampon 10X</b>		10		2,5
<b>MgCl2</b>	mM	25	1,5	0
<b>dNTP</b>	mM	10	0,2	0,5
<b>Amorce BTF1/2</b>	$\mu$ M	10	0,5	1,25
<b>Amorce BTR1/2</b>	$\mu$ M	10	0,5	1,25
<b>TAQ Polymérase</b>	U/ $\mu$ L	5	0,025	0,125

Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau XI.

**Tableau XI :** Amorces utilisées lors des deux PCR successives de la PCR nichée.

<b>Première nichée</b>	BTF1	5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3'
	BTR1	5'-CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3'
<b>Deuxième nichée</b>	BTF2	5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3'
	BTR2	5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3'

Pour chaque PCR un Témoin positif (échantillon positif *Babesia canis*) garant de la réussite de l'amplification et un témoin négatif (garant de l'absence de contamination) ont été ajoutés.

Pour chaque échantillon, 1 $\mu$ L d'ADN est déposé dans 24 $\mu$ L de mix puis l'ensemble est placé dans un thermocycleur pour permettre la réalisation des différentes étapes de l'amplification moléculaire.

Les programmes PCR utilisés dans le cadre de cette étude sont présentés dans le Tableau XII.

**Tableau XII :** Programmes des 2 PCR utilisés pour la recherche de *Cytauxzoon sp.* chez les chats domestiques et les lynx.

**A) Première PCR (amorces BTF1 et BTR1, Jefferies *et al.*, 2007)**

Etapes	Nombre de cycles	Température (°C)	Durée
<b>1</b>	1	94	15 min
		58	1 min
		72	2 min
<b>2</b>	45	94	30 sec
		58	20 sec
		72	30 sec
<b>3</b>	1	72	7 min
<b>4</b>	1	4	∞

**B) Deuxième PCR (amorces BTF2 et BTR2, Jefferies *et al.*, 2007)**

Etapes	Nombre de cycles	Température (°C)	Durée
<b>1</b>	1	94	15 min
		58	1 min
		72	2 min
<b>2</b>	45	94	30 sec
		62	20 sec
		72	30 sec
<b>3</b>	1	72	7 min
<b>4</b>	1	4	∞

Etape 1 : activation (séparation des brins d'ADN, hybridation des amorces, extension)

Etape 2 : amplification

Etape 3 : extension finale

Etape 4 : conservation

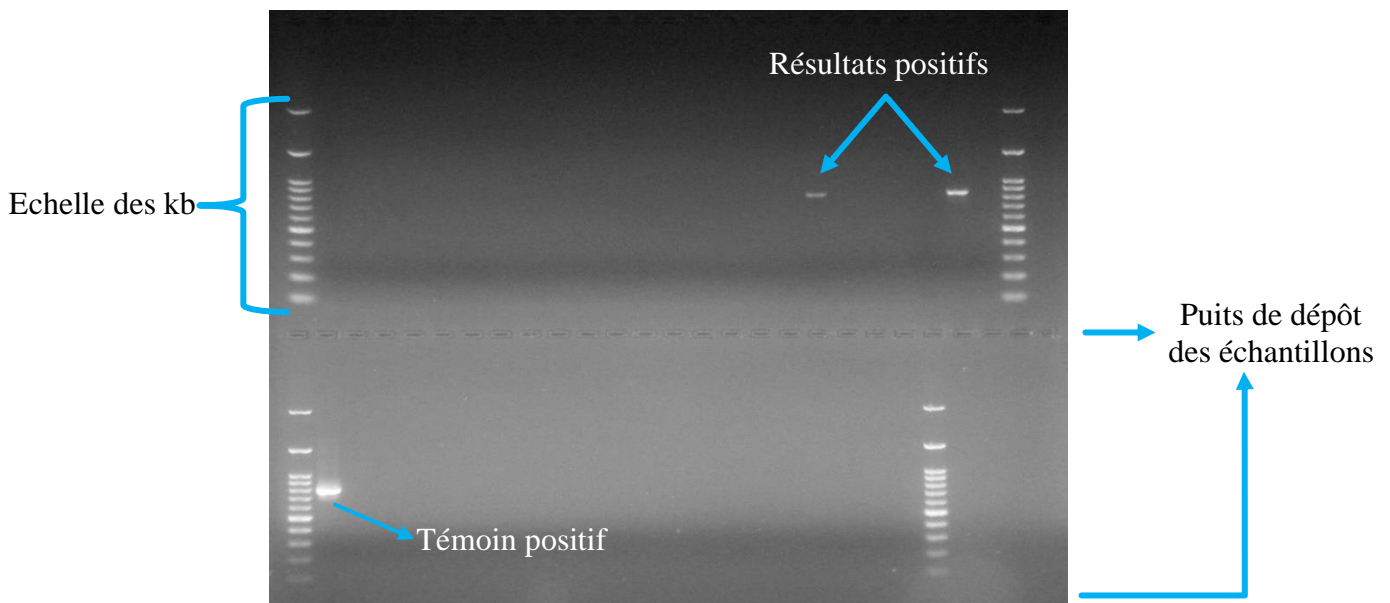
2.1.3. Lecture des résultats

La lecture des résultats est réalisée après électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) coloré au Bromure d'Ethidium (BET). Il s'agit d'un colorant fluorescent utilisé pour le marquage et la détection des acides nucléiques. Du fait de la planéité de sa structure, cette molécule possède la propriété de s'intercaler entre les paires de base des acides nucléiques, où sa fluorescence dans le visible est exaltée. Elle est révélée par excitation sous illumination par UV courts (vers 300 nm) en plaçant le gel sur un transilluminateur.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour séparer des molécules en fonction de leur charge, leur taille et leur forme. Le gel est préparé par dissolution de poudre d'agarose dans de la solution tampon portée à ébullition. La solution est ensuite refroidie jusqu'à 60° C, puis versée dans un plateau de support sur lequel on dépose un peigne permettant la formation de puits, où elle se solidifie. Le support est alors submergé dans un appareil d'électrophorèse relié à des électrodes contenant de la solution tampon.

Les échantillons d'ADN, avant d'être déposés dans les puits, sont mélangés avec des composants qui leur donnent plus de densité, tels que le glycérol ou le sucrose. Cette étape permet d'éviter que l'ADN, une fois déposé, ne s'échappe du puit. Les échantillons sont ensuite déposés à l'aide d'une micropipette dans les puits créés dans le gel.

L'appareil d'électrophorèse est branché à une source de courant continu direct et mis sous tension. Dans le cadre de notre étude, la tension était de 130V sur une durée de migration d'une heure. Les fragments d'ADN amplifiés colorés au BET pénètrent le gel à travers des capillaires et y migrent à une distance proportionnelle à leur poids moléculaire (donc au nombre de paires de bases du fragment). Une échelle (fragments de poids moléculaires connus) est placée à chaque extrémité du gel afin de déterminer le poids moléculaire du fragment amplifié.



**Figure 30 :** Photographie de gel d'électrophorèse après passage dans le transilluminateur. Deux échantillons sont positifs pour un parasite proche de *Babesia canis*.

Chaque échantillon positif en PCR a été envoyé au laboratoire Biofidal (Vaulx en Velin, France) pour séquençage du fragment de 836 paires de bases de l'ADNr18S amplifié afin de confirmer l'identité de l'agent amplifié.



### 3. Résultats

#### 3.1. Prévalence de l'infection à *Cytauxzoon sp.*

Deux des 101 chats testés, et 12 des 15 lynx, présentaient des résultats positifs. Parmi les trois résultats négatifs sur des lynx cependant, l'un concernait un animal (Lynx 7) dont le seul prélèvement était du muscle, le résultat très faiblement positif a été considéré comme négatif mais est difficilement comparable à celui des autres lynx qui ont été testés sur rate et/ou sang.

La prévalence instantanée P est le nombre d'atteints sur l'effectif total à un instant t.

$$P = \frac{Nm}{N} \quad \begin{array}{l} Nm = \text{Effectif de malades à l'instant } t \\ N = \text{Effectif total à l'instant } t \end{array}$$

A l'aide de cette équation, nous obtenons les résultats présentés dans le Tableau XIII.

**Tableau XIII :** Prévalence établie sur la base des échantillons (sang, rate, muscle) récoltés.

	Chats ( <i>Felis catus</i> )	Lynx ( <i>Lynx lynx</i> )
Nombre d'individus	101	15
Nombre de positifs	2	12
Prévalence (P)	<b>1.98%</b>	<b>80,00%</b>

#### 3.2. Intervalle de confiance de la prévalence

La distribution de P, qui est une fréquence, suit toujours une loi binomiale et l'on peut toujours calculer l'intervalle de confiance. Le calcul de cet intervalle est réalisé à l'aide du logiciel R via la fonction binom.test.

