

EHRlichia phagocytophila :
ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES,
HEMATOLOGIQUES ET SEROLOGIQUES
DE L'INFECTION CHEZ LES BOVINS EN SUISSE

par

Jorge S. Liz

Licencié en Biologie

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de
Docteur ès Sciences

1994

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Ehrlichia phagocytophila: Aspects épidémiologiques, hématologiques et sérologiques de l'infection chez les bovins en Suisse

de Monsieur Jorge Liz

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs K. Pfister, A. Aeschlimann,

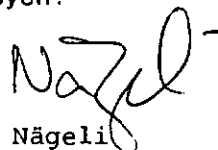
M. Brossard, J.-F. Graf (St-Aubin) et

G. Uilenberg (Maisons-Alfort)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 27 juin 1994

Le doyen :



H.-H. Nägeli

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
2. GENERALITES	2
2. 1. Caractéristiques et aspects systématiques des <i>Ehrlichieae</i>	2
2. 2. <i>Ehrlichia phagocytophila</i>	3
2. 2. 1. Morphologie et ultrastructure.	3
2. 2. 2. Historique	4
2. 2. 3. Epidémiologie	5
2. 2. 3. 1. Multiplication dans l'hôte vertébré	5
2. 2. 3. 2. Hôtes et réservoirs	6
2. 2. 3. 3. Vecteurs	7
2. 2. 3. 4. Répartition géographique	8
2. 2. 4. Manifestations cliniques	8
2. 2. 5. Pathologie	10
2. 2. 6. Culture <i>in vitro</i>	13
2. 2. 7. Immunité	14
2. 2. 8. Diagnostic	15
2. 2. 9. Traitement	18
2. 3. Revue des connaissances actuelles des autres <i>Ehrlichia spp.</i>	18
2. 4. Les infections à <i>Ehrlichia spp.</i> en Suisse	23
3. BUT DU TRAVAIL	25

4. MATERIEL ET METHODES	26
4. 1. Hôtes	26
4. 1. 1. Les bovins	26
4. 1. 1. 1. Recherche des foyers d'infections à <i>E. phagocytophila</i> en Suisse	26
4. 1. 1. 2. Enquête sérologique dans l'ouest de l'Oberland bernois	26
4. 1. 1. 3. Infections expérimentales	27
4. 1. 2. Les mammifères sauvages	28
4. 1. 3. Les micromammifères sauvages	29
4. 1. 4. Les tiques	30
4. 2. Mise en évidence d' <i>E. phagocytophila</i>	30
4. 2. 1. Détection directe	30
4. 2. 2. Détection indirecte	31
4. 3. Infections expérimentales (Infex)	31
4. 3. 1. Infection de bovins avec du sang contaminé par <i>E. phagocytophila</i>	31
4. 3. 1. 1. Souches utilisées	31
a. Provenance	31
b. Isolation	32
c. Conservation	32
4. 3. 1. 2. Inoculation des animaux	32
4. 3. 1. 3. Contrôles des infections	32
4. 3. 2. Repas sanguins des tiques sur les animaux infectés	33
4. 3. 2. 1. Adultes	33
4. 3. 2. 2. Nymphes et larves	33

4. 3. 2. 3.	Conservation des tiques	33
4. 3. 3.	Infection de bovins avec des tiques	34
4. 4.	Production de l'antigène	34
4. 4. 1.	Prélèvement du sang chez les animaux infectés	34
4. 4. 2.	Isolation et culture d' <i>E. phagocytophila</i> dans des neutrophiles	34
4. 4. 3.	Contrôles des cultures	35
4. 4. 4.	Préparation des lames d'antigène	36
4. 4. 5.	Conservation de l'antigène	36
4. 5.	Sérologie: test d'immunofluorescence indirecte (IFI)	36
4. 5. 1.	Les bovins	36
4. 5. 1. 1.	Déroulement du test	36
4. 5. 1. 2.	Conjugué fluorescent	37
4. 5. 1. 3.	Contrôles	37
4. 5. 1. 4.	Seuil de spécificité	38
4. 5. 1. 5.	Analyses de sérums de bovins sur d'autres antigènes rickettsiens	38
a.	Provenance des antigènes	38
b.	Déroulement des tests	38
c.	Conjugués fluorescents	39
d.	Contrôles	39
4. 5. 2.	Les mammifères sauvages	40
4. 5. 3.	Les micromammifères sauvages	40
4. 5. 4.	Les tiques	40
4. 5. 4. 1.	Préparation des lames d'antigène	40
4. 5. 4. 2.	Déroulement du test	41