L'intervalle de confiance à 95% de prévalence est de [0,24% ; 6,97%] pour le chat domestique et de [51,91% ; 95,67%] pour le lynx. Les deux proportions sont significativement différentes (test exact de Fisher,  $p < 0,001$ ) donc la prévalence est significativement plus élevée chez les lynx que chez les chats.

#### 3.3. Caractérisation des chats positifs et négatifs

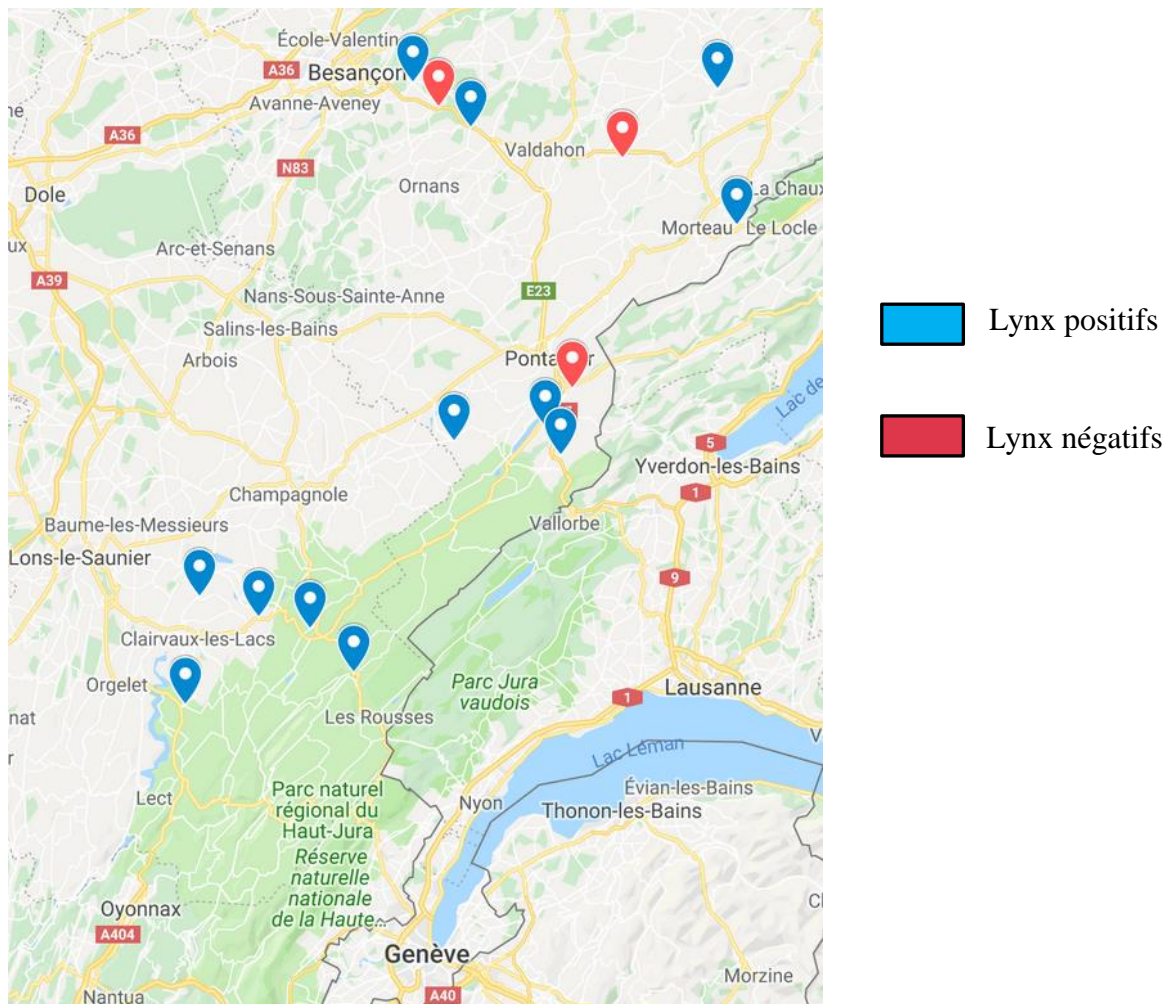
Nous ne possédons aucune information concernant les commémoratifs ou l'anamnèse des 2 chats positifs. Cependant, les échantillons de ces 2 animaux sont issus de la même clinique vétérinaire située à Oyonnax dans l'Ain (01).

### 3.4. Caractérisation des lynx positifs et négatifs

Le tableau XIV récapitule les résultats obtenus pour les différents échantillons de lynx.

**Tableau XIV :** Résultats obtenus sur les différents prélèvements de lynx (*Lynx lynx*).

<i>Animal</i>	<b>Sang</b>	<b>Rate</b>	<b>Muscle</b>
<i>Lynx 1</i>	+		
<i>Lynx 2</i>	+		
<i>Lynx 3</i>	+	+	
<i>Lynx 4</i>	+	+	
<i>Lynx 5</i>		-	
<i>Lynx 6</i>		-	
<i>Lynx 7</i>			-
<i>Lynx 8</i>		+	
<i>Lynx 9</i>	ND	+	
<i>Lynx 10</i>		+	
<i>Lynx 11</i>	+		
<i>Lynx 12</i>	+		
<i>Lynx 13</i>	+	+	
<i>Lynx 14</i>	+	+	
<i>Lynx 15</i>	+	+	



**Figure 31 :** Géolocalisation des lynx positifs et négatifs.

Notons que les trois lynx ayant un résultat négatif sont issus du département du Doubs, mais aussi qu'ils étaient jeunes (lynx 7), sub-adulte (lynx 5) ou jeune adulte (lynx 6). En revanche tous les animaux notés adultes (lynx 1, 3, 4, 8, 10, 11, 13 et 14) étaient positifs, y compris le lynx 10 dont l'âge estimé était de 14 ans. Il est donc possible que l'infection soit acquise progressivement au cours de la vie. La carte ci-dessous (Figure 31) montre la localisation des 12 lynx positifs et des 3 négatifs. Aucun compte-rendu d'autopsie n'a mis en évidence de splénomégalie, d'adénomégalie généralisée, d'anémie ou de maigreur.

L'analyse des échantillons concernant le lynx 9 montre un résultat positif sur l'analyse de rate mais un résultat non concluant sur l'analyse de sang. Ceci peut s'expliquer par le fait que la parasitémie est plus importante au niveau de la rate par un effet de concentration. Les autres lynx qui ont pu être analysés pour 2 prélèvements (lynx 3 et 4) montraient des résultats cohérents entre les deux.

### 3.5. Séquençage des échantillons positifs

A l'exception de 3 échantillons (lynx 13, 14 et 15), les échantillons positifs en PCR *Babesia/Theileria/Cytauxzoon* (Jefferies et al. 2007) ont été envoyés en séquençage (laboratoire Biofidal, Villeurbanne, France), soient 8 échantillons de sang (2 chats et 6 lynx) et 6 échantillons de rate. Le tableau XIV regroupe ces échantillons et les résultats correspondants.

**Tableau XIV** : Analyse des séquences issues d'échantillons de sang positifs en PCR.

Individu	Echantillon	Qualité de la séquence	Séquençage
<b>Lynx 1</b>	Sang	Très bonne	<i>Cytauxzoon sp.</i>
<b>Lynx 2</b>	Sang	Très bonne	<i>Cytauxzoon sp.</i>
<b>Lynx 3</b>	Sang et rate	Sang : très bonne Rate : très mauvaise	<i>Cytauxzoon sp.</i> (sang)
<b>Lynx 4</b>	Sang et rate	Sang : très bonne Rate : très mauvaise	<i>Cytauxzoon sp.</i> (sang)
<b>Lynx 8</b>	Rate	Très bonne	<i>Cytauxzoon sp.</i>
<b>Lynx 9</b>	Rate	Très bonne	<i>Cytauxzoon sp.</i>
<b>Lynx 10</b>	Rate	Très bonne	<i>Cytauxzoon sp.</i>
<b>Lynx 11</b>	Sang	Très bonne	<i>Cytauxzoon sp.</i> (à reconfirmer)
<b>Lynx 12</b>	Sang	Très bonne	<i>Cytauxzoon sp.</i>
<b>Chat 5F</b>	Sang	Très bonne	<i>Cytauxzoon sp.</i>
<b>Chat 5K</b>	Sang	Très bonne	<i>Cytauxzoon sp.</i>

Les séquences obtenues à partir des lynx 8, 9, 10 et 11 sont identiques et correspondent aux séquences décrites dans GenBank® : EU622908 isolé à partir d'un chat en France (Criado-Fornelio *et al.*, 2009).

Concernant les échantillons chat 5F, chat 5K, lynx 1, lynx 2, lynx 3, lynx 4, les 6 séquences de 836 paires de bases sont 100% identiques (à l'exception de la séquence chat 5K qui présente 1 paire de base de différence en position 552). Les séquences obtenues présentent 99,8 à 100% d'homologie avec des séquences de *Cytauxzoon sp.* déposées dans GenBank® soient :

- MF503146, MF503145, MF 503143, MF 503141 isolés de chats en Suisse (Nentwig *et al.*, 2018).
- KX881967 isolé dans un chat en France (Legroux *et al.*, 2017).
- EU622908 isolé dans un chat en France (Criado-Fornelio *et al.*, 2009).

## 4. Discussion

### 4.1. Le dispositif expérimental

#### 4.1.1. Représentativité de l'échantillon

Même si cette étude se veut être la plus représentative possible de la population de chats domestiques sur la région étudiée, il existe un biais de recrutement du fait que les échantillons sanguins sont tous récoltés au sein de cliniques vétérinaires, les animaux prélevés sont donc potentiellement malades.

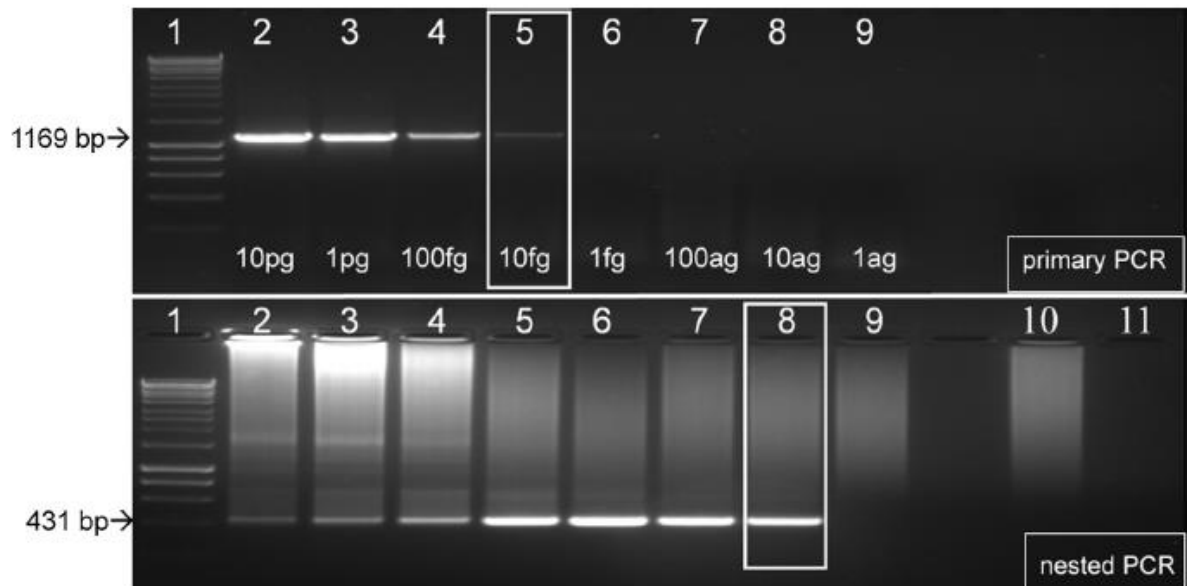
De la même façon, les lynx étudiés sont des animaux trouvés morts qui ne reflètent pas l'ensemble de la population de lynx de la région. Dans la plupart des cas, l'autopsie a identifié une collision avec un véhicule comme cause immédiate de la mort. Cependant, de nombreux facteurs peuvent favoriser une telle collision, comme les intoxications, y compris chroniques, ou une maladie infectieuse sous-jacente. Il pourrait donc être légitime de chercher si l'infection par *Cytauxzoon sp.* peut avoir favorisé un risque de collision, en affaiblissant l'animal. Les compte-rendu d'autopsie n'ont pas permis de mettre en évidence des signes d'appel d'une expression clinique de l'infection, cependant ces signes n'ont pas été recherchés spécifiquement.

Ainsi, les résultats que nous avons obtenus pourraient surestimer la prévalence de la population que ce soit dans le cas des chat domestiques ou des lynx.

#### 4.1.2. Analyse moléculaire

L'utilisation de la PCR nichée permet d'augmenter la spécificité du test. En effet, la ré-amplification de séquences parasites est beaucoup moins probable. Ce risque est d'autant plus minime que nous utilisons des amorces différentes lors de la deuxième amplification (Kim *et al.*, 2013).

De plus, la PCR nichée présente aussi une plus grande sensibilité que la PCR classique. Kim *et al.* (2013) démontrent une sensibilité 1000 fois plus importante de la PCR nichée par rapport à la PCR classique (Figure 32).



**Figure 32 :** Sensibilités de la PCR classique et de la PCR nichée obtenues en utilisant une séquence cible de *Babesia microti*. Colonne 1, échelle des paires de base (bp). Colonnes 2 à 9, dilutions de 10pg\* à 1ag\* de plasmide d'ADN. Colonne 10, témoin négatif (H<sub>2</sub>O) de la PCR classique. Colonne 11, témoin négatif de la PCR nichée (H<sub>2</sub>O) (Kim et al., 2013). La PCR nichée permet une identification de *Babesia microti* à une dilution 1000 fois plus importante (Kim et al., 2013).

\* 1 picogramme (pg) =  $10^{-12}$  gramme  
 1 femtogramme (fg) =  $10^{-15}$  gramme  
 1 attogramme (ag) =  $10^{-18}$  gramme

Dans le cadre de cette étude, la PCR nichée utilisée est une PCR généraliste capable d'amplifier tous les protozoaires des genres *Babesia*, *Theileria* et *Cytauxzoon*. Afin d'identifier précisément l'espèce, il est nécessaire de réaliser un séquençage de l'ADN (Kim et al., 2013).

#### 4.2. Résultats

Le taux de prévalence obtenu est cohérent avec les résultats de Díaz-Regañón *et al.* (2017) qui établissaient un résultat de 1,2% chez le chat domestique (*Felis catus*) dans la région de Madrid.

Aucun taux de prévalence n'a été établi concernant la présence de *Cytauxzoon sp.* chez le lynx boréal (*Lynx lynx*) auparavant. Si on compare à l'ordre de grandeur de 20% estimé chez le lynx roux (*Lynx rufus*) (Shock et al., 2011), le lynx boréal (*Lynx lynx*) pourrait avoir une prévalence encore supérieure.

L'espèce identifiée dans l'ensemble des échantillons correspond à *Cytauxzoon sp.*, seule espèce précédemment décrite chez des chats en France (Criado-Fornelio *et al.*, 2009; Legroux *et al.*, 2017). Cette espèce est actuellement décrite dans différents pays d'Europe (Portugal, Italie, Espagne, Suisse, Roumanie) et son vecteur n'est à ce jour pas connu.

La recherche et l'identification des espèces de tiques présentes sur les lynx de cette région et l'analyse de tiques prélevées dans l'environnement pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'infection des lynx et chats de cette région.





## CONCLUSION

La cytauxzoonose féline est une protozoose infectieuse, inoculable et non contagieuse présente en Amérique du Nord et qui touche les félidés. Le lynx roux (*Lynx rufus*) constitue le réservoir de cette infection qui est transmise par des tiques dures (*Amblyomma americanum* et *Dermacentor variabilis*). Chez le chat domestique (*Felis catus*), le parasite *Cytauxzoon felis* entraîne une lyse des érythrocytes ainsi que des leucocytes, d'où l'apparition d'un syndrome pyrétique et hémolytique conduisant dans une grande majorité des cas à la mort. Il est toutefois possible de traiter cette maladie. La prévention passe majoritairement par la lutte contre les ectoparasites.

En Europe, des parasites du genre *Cytauxzoon* ont été identifiés chez le chat et le lynx, sans qu'un éventuel vecteur ne soit actuellement connu. L'infection du chat domestique à *Cytauxzoon sp.* est désormais décrite en Italie, en France, au Portugal, en Espagne et en Suisse, mais semble moins virulente par rapport à ce qui est connu avec *Cytauxzoon felis* en Amérique du Nord. Ainsi, la présence d'individus porteurs sains dans la population pourraient permettre la propagation de l'infection au-delà de la zone d'habitation du lynx.

Notre travail confirme l'existence d'infections à *Cytauxzoon sp.* dans les zones d'habitation du lynx (*Lynx lynx*) en France, aussi bien chez le lynx que chez le chat domestique, avec une prévalence très élevée (80%) chez le lynx qui demande toutefois à être confortée par l'étude de plus grands effectifs incluant si possible des animaux vivants en apparence bonne santé.

Des études complémentaires sont également nécessaires pour évaluer la pathogénicité de ce parasite, que ce soit chez le chat domestique ou le lynx, ainsi que pour identifier l'éventuel vecteur qui pourrait être à l'origine de la transmission de l'infection.

La mise en évidence de *Cytauxzoon sp.* dans les régions où réside le lynx en France doit conduire les vétérinaires praticiens à inclure la cytauxzoonose dans leur diagnostic différentiel d'un syndrome pyrétique inexplicé ou de troubles hématologiques chez le chat domestique. De plus, il serait justifié de tester de façon systématique la présence de *Cytauxzoon sp.* dans le sang des chats donateurs de sang pour éviter toute transmission par transfusion sanguine.