4. 5. 4. 3. Contrôles	41
4. 6. Hématologie	41
4. 6. 1. Numérotation des érythrocytes, des leucocytes et des thrombocytes	42
4. 6. 2. Détermination de l'hématocrite et dosage de l'hémoglobine	42
4. 6. 3. Etablissement de la formule leucocytaire	42
4. 6. 4. Détection du taux de cellules infectées	43
4. 6. 5. Valeurs hématologiques normales de référence	43
4. 7. Tests statistiques	43
5. RESULTATS ET DISCUSSIONS	45
5. 1. Répartition géographique des cas d'infections à <i>E. phagocytophila</i> chez les bovins en Suisse	45
5. 1. 1. Enquête auprès des vétérinaires	45
5. 1. 2. Cas diagnostiqués	45
5. 1. 3. Discussion	46
5. 2. La fièvre de pâture dans l'ouest de l'Oberland bernois	49
5. 2. 1. Répartition annuelle des cas de maladie	49
5. 2. 2. Etude sérologique du cheptel bovin	50
5. 2. 2. 1. Evolution saisonnière de la séroprévalence	50
5. 2. 2. 2. Influence de l'âge sur l'évolution des titres d'anticorps	52
5. 2. 2. 3. Evolution des titres d'anticorps chez les bovins malades	54
5. 2. 2. 4. Les anticorps colostraux	55

5. 2. 3.	Discussion	55
5. 3.	Les réservoirs sauvages potentiels d' <i>E. phagocytophila</i>	61
5. 3. 1.	Chamois et chevreuils	61
5. 3. 1. 1.	Détection directe de l'agent infectieux	61
5. 3. 1. 2.	Tests sérologiques	61
5. 3. 2.	Rongeurs	62
5. 3. 3.	Discussion	63
5. 4.	<i>E. phagocytophila</i> chez <i>Ixodes ricinus</i>	68
5. 4. 1.	Recherche d' <i>E. phagocytophila</i> dans des tiques gorgées sur des bovins expérimentalement infectés	68
5. 4. 2.	Recherche d' <i>E. phagocytophila</i> dans des tiques récoltées sur le terrain	68
5. 4. 3.	Essai d'infection de bovins avec des tiques	69
5. 4. 4.	Discussion	69
5. 5.	Les infections expérimentales	71
5. 5. 1.	Analyses hématologiques et biologiques	71
5. 5. 1. 1.	Présentation des résultats	71
5. 5. 1. 2.	Parasitémie	72
a.	Neutrophiles	72
b.	Autres cellules	72
5. 5. 1. 3.	Température rectale	73
5. 5. 1. 4.	Leucocytes	74
a.	Lymphocytes	74
b.	Neutrophiles	75
c.	Neutrophiles immatures	76
d.	Eosinophiles	77

e. Basophiles	77
f. Monocytes	78
5. 5. 1. 5. Erythrocytes	78
5. 5. 1. 6. Thrombocytes	79
5. 5. 2. Discussion	88
6. CONCLUSIONS	94
7. RESUME	97
8. ANNEXES	100
9. REMERCIEMENTS	120
10. BIBLIOGRAPHIE	122

1. INTRODUCTION

Une maladie infectieuse du bétail bovin atteint les troupeaux de certaines régions de la Suisse, en particulier dans l'Oberland bernois, à l'ouest du lac de Thoune.

Dans le Niderrsimmental, Bas-Kandertal, Bas-Kiental, Stockental, Diemtigtal, Frutigtal, ainsi que dans les régions de Wimmis, Spiez et Aeschi (cf. Fig. 3), l'infection, communément appelée, fièvre de pâture, mais aussi fièvre de Wattenwil ou fièvre à tiques ("Weidefieber", "Wattenwilfieber" ou "Zeckenfieber"), est un problème endémique. Cette maladie bovine apparaît toutes les années, lors de l'arrivée au printemps, des animaux sur les pâturages. Les symptômes qu'elle provoque sont principalement une forte fièvre et une baisse de la production laitière chez les vaches. On la soupçonne fortement de causer également des avortements.