## Bibliographie

- Alho, A. M., Silva, J., Fonseca, M. J., Santos, F., Nunes, C., de Carvalho, L. M., Cardoso, L. (2016). First report of *Cytauxzoon* sp. infection in a domestic cat from Portugal. *Parasites & Vectors*, 9(1).
- Alvarado-Rybak, M., Solano-Gallego, L. et Millán, J. (2016). A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites & Vectors*, 9(1).
- Ashford. (2003). When is a reservoir a reservoir ? *Emerging Infectious Diseases*, 9(11).
- Barandika, J. F., Espí, A., Oporto, B., Del Cerro, A., Barral, M., Povedano, I., Hurtado, A. (2016). Occurrence and genetic diversity of piroplasms and other apicomplexa in wild carnivores. *Parasitology Open*, 2.
- Birkenheuer, A. J., Le, J. A., Valenzisi, A. M., Tucker, M. D., Levy, M. G. et Breitschwerdt, E. B. (2006). *Cytauxzoon felis* infection in cats in the mid-Atlantic states: 34 cases (1998–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(4), 568–571.
- Blouin, E. F., Kocan, A. A., Glenn, K. M. et Hair, J. A. (1984). Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from Bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to Domestic Cats by *Dermacentor variabilis* (Say). *Journal of Wildlife Diseases*, (20), 241-242.
- Carli, E., Trotta, M., Chinelli, R., Drigo, M., Sinigoi, L., Tosolini, P., Solano-Gallego, L. (2012). *Cytauxzoon* sp. infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. *Veterinary Parasitology*, 183(3-4), 343-352.
- Carli, Erika, Trotta, M., Bianchi, E., Furlanello, T., Caldin, M., Pietrobelli, M. et Solano-Gallego, L. (2014). *Cytauxzoon* sp. Infection in Two Free Ranging Young Cats: Clinicopathological Findings, Therapy and Follow Up. *Turkish Journal of Parasitology*, 38(3), 185-189.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. et Malandrin, L. (2009). Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2), 37.
- Clarke, L. L., Krimer, P. M. et Rissi, D. R. (2017). Glial Changes and Evidence for Apoptosis in the Brain of Cats Infected by *Cytauxzoon felis*. *Journal of Comparative Pathology*, 156(2-3), 147-151.
- Clarke, L. L. et Rissi, D. R. (2015). Neuropathology of Natural *Cytauxzoon felis* Infection in Domestic Cats. *Veterinary Pathology*, 52(6), 1167-1171.

- Cohn, L. A., Birkenheuer, A. J., Brunker, J. D., Ratcliff, E. R. et Craig, A. W. (2011). Efficacy of Atovaquone and Azithromycin or Imidocarb Dipropionate in Cats with Acute Cytauxzoonosis: Cytauxzoonosis Treatment of Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(1), 55-60.
- Corner, L. A. L. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4), 303-312.
- Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J. C., Merino, S., Jefferies, R. et Irwin, P. J. (2006). New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Veterinary Parasitology*, 142(3-4), 238-247.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J. L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Torina, A. (2009). Hemoprotozoa of domestic animals in France: Prevalence and molecular characterization. *Veterinary Parasitology*, 159(1), 73-76.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. et Barba-Carretero, J. . (2003). Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in southern Europe. *Veterinary Parasitology*, 113(3-4), 189-201.
- Daniels, P. W., Halpin, K., Hyatt, A. et Middleton, D. (2007). Infection and disease in reservoir and spillover hosts: determinants of pathogen emergence. In *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission* (p. 113–131). Springer.
- Díaz-Regañón, D., Villaescusa, A., Ayllón, T., Rodríguez-Franco, F., Baneth, G., Calleja-Bueno, L. et Sainz, Á. (2017). Molecular detection of Hepatozoon spp. and Cytauxzoon sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain. *Parasites & Vectors*, 10(1).
- Fenton, A. et Pedersen, A. B. (2005). Community epidemiology framework for classifying disease threats. *Emerging infectious diseases*, 11(12), 1815.
- Fenton, A., Streicker, D. G., Petchey, O. L. et Pedersen, A. B. (2015). Are All Hosts Created Equal? Partitioning Host Species Contributions to Parasite Persistence in Multihost Communities. *The American Naturalist*, 186(5), 610-622.
- Gallusová, M., Jirsová, D., Mihalca, A. D., Gherman, C. M., D'Amico, G., Qablan, M. A. et Modrý, D. (2016a). Cytauxzoon infections in wild felids from Carpathian-Danubian-Pontic space: further evidence for a different Cytauxzoon species in European felids. *The Journal of parasitology*, 102(3), 377–380.

- Gallusová, M., Jirsová, D., Mihalca, A. D., Gherman, C. M., D'Amico, G., Qablan, M. A. et Modrý, D. (2016b). Cytauxzoon infections in wild felids from Carpathian-Danubian-Pontic space: further evidence for a different Cytauxzoon species in European felids. *The Journal of parasitology*, *102*(3), 377–380.
- Garner, M. M., Lung, N. P., Citino, S., Greiner, E. C., Harvey, J. W. et Homer, B. L. (1996). Fatal cytauxzoonosis in a captive-reared white tiger (*Panthera tigris*). *Veterinary pathology*, *33*(1), 82–86.
- Haydon, D. T., Cleaveland, S., Taylor, L. H. et Laurenson, M. K. (2002). Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging infectious diseases*, *8*(12), 1468–1473.
- Holman, P. J. et Snowden, K. F. (2009). Canine Hepatozoonosis and Babesiosis, and Feline Cytauxzoonosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *39*(6), 1035-1053.
- Jakob, W. et Wesemeier, H.-H. (1996). A fatal infection in a Bengal tiger resembling cytauxzoonosis in domestic cats. *Journal of comparative pathology*, *114*(4), 439–444.
- Jefferies, R., Ryan, U. M., & Irwin, P. J. (2007). PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology*, *144*(1-2), 20-27.
- Kier, A. B., Wagner, J. E. et Kinden, D. A. (1987). The pathology of experimental cytauxzoonosis. *Journal of comparative pathology*, *97*(4), 415–432.
- Kim, E.-J., Bauer, C., Grevelding, C. G. et Quack, T. (2013). Improved PCR/nested PCR approaches with increased sensitivity and specificity for the detection of pathogens in hard ticks. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *4*(5), 409-416.
- Lack, J. B., Reichard, M. V. et Van Den Bussche, R. A. (2012). Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. *International Journal for Parasitology*, *42*(4), 353-363.
- Léger, N., Ferte, H., Berthelot, P., Nourry, D. et Brocvielle, P. (1992). Un cas de babésiose féline en Haute-Saône, France. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, (94), 249-252.
- Legroux, J.-P., Halos, L., René-Martellet, M., Servonnet, M., Pingret, J.-L., Bourdoiseau, G., Chabanne, L. (2017). First clinical case report of Cytauxzoon sp. infection in a domestic cat in France. *BMC Veterinary Research*, *13*(1).
- Lloyd-Smith, J. O., Cross, P. C., Briggs, C. J., Daugherty, M., Getz, W. M., Latto, J., Swei, A. (2005). Should we expect population thresholds for wildlife disease? *Trends in Ecology & Evolution*, *20*(9), 511-519.

- Luaces, I., Aguirre, E., García-Montijano, M., Velarde, J., Tesouro, M. A., Sánchez, C., Sainz, Á. (2005). First Report of an Intraerythrocytic Small Piroplasm in Wild Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 41(4), 810-815.
- Marsot, M. (2011). *Modification du risque d'une maladie multi-hôtes suite à l'introduction d'une espèce réservoir: cas de la maladie de Lyme et du tania de Sibérie en Ile-de-France*. Thèse de doctorat. Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement, discipline Ecologie. Clermont-Ferrand : Université Blaise Pascal. 231p.
- Meinkoth, J. H. et Kocan, A. A. (2005). Feline cytauxzoonosis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 35(1 SPEC. ISS.), 89-101.
- Molinari, P., Bionda, R., Carmignola, G., Filacorda, S., Groff, C., Mingozzi, T. et Molinari-Jobin, A. (2012). Status and distribution of the lynx (*Lynx lynx*) in the Italian Alps 2005-2009. *Acta Biol. Slovenica*, 55, 35–41.
- Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J. et de la Fuente, J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology*, 127(1-2), 1-9.
- Nentwig, A., Meli, M. L., Schrack, J., Reichler, I. M., Riond, B., Gloor, C., Willi, B. (2018). First report of *Cytauxzoon* sp. infection in domestic cats in Switzerland: natural and transfusion-transmitted infections. *Parasites & Vectors*, 11(1).
- Nugent, G. (2011). Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: A New Zealand case study. *Veterinary Microbiology*, 151(1-2), 34-42.
- Palmer, M. V. (2013). *Mycobacterium bovis* : Characteristics of Wildlife Reservoir Hosts. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60, 1-13.
- Payne, A. (2014). *Rôle de la faune sauvage dans le système multi-hôtes de Mycobacterium bovis et risque de transmission entre faune sauvage et bovins: étude expérimentale en Côte d'Or*. Thèse de doctorat. Lyon : Université Claude Bernard-Lyon I. 366p.
- Reichard, M. V., Meinkoth, J. H., Edwards, A. C., Snider, T. A., Kocan, K. M., Blouin, E. F. et Little, S. E. (2009). Transmission of *Cytauxzoon felis* to a domestic cat by *Amblyomma americanum*. *Veterinary Parasitology*, 161(1-2), 110-115.
- Reichard, M. V., Thomas, J. E., Arther, R. G., Hostetler, J. A., Raetzl, K. L., Meinkoth, J. H. et Little, S. E. (2013). Efficacy of an Imidacloprid 10 % / Flumethrin 4.5 % Collar (Seresto®, Bayer) for Preventing the Transmission of *Cytauxzoon felis* to Domestic Cats by *Amblyomma americanum*. *Parasitology Research*, 112(S1), 11-20.

- Reichard, M. V., Van Den Bussche, R. A., Meinkoth, J. H., Hoover, J. P. et Kocan, A. A. (2005b). A NEW SPECIES OF CYTAUXZOOON FROM PALLAS' CATS CAUGHT IN MONGOLIA AND COMMENTS ON THE SYSTEMATICS AND TAXONOMY OF PIROPLASMIDS. *Journal of Parasitology*, 91(2), 420-426.
- Reichard, M. V., Baum, K. A., Cadenhead, S. C. et Snider, T. A. (2008). Temporal occurrence and environmental risk factors associated with cytauxzoonosis in domestic cats. *Veterinary Parasitology*, 152(3-4), 314-320.
- Schreeg, M. E., Marr, H. S., Tarigo, J., Cohn, L. A., Levy, M. G. et Birkenheuer, A. J. (2013). Pharmacogenomics of *Cytauxzoon felis* Cytochrome b: Implications for Atovaquone and Azithromycin Therapy in Domestic Cats with Cytauxzoonosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), 3066-3069.
- Schreeg, Megan E., Marr, H. S., Griffith, E. H., Tarigo, J. L., Bird, D. M., Reichard, M. V., Birkenheuer, A. J. (2016). PCR amplification of a multi-copy mitochondrial gene (cox3) improves detection of *Cytauxzoon felis* infection as compared to a ribosomal gene (18S). *Veterinary Parasitology*, 225, 123-130.
- Schreeg, Megan E., Marr, H. S., Tarigo, J. L., Cohn, L. A., Bird, D. M., Scholl, E. H., ...Birkenheuer, A. J. (2016). Mitochondrial Genome Sequences and Structures Aid in the Resolution of Piroplasmida phylogeny. *PloS one*, 11(11), e0165702.
- Sherrill, M. K. et Cohn, L. A. (2015). Cytauxzoonosis Diagnosis and treatment of an emerging disease. *Journal of feline medicine and surgery*, 17(11), 940-948.
- Shock, B. C., Murphy, S. M., Patton, L. L., Shock, P. M., Olfenbuttel, C., Beringer, J., Yabsley, M. J. (2011). Distribution and prevalence of *Cytauxzoon felis* in bobcats (*Lynx rufus*), the natural reservoir, and other wild felids in thirteen states. *Veterinary Parasitology*, 175(3-4), 325-330.
- Tarigo, J. L., Scholl, E. H., Bird, D. M., Brown, C. C., Cohn, L. A., Dean, G. A., Birkenheuer, A. J. (2013). A Novel Candidate Vaccine for Cytauxzoonosis Inferred from Comparative Apicomplexan Genomics. *PLoS ONE*, 8(8), e71233.
- Tong, S. Y. C. et Giffard, P. M. (2012). Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), 3418-3421.
- Veronesi, F., Ravagnan, S., Cerquetella, M., Carli, E., Olivieri, E., Santoro, A., Capelli, G. (2016). First detection of *Cytauxzoon* spp. infection in European wildcats ( *Felis silvestris silvestris* ) of Italy. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 853-858.
- Visée, E. (2008). *Intérêt de l'amplification génique (PCR) pour diagnostiquer les piroplasmoses canines en France*. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Créteil. 166p.

- Webster, J. P., Borlase, A. et Rudge, J. W. (2017). Who acquires infection from whom and how? Disentangling multi-host and multi-mode transmission dynamics in the ‘elimination’ era. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1719), 20160091.
- Woolhouse, M. E. J., Taylor, L. H. et Haydon, D. T. (2001). Population Biology of Multihost Pathogens, 292, 1109.



## Annexes



**Annexe 1 : Chabanne L, communication personnelle. Table 1.**

Table 1: Clinical history and follow-up of the cat

Timing	Clinical examination	Investigations	Treatment
D-15	Hyperthermia (41°C), lethargy, anorexia Dehydration Weight loss	ND	Injection of corticosteroids? Amoxicillin – Clavulanic acid, 15 mg/kg BID PO 10 days
D0 19.07	Hyperthermia (40.5°C), lethargy, anorexia Haemorrhagic diarrhoea Abdominal pain Subcutaneous hematoma on the abdomen	ND	Marbofloxacin, 2 mg/kg SID PO 10 days Carprofen injection, 4 mg/kg Meloxicam 0.05 mg/kg SID PO 5 days
D7 26 & 27.07	Hyperthermia, lethargy, anorexia Abdominal pain Vomiting Stomatitis	FeLV-FIV test (Witness®, Synbiotics corp.): Negative CBC (Table 2): Neutrophilic leucocytosis, Döhle body inclusions Biochemical parameters (urea, creatinine, glucose, ALT, ALP, triglycerides, lipase): within reference intervals except for triglycerides (7.2 mmol/L, reference range : ) Abdominal US: Splenomegaly	Hospitalization Maropitant SC injection, 1 mg/kg Amoxicillin SC injection, 15 mg/kg
D9	Improvement, persisting anorexia without vomiting nor diarrhoea	ND	Hospital discharge Amoxicillin trihydrate (Duphamox LA®) SC injection, 15 mg/kg every other day for 1 week
D18 06.08	Persisting anorexia Abdominal pain	CBC (Table 2)	
D21 09.08		CBC (Table 2) Direct antiglobulin test negative PCR <i>Babesia/Theileria</i> spp. positive PCR <i>Mycoplasma haemofelis</i> and <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> negative	Cefovecine SC injection, 8 mg/kg Dexamethasone tebutate SC injection, 0.1 mg/kg
D29 17.08	Persisting lethargy Dysorexia Episode Hyperthermia Episode Vomiting	Blood smear: Erythrocyte inclusions	

D38 26.08		Blood smear: Erythrocyte inclusions PCR <i>Babesia/Theileria</i> spp. positive: <b>sequencage</b> <i>Cytauxzoon</i> spp.	Imidocarb diproponiate SC injection, 3.5 mg/kg
D40 28.08	Hyperthermia Vomiting	ND	
D46 03.09	Improvement	CBC (Table 2) Biochemical parameters (urea, creatinine, ALT): within reference	
D55 12.09	Good physical condition	Blood smear: negative	
D72 29.09	Hyperthermia, lethargy, anorexia Stomatitis	CBC (Table 2) <i>Cytauxzoon sp.</i> PCR: Positive Thoracic X-Ray: Absence of abnormalities Teeth X-Ray: Absence of abnormalities Calicivirus and Feline Herpesvirus PCR on oropharyngeal swabs: Negative	Imidocarb diproponiate SC injection, 3.5 mg/kg
D78 05.10	Improvement, oropharyngeal examination: Normal	CBC (Table 2) <b>Protidogramm</b> : Hyperprotidemia (91 g/L – Reference range: 57 – 94) with hyperglobulinemia	
D83 10.10	Death:	<b>Autopsie</b> Liver, kidney, spleen, iliac lymph node, lung, medulla histology Lung, spleen and moelle os cytology: PCR	

Annexe 2 : Chabanne L, communication personnelle. Table 2.