La maladie est connue depuis des décennies par les propriétaires de bétail. Malgré cela, l'agent pathogène responsable, une bactérie, *Ehrlichia phagocytophila* (*Rickettsiales*, *Rickettsiaceae*), n'a que récemment été isolée dans les granulocytes d'un bovin (Pfister *et al.*, 1987).

La fièvre de pâture est saisonnière, les cas les plus nombreux apparaissent au printemps et en automne. Cette apparition est intimement liée à l'activité des tiques, *Ixodes ricinus* (*Ixodoidea*, *Ixodidae*). La répartition annuelle particulière, le caractère endémique de l'infection, les signes cliniques, ainsi que la présence massive des tiques sur les animaux sont des indices incontestables de fièvre de pâture pour les propriétaires de bétail.

I. ricinus est la tique la plus commune en Suisse. En dehors d'*E. phagocytophila*, elle est porteuse de nombreux autres micro-organismes, dont certains sont pathogènes pour les humains ou les animaux: *Borrelia burgdorferi*, virus FSME, filaire (*Dipetalonema rugosicauda*), trypanosome (*Trypanosoma theileri*), et d'autres rickettsies (*Rickettsia helvetica*, *R. slovaca* et *Coxiella burnetii*) (Wyler *et al.*, 1973; Aeschlimann *et al.*, 1979; Matile, 1982; Burgdorfer *et al.*, 1983; Beati, 1993). Elle joue également un rôle majeur dans la transmission de piroplasmose bovine dans le Clos du Doubs, dans la plaine du Rhône ainsi que dans le sud du Tessin et dans les Grisons (Morisod *et al.*, 1972; Aeschlimann *et al.*, 1975; Brossard et Aeschlimann, 1975; Brossard, 1976; Gern *et al.*, 1982, Gern, 1984; Gern *et al.*, 1988).

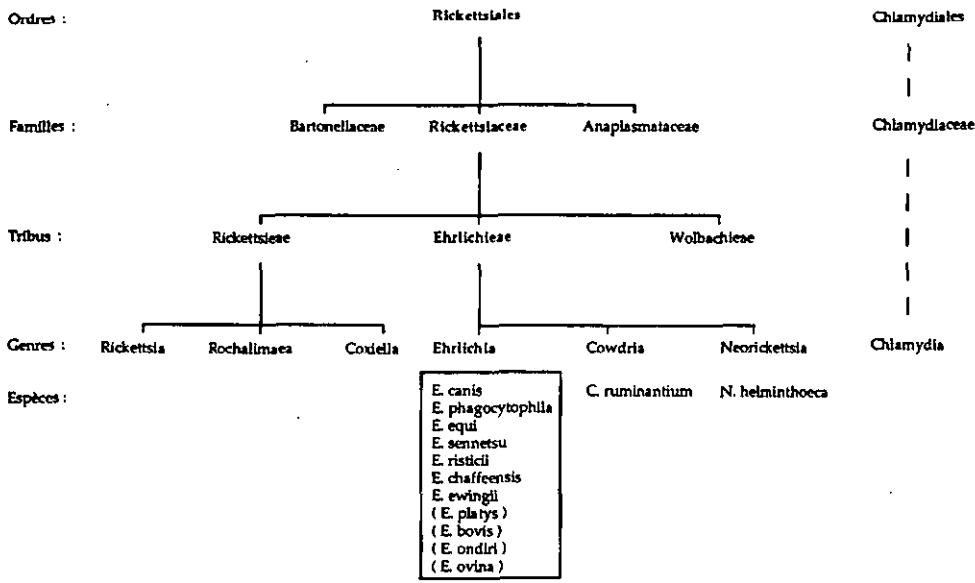


Fig. 1. Systématique du genre Ehrlichia (d'après Ristic et Huxsoll, 1984; Rikihisa, 1991)

2. GENERALITES

2.1. Caractéristiques et aspects systématiques des Ehrlichieae

Ehrlichia phagocytophila Philip, 1962, est une bactérie appartenant à l'ordre des *Rickettsiales* Gieszczykiewick, 1939, et à la famille des *Rickettsiaceae*. Pinkerton, 1936, (Fig. 1). Cette famille de rickettsies constitue un groupe important d'organismes intracellulaires obligatoires, mais relativement pauvre en espèces. Ce sont de petites bactéries Gram négatif de forme ronde ou en bâtonnet, mais le plus souvent polymorphes. Leurs sites de prédilection sont les cellules nucléées sanguines et les cellules endothéliales vasculaires. Ce choix les différencie des deux autres familles de *Rickettsiales*: les *Bartonellaceae* et les *Anaplasmataceae*, parasitant les érythrocytes (Weiss et Moulder, 1984).