Parameter (unit)	Reference range	27.07 D7	06.08 D18	09.08 D21	03.09 D46	29.09 D72	05.10 D78
RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	5 – 10	8.00	6.75	7.84	7.26	8.25	8.73
Haemoglobin (g/dL)	9 – 15	12.2	10.4	10.2	11.5	11.5	11.5
Haematocrit (%)	28 – 45	36.0	30.8	37.0	33.3	37.1	28
CMV (fL)	40 – 55	45	46	47	46	45	32
MCHC (%)	31 – 35	33.9	34.5	28.0	34.5	30.7	41
Reticulocytes ( $10^6/\mu\text{L}$ )		ND	ND	ND	ND	ND	8,730
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	5 – 11	25.3	14.5	12.8	11.0	12.4	15.0
Neutrophils ( $/\mu\text{L}$ )	3,000 – 11,000	17,700	5,700	9,250	5,400	5,800	7,600
Eosinophils ( $/\mu\text{L}$ )	0 – 600	1,800	150	0	300	500	950
Monocytes ( $/\mu\text{L}$ )	0 – 500	500	1,850	550	450	150	550
Lymphocytes ( $/\mu\text{L}$ )	1,000 – 6,000	5,300	6,500	3,000	4,850	5,950	5,900
Platelets ( $10^3/\mu\text{L}$ )	150 – 550	165	441	370	300	385	305
Blood smear			Erythrocyte inclusions	Erythrocyte inclusions 2 by	Erythrocyte inclusions??	Erythrocyte inclusions	

D55: Blood smear negative

## Annexe 3 : Fiche d'information aux vétérinaires



### Étude de prévalence d'infection à *Cytauxzoon sp.* dans les départements du Jura, de l'Ain et des zones limitrophes



#### 1. Objectifs de l'étude

La cytauxzoonose est une maladie infectieuse émergente due à un protozoaire du genre *Cytauxzoon*, apparenté aux *Babesia* et *Theileria* (piroplasmes). Bien connue en Amérique du Nord, cette maladie souvent mortelle est transmise au chat par des tiques dures et son réservoir principal est le Lynx (Lynx roux en Amérique du Nord).

En Europe, des cas d'infections asymptomatiques et des formes cliniques à priori plus bénignes que la maladie nord-américaine commencent à être documentés chez le chat dans certaines régions, notamment où le Lynx est présent (Espagne, Italie, Suisse, Portugal). En France, ce parasite a été occasionnellement décrit.

Le but de notre étude est de déterminer la prévalence des infections à *Cytauxzoon sp.* chez le Chat et le Lynx dans le département du Jura et les zones limitrophes. Un cas de cytauxzoonose a été documenté récemment chez le Chat en Côte d'or, nous avons néanmoins choisi de nous intéresser en premier lieu aux départements du Jura, de l'Ain et aux zones limitrophes, connues pour leurs populations de Lynx.

#### 2. Déroulement

##### Plusieurs scénarios :

- ✓ Lorsque vous réalisez une prise de sang sur un chat, nous vous demandons de préserver ce qu'il reste du prélèvement, de manière anonyme.
- ✓ Si vous effectuez des soins sur des chats errants ou sauvages, nous vous demandons de réaliser un prélèvement.
- ✓ Avec l'accord des propriétaires, vous pouvez réaliser directement une prise de sang à destination de l'étude uniquement. Dans ce cas, nous vous demandons de faire signer une fiche de consentement éclairé aux propriétaires.

**Sélection des animaux prélevés :** Chats ayant un accès à l'extérieur.

**Prélèvement :** Sang total sur tube EDTA (idéalement 2mL, minimum 0.5mL).

**Conservation de l'échantillon :** Congélation.

##### Devenir de l'échantillon :

Nous procédons régulièrement à l'enlèvement des échantillons stockés dans votre clinique. Nous réalisons ensuite une analyse PCR dans le but de détecter la présence ou non du protozoaire.

Nous vous communiquons ensuite les résultats obtenus.

#### 3. Contact

Pour toute information complémentaire, n'hésitez pas à me contacter (Clara BOHIN) au ou par mail à l'adresse

#### Annexe 4 : Fiche de consentement éclairé des propriétaires.



#### Fiche de consentement éclairé

#### « Etude de prévalence d'infection à Cytosporidium sp. dans les départements du Jura et de Côte d'or »

La personne soussignée :

- Certifie avoir été informée sur les objectifs et le déroulement de l'étude ci-dessus.
- Affirme avoir compris les informations fournies, informations à propos desquelles il a pu poser toutes les questions qu'il souhaitait.
- Certifie avoir été informée des avantages et des risques éventuels qui sont associés à cette étude, et des contraintes qu'impliquait sa participation à cette étude.
- Atteste qu'un temps de réflexion suffisant lui a été accordé.
- A été informée du fait qu'elle pouvait interrompre à tout instant sa participation à cette étude sans préjudice d'aucune sorte.
- Consent à ce que les données recueillies pendant l'étude puissent être transmises à des personnes extérieures (chercheurs d'autres institutions), elles-mêmes tenues à respecter la confidentialité de ces informations.
- S'engage à informer la personne responsable de tout phénomène inattendu pouvant survenir durant cette étude.

De plus,

J'accepte d'être recontacté pour donner des informations complémentaires.  Oui  Non

- Numéro de téléphone : .....
- Email : .....

Le soussigné accepte donc de participer à l'étude mentionnée ci-dessus.

Nom, prénom du propriétaire :

.....

Date et signature :

.....

#### Nom et coordonnées des personnes responsables :

Emmanuelle Gilot-Fromont, Docteur vétérinaire  
Unité Epidémiologie  
Vetagro Sup, Campus vétérinaire de Lyon  
1, avenue Bourgelat  
69280 Marcy l'Etoile  
04 78 87 25 20

Luc Chabanne, Docteur vétérinaire  
Unité Pathologie Médicale des Animaux de Compagnie  
Vetagro Sup, Campus vétérinaire de Lyon  
1, avenue Bourgelat  
69280 Marcy l'Etoile  
04 78 87 26 12

## Annexe 5 : Fiche d'information aux propriétaires de chats.



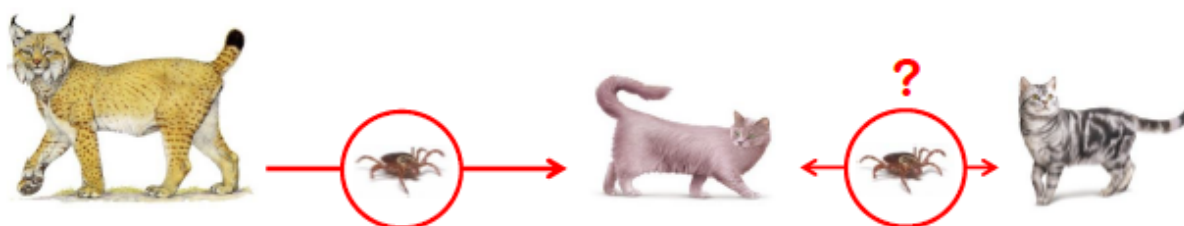
### Fiche d'information

« Etude de prévalence d'infection à *Cytauxzoon* sp. chez le Chat et le Lynx dans les départements du Jura et de Côte d'or »

## 1 Objectifs de l'étude

Un cas d'infection à *Cytauxzoon* sp. a récemment été détecté chez un chat de Côte d'or. Nous cherchons à savoir si ce parasite, autrefois présent uniquement sur le continent américain, est en cours d'implantation dans la région et notamment dans les populations de chats domestiques et sauvages.

Ce parasite sanguin serait transmis du Lynx au Chat par les tiques. Nous étudions aussi la possibilité d'une transmission entre chats.



## 2 Déroulement

Nous vous demandons de bien vouloir remplir un questionnaire d'information concernant votre chat. S'il rentre dans les paramètres de l'étude, une prise de sang est alors effectuée sur votre chat.

Le sang est ensuite conservé puis transporté jusqu'à l'Ecole Vétérinaire de Lyon pour analyse. L'analyse consiste en une recherche du parasite *Cytauxzoon* sp. dans les globules rouges. Nous vous communiquons le résultat obtenu à partir du sang de votre chat.

Si besoin, nous pouvons potentiellement vous recontacter afin de préciser certaines informations concernant votre animal (lieux fréquentés par votre animal, rapport avec des congénères,...).

### Nom et coordonnées des personnes responsables :

Emmanuelle Gilot-Fromont, Docteur vétérinaire  
Unité Epidémiologie  
Vetagro Sup, Campus vétérinaire de Lyon  
1, avenue Bourgelat  
69280 Marcy l'Etoile  
04 78 87 25 20

Luc Chabanne, Docteur vétérinaire  
Unité Pathologie Médicale des Animaux de Compagnie  
Vetagro Sup, Campus vétérinaire de Lyon  
1, avenue Bourgelat  
69280 Marcy l'Etoile  
04 78 87 26 12



Partie à remplir par le propriétaire du chat

Partie à remplir par le vétérinaire

**1. Fiche d'identité de l'animal**

- 1.1. Race  
 Européen       Chat de race : .....  
 Croisé chat domestique       Croisé chat sauvage
- 1.2. Date de naissance : .....
- 1.3. Sexe       Mâle       Femelle
- 1.4. Animal stérilisé       Oui       Non

**2. Mode de vie de l'animal**

- 2.1. Lieu de vie (adresse et/ou code postal) : .....
- 2.2. Mode de vie  
 Chat toujours à l'extérieur  
 Chat libre de rentrer et sortir, qui passe la nuit dehors  
 Chat libre de rentrer et sortir mais qui ne passe jamais la nuit dehors  
 Chat toujours à l'intérieur
- 2.3. Lorsqu'il est dehors ...  
 ... est-il en contact avec d'autres chats ?       Oui       Non  
 ... a-t-il accès à une zone boisée ?       Oui       Non  
 ... reste-t-il dans le jardin/résidence/quartier ?       Oui       Non

**3. Clinique**

- 3.1. Signes cliniques de l'animal       Oui       Non
- Anémie .....  
 Si oui, la caractériser : .....
- Leucopénie       Oui       Non  
 Thrombocytopénie       Oui       Non  
 Hyperglycémie       Oui       Non  
 Hypokaliémie       Oui       Non  
 Hypocholéstérolémie       Oui       Non  
 ALAT augmentées       Oui       Non  
 PAL augmentées       Oui       Non

3.2. L'animal est-il traité contre les tiques ?       Oui       Non

3.2.1. Si oui, quel est le dernier traitement administré ?  
 .....

3.2.2. A quelle fréquence le traitement est-il administré ?  
 .....

3.2.3. Quelle est la date de la dernière administration ?  
 .....

3.3. L'animal a-t-il été testé positif ...

- ...au FIV ?       Oui       Non  
 ...au FeLV ?       Oui       Non  
 ...au coronavirus ?       Oui       Non

**4. Motif de prélèvement sanguin**

- Animal cliniquement sain mais exposé au parasite       Oui       Non  
 Animal malade       Oui       Non  
 Motif de consultation : .....



## Fiche de commémoratifs de l'animal

Animal vivant     Cadavre

### 1. Fiche d'identité de l'animal

1.1. Espèce

- Lynx  
 Chat forestier  
 Croisé chat forestier

1.2. Age estimé : .....

1.3. Sexe     Mâle     Femelle

1.4. Dernière localisation connue :

.....

1.5. Contexte entourant la venue de l'animal au Ida39

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### 2. Nature du prélèvement

Prise de sang

Autre prélèvement (à préciser) :  
 .....

### 3. Signes cliniques

Anémie     Oui     Non     Ne sais pas

Si oui, pouvez-vous la caractériser : .....

Fièvre prolongée     Oui     Non     Ne sais pas

Syndrome algique     Oui     Non     Ne sais pas

Hémoglobinurie     Oui     Non     Ne sais pas

Dyspnée     Oui     Non     Ne sais pas

Splénomégalie     Oui     Non     Ne sais pas

Hépatomégalie     Oui     Non     Ne sais pas

### 4. Examens complémentaires : résultats à joindre au prélèvement si possible.

.....

.....

.....

.....

**Annexe 8 : Résultats obtenus après extraction et analyse PCR. Echantillons de sang sur EDTA 1A à 2J.**

**Préparation MIX PCR**

**G. Babésia/Theileria/Cytauxzoon selon Jefferies et al., 2007**

PCR 27.06.2018

Gel du : 2106.2018

**Extraction qiagen**

**Mix**

**Hotstartaq 5U/μL**

BTF1 : 5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3'

BTR1 : 5'-CCCAAAGACTTTGATTCTCTC-3'

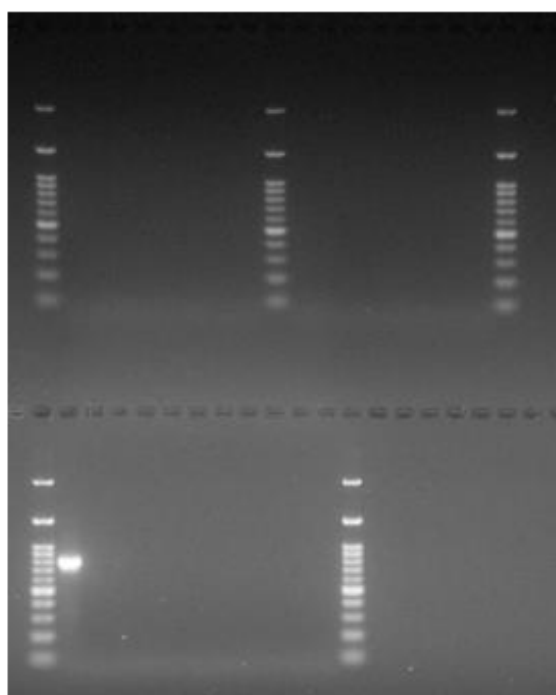
BTF2 : 5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3'

BTR2 : 5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3'

Gel agarose 1,5%

T+ : BCC 1/100 ED Magali

Gel 1 haut					dépôt		Résultat	Gel 1 Bas					dépôt		Résultat
puit	N°	Ref.	Ech (dl)	V mix	PCR			puit	n°	Ref.	V Ech (dil)	V mix	PCR		
1		LADDER 1 kb						1		LADDER 1 kb					
2		1A	1	24	-			2		T+ 1/100	1	24	+		
3		1B	1	24	-			3		T-	1	24	-		
4		1C	1	24	-			4		2B	1	24	-		
5		1D	1	24	-			5		2C	1	24	-		
6		1E	1	24	-			6		2D	1	24	-		
7		1F	1	24	-			7		2E	1	24	-		
8		1G	1	24	-			8		2F	1	24	-		
9		1H	1	24	-			9		2G	1	24	-		
10		1I	1	24	-			10		2H	1	24	-		
11		1J	1	24	-			11		2I	1	24	-		
12		1K	1	24	-			12		2J	1	24	-		
13		1L	1	24	-			13		LADDER 1 kb					
14		1M	1	24	-										
15	15	1N	1	24	-										
17	17	2A	1	24	-										



**Annexe 9 : Résultats obtenus après extraction et analyse PCR. Echantillons de sang sur EDTA 2K à 7J.**

Préparation MIX PCR  
G. Babésia/Theileria/Cytauxzoon selon Jefferies et al., 2007

PCR 28.06.2018

Gel du : 2 06.2018

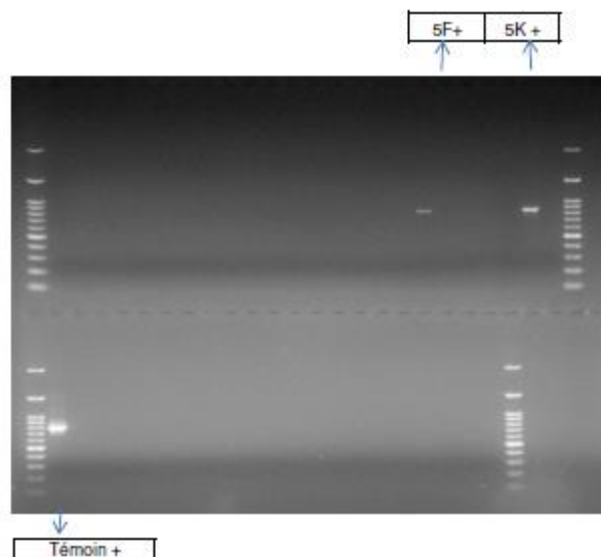
Extraction qiagen  
Mix  
Hotstartaq 5U/μL

BTF1 : 5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3'  
BTR1 : 5'-CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3'  
BTF2 : 5'-COGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3'  
BTR2 : 5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3'

Gel agarose 1,5%  
T+ : BCC 1/100 ED Magali

Gel 1 haut			dépôt		Résultat
puit	N°	Ref.	Ech (dil)	V mix	PCR
1		LADDER 1 kb			
2	2K		1	24	-
3	2L		1	24	-
4	3A		1	24	-
5	3B		1	24	-
6	3C		1	24	-
7	3D		1	24	-
8	4A		1	24	-
9	4B		1	24	-
10	4C		1	24	-
11	4D		1	24	-
12	4E		1	24	-
13	4F		1	24	-
14	5A		1	24	-
15	5B		1	24	-
16	5C		1	24	-
17	5D		1	24	-
18	5E		1	24	-
19	5F		1	24	+
20	5G		1	24	-
21	5H		1	24	-
22	5I		1	24	-
23	5J		1	24	-
24	5K		1	24	+
25	6A		1	24	-

Gel 1 Bas			dépôt		Résultat
puit	n°	Ref.	V Ech (dil)	V mix	PCR
1		LADDER 1 kb			
2		T+ 1/100	1	24	+
3	6B		1	24	-
4	6C		1	24	-
5	6D		1	24	-
6	6E		1	24	-
7	6F		1	24	-
8	6G		1	24	-
9	6H		1	24	-
10	6I		1	24	-
11	6J		1	24	-
12	6K		1	24	-
13	7A		1	24	-
14	7B		1	24	-
15	7C		1	24	-
16	7D		1	24	-
17	7E		1	24	-
18	7F		1	24	-
19	7G		1	24	-
20	7H		1	24	-
21	7I		1	24	-
22	7J		1	24	-
23		LADDER 1 kb			



**Annexe 10 : Résultats obtenus après extraction et analyse PCR. Echantillons de sang sur EDTA 7K à 8J.**

**Préparation MIX PCR**

**G.Babésia/Theileria/Cytauxzoon selon Jefferies et al., 2007**

**PCR 04.07.2018**

**Gel du : 0.07.2018**

**Extraction qiagen**

BTF1 : 5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3'