Leurs hôtes naturels sont des vertébrés et des invertébrés. Les vecteurs ne sont pas connus pour chaque espèce de *Rickettsiaceae*, néanmoins, les arthropodes semblent jouer un rôle primordial dans la transmission (Weiss et Moulder, 1984).

La famille des *Rickettsiaceae* se divise en trois tribus: les *Ehrlichieae*, les *Rickettsieae* et les *Wolbachieae*.

Beaucoup d'espèces de *Rickettsieae* sont pathogènes pour les humains. Par contre les membres des *Wolbachieae* sont des agents infectieux ou des symbiotes, uniquement inféodés aux arthropodes.

La tribu des *Ehrlichieae* Philip, 1957, regroupe des micro-organismes qui diffèrent des autres rickettsies par leur prédilection pour les cellules réticulo-endothéliales, en particulier les leucocytes circulants. Le spectre d'hôtes naturels varie pour chaque espèce; il comprend principalement: les chiens, les bovins, les moutons, les chèvres, les chevaux et les êtres humains (Ristic et Huxsoll, 1984). Le mode de transmission n'est pas encore connu pour toutes les espèces. Il semble que les tiques soient des vecteurs dominants dans la transmission des agents pathogènes (Smith et Ristic, 1977; Ristic et Huxsoll, 1984). Dans un seul cas, celui de *Nanophyetus salmincola*, un trématode a été impliqué.

La tribu est divisée en trois genres suivant leurs cellules-hôtes, leur vecteur et leur répartition géographique (Tabl. 1): *Ehrlichia*, *Cowdria* et *Neorickettsia*.

Caractéristiques	1. <i>Ehrlichia</i>	2. <i>Cowdria</i>	3. <i>Neorickettsia</i>
Maladies	Ehrlichioses	Cowdriose, "Heartwater"	"Salmon poisoning disease"
Hôtes	Chiens, bovins, moutons, chevaux, humains	Moutons, chèvres, bovins	Canidés
Cellules-hôtes	Leucocytes circulants	Cellules endothéliales et réticulo-endothéliales	Lymphocytes et macrophages
Vecteurs	Tiques: <i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Ixodes</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.	Tiques: <i>Amblyomma</i> spp.	Trématodes: <i>Nanophyetus salinicola</i>
Distribution géographique	Cosmopolite	Afrique, Caraïbes	Côte ouest des Etats-Unis

Tabl. 1. Caractéristiques différentielles des genres de la tribu des Ehrlichieae
(d'après Ristic et Huxsoll, 1984)

Dans la dernière édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Ristic et Huxsoll, 1984), quatre espèces dans le genre *Ehrlichia* Moshkovski, 1945, sont décrites (Tabl 2): *E. canis*, *E. phagocytophila*, *E. equi* et *E. sensu*

Récemment, trois autres espèces, acceptées par le "International Journal of Systematic Bacteriology", se sont jointes à ce groupe: *E. risticii* (Holland et al., 1985b), *E. chaffeensis* (Anderson et al., 1991) et *E. ewingii* (Anderson et al., 1992b).

Les principales caractéristiques des espèces constituant le genre *Ehrlichia* et des infections (ehrlichioses) qu'elles provoquent seront succinctement exposées dans le Chap. 2. 3.

2. 2. *Ehrlichia phagocytophila*

2. 2. 1. Morphologie et ultrastructure

La morphologie et l'ultrastructure d'*E. phagocytophila* (Tuomi et von Bonsdorff, 1966; Woldehiwet et Scott, 1982b) sont similaires à celles décrites chez d'autres espèces d' *Ehrlichieae*: *E. canis* (Simpson, 1972, 1974; Hildebrandt et al., 1973a), *E. equi* (Gribble, 1969; Sells et al., 1976), *E. ondiri* (Piercy, 1953; Haig et Danskin, 1962; Krauss et al., 1972) et chez un groupe de bactéries proche des *Rickettsiales*: les *Chlamydiae* (Mitsui et al., 1964; Anderson et al., 1965; Armstrong, 1968; Cullip, 1970).