**Mix**

BTR1 : 5'-CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3'

**Hotstartaq 5U/μL**

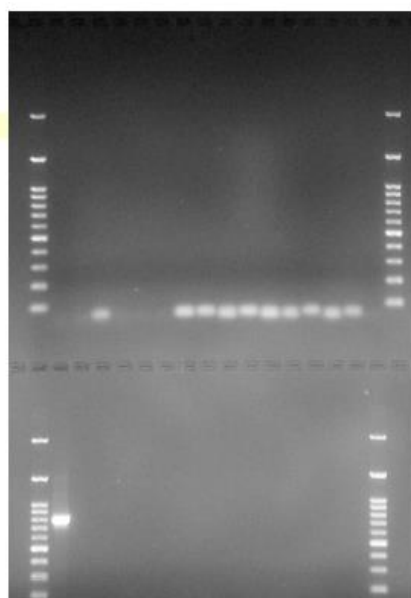
BTF2 : 5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3'

BTR2 : 5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3'

Gel agarose 1,5%

T+ : BCC 1/100 ED Magali

Gel 1 haut			dépôt		Résultat	Gel 1 Bas			dépôt		Résultat
puit	N°	Ref.	Ech (dil)	V mix	PCR	puit	n°	Ref.	V Ech (dil)	V mix	PCR
1		LADDER 1 kb				1		LADDER 1 kb			
2		7K	1	24	-	2		T+ 1/100	1	24	+
3		7L	1	24	-	3		T-	1	24	-
4		7M	1	24	-	4		7α	1	24	-
5		7N	1	24	-	5		7β	1	24	-
6		7O	1	24	-	6		7γ	1	24	-
7		7P	1	24	-	7		8A	1	24	-
8		7Q	1	24	-	8		8B	1	24	-
9		7R	1	24	-	9		8C	1	24	-
10		7S	1	24	-	10		8D	1	24	-
11		7T	1	24	-	11		8E	1	24	-
12		7U	1	24	-	12		8F	1	24	-
13		7V	1	24	-	13		8G	1	24	-
14		7W	1	24	-	14		8H	1	24	-
15	15	7X	1	24	-	15		8I	1	24	-
16	16	7Y	1	24	-	16		8J	1	24	-
17	17	7Z	1	24	-	17		LADDER 1 kb			



**Annexe 11 : Résultats obtenus après extraction et analyse PCR. Echantillons de rate Lx3 et Lx4.**

**Préparation MIX PCR**

*G. Babésia/Theileria/Cytauxzoon* selon Jefferies et al., 2007

PCR 05.07.2018

Gel du : 07.2018

**Extraction qiagen**  
**Mix**  
**Hotstartaq 5U/μL**

BTF1 : 5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3'

BTR1 : 5'-CCCAAAGACTTTGATTCTCTC-3'

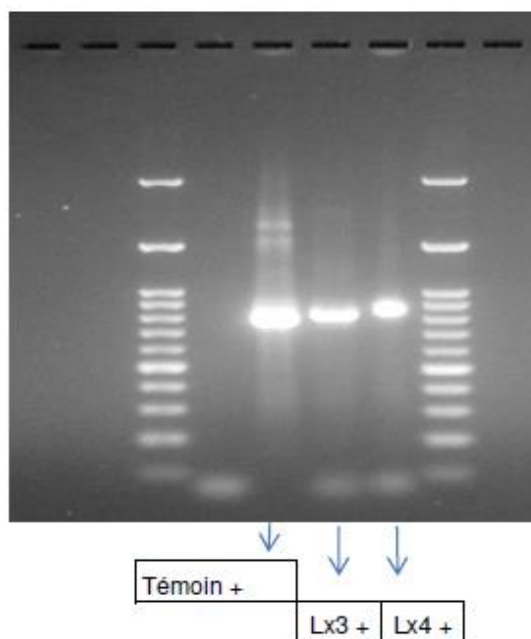
BTF2 : 5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3'

BTR2 : 5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3'

Gel agarose 1,5%

T+ : BCC 1/100 ED Magali

Gel			dépôt		Résultat
puit	N°	Ref.	Ech (dl)	V mix	PCR
1		LADDER 1 kb			
2		T-	1	24	-
3		T+ 1/100	1	24	+
4		Lx3 rate	1	24	+
5		Lx4 rate	1	24	+
		LADDER 1 kb			



**Annexe 12 : Résultats obtenus après extraction et analyse PCR. Echantillons de sang sur EDTA Lx1 à Lx4.**

**Préparation MIX PCR**  
*G. Babésia/Theileria/Cytauxzoon* selon Jefferies et al., 2007

PCR 05.07.2018

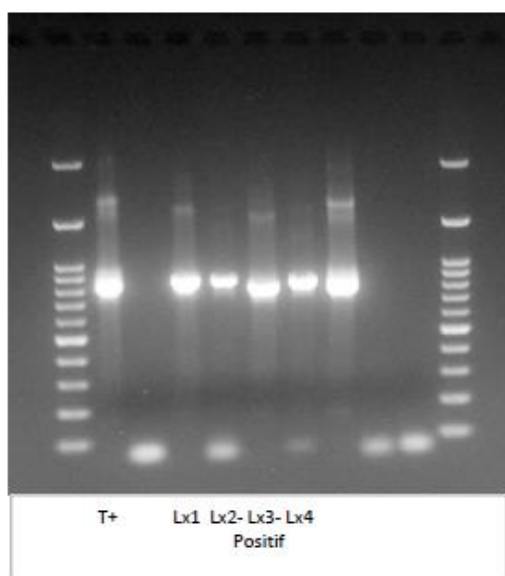
Gel du : 1 07.2018

**Extraction qiagen**  
**Mix**  
**Hotstartaq 5U/μL**

BTF1 : 5'-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3'  
 BTR1 : 5'-CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3'  
 BTF2 : 5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3'  
 BTR2 : 5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3'

Gel agarose 1,5%  
 T+ : BCC 1/100 ED Magali

Gel			dépôt		Résultat
puit	N°	Ref.	Ech (dl)	V mix	PCR
1		LADDER 1 kb			
2		T+ 1/100	1	24	+
3		T-	1	24	-
4		Lx1 sang	1	24	+
5		Lx2 sang	1	24	+
6		Lx3 sang	1	24	+
		Lx4 sang	1	24	+
		LADDER 1 kb			



**BOHIN Clara**

**ETUDE DE PREVALENCE D'INFECTION A CYTAUXZOOM SP. DANS LA ZONE D'OCCUPATION DU LYNX (LYNX LYNX) EN FRANCE.**

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 23 octobre 2018

**RESUME :**

La cytauxzoonose féline est une protozoose infectieuse, inoculable et non contagieuse affectant les félinés sauvages et domestiques en Amérique du Nord. L'agent responsable de la maladie, *Cytauxzoon felis* (protozoaire du groupe des Apicomplexa ou sporozoaires, ordre des Piroplasmida ou piroplasmés, famille des Theileriidae) se développe dans les érythrocytes et le système réticulo-endothélial. Chez le chat domestique (*Felis catus*), il entraîne l'apparition d'un syndrome pyrétique et hémolytique, caractérisé par une anémie accompagnée d'ictère, avec présence d'inclusions intra-érythrocytaires observables sur le frottis sanguin. La maladie conduit dans une grande majorité des cas à la mort des chats infectés.

En France, après une première description mettant en évidence la présence d'ADN de *Cytauxzoon sp.* sur des prélèvements sanguins de chat (Criado-Fornelio et al., 2009), un cas de cytauxzoonose est identifié en 2014 chez un chat domestique vivant en Côtes d'Or (Legroux et al., 2017). On peut dès lors s'interroger sur l'importance de l'infection du chat (*Felis catus*) et des autres félinés sauvages (*Lynx lynx* et *Felis silvestris*) par *Cytauxzoon sp.* en France.

Ces éléments sont à l'origine d'un travail d'enquête centré sur les départements du Jura, de l'Ain, de la Haute-Savoie et du Doubs, régions habitées en France par le lynx (*Lynx lynx*) prenant comme hypothèse que ce dernier puisse être réservoir de *Cytauxzoon sp.*

Nous avons pu mettre en évidence la présence du parasite à la fois chez le chat domestique et chez le lynx avec une prévalence significativement plus importante chez ce dernier. Un séquençage de l'ADN extrait de ces échantillons permettra d'identifier et de classer le parasite.

**MOTS CLES :**

- Chat
- Lynx
- Protozoaire
- Tique

**JURY :**

Président : Monsieur le Professeur Olivier CLARIS

1er Assesseur : Monsieur le Professeur Luc CHABANNE

2ème Assesseur : Madame le Professeur Emmanuelle GILOT-FROMONT

**DATE DE SOUTENANCE : 23 octobre 2018**