Chez l'hôte vertébré, *E. phagocytophila* infecte les neutrophiles et les éosinophiles, et plus rarement les monocytes. On les trouve isolés ou en groupes, dans une vacuole membranaire (phagosome) qui les différencie des *Rickettsia spp.* qui se développent librement dans le cytoplasme ou dans le noyau (Sells et al., 1976). Les *Ehrlichieae* possèdent deux membranes trilaminaires: une paroi cellulaire externe ondulée et une membrane cytoplasmique interne. A l'intérieur, les ribosomes et l'ADN sont bien distincts. Les amas de ribosomes sont distribués de manière homogène, mais de préférence sous la membrane cytoplasmique (Rikihisa, 1991).

Espèces	Hôtes naturels		Maladies		Cellules-hôtes		Vecteurs		Distribution géographique	
	Canidés domestiques et sauvages	Bovins et mouton	Ehrlichiose canine, Pancytopenie tropicale canine	Fièvre à tiques, fièvre de pâture	Leucocytes mononucléaires	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Cosmopolite			
<i>E. phagocytophila</i>					Granulocytes	<i>Ixodes ricinus</i>	Europe			
<i>E. equi</i>	Cheval		Ehrlichiose équine		Granulocytes	?	E.U., Europe			
<i>E. sensu lato</i>	Humain		Ehrlichiose de Sennetsu		Leucocytes mononucléaires	?	Japon, Malaisie			
<i>E. risticii</i>	Cheval		Ehrlichiose équine monocyttaire, Fièvre équine du Potomac		Leucocytes mononucléaires, cellules de l'épithélium intestinal, atastocytes	?	Amérique du N., Europe			
<i>E. cheyrensis</i>	Humain		Ehrlichiose humaine		Leucocytes mononucléaires	?	E.U.			
<i>E. eutagii</i>	Otten		Ehrlichiose canine granulocytaire		Granulocytes	?	E.U.			
<i>E. bovis et ovina</i>	Bovins et mouton		Ehrlichiose bovine et ovine		Leucocytes mononucléaires		Moyen-Orient, Afrique, Sri Lanka	<i>Hyalomma aegyptium</i> , <i>Rhipicephalus bursa</i> , <i>R. appendiculatus</i>		
<i>E. omdiri</i>	Bovins et mouton		Fièvre pétechiale bovine, Maladie de Omdiri		Granulocytes	?	Kenya			
<i>E. platys</i>	Otten		Thrombocytopénie cyclique canine		Thrombocytes	?	E.U.			

Tabl. 2. Caractéristiques des espèces de la tribu des *Ehrlichieae* (d'après Ristic et Huxsoll, 1984; Rikihisa, 1991)

2. 2. 2. Historique

Au début des années 1930, des recherches entreprises sur l'encéphalomyélite du mouton (louping-ill, zoonose due à un virus et transmise par *I. ricinus*), en Ecosse, ont permis de mettre en évidence une nouvelle infection chez cet animal. Poursuivant les investigations sur la transmission de l'encéphalite, MacLeod (1932) récolta des nymphes non gorgées de tiques *I. ricinus*, provenant de pâturages où la maladie sévissait et les fit se gorger sur des moutons. Les animaux développèrent une forte fièvre, apparemment non provoquée par le virus. Après guérison, les moutons ne présentaient pas d'immunité contre l'encéphalite. Cette réaction fébrile pouvait ensuite être reproduite chez d'autres moutons, après inoculation de sang provenant d'animaux infectés. MacLeod (1932) conclut que cette réaction était provoquée par un agent pathogène différent du virus de la louping-ill. Il venait de produire le premier cas expérimental de cette nouvelle infection chez le mouton.

Quelques temps plus tard, Gordon *et al.* (1932a) remarquèrent que l'arrivée de moutons, précédemment immunisés contre l'encéphalite, sur des pâturages infestés de tiques, provoquait chez eux des infections fébriles. Pour la première fois, cette nouvelle maladie du mouton fut décrite et nommée fièvre à tiques ("Tick-borne fever") (Gordon *et al.*, 1932b).

Gordon *et al.* (1940) mirent en évidence l'organisme responsable dans le cytoplasme des granulocytes et des monocytes des animaux infectés.

Par la suite, des descriptions plus détaillées furent alors publiées en microscopie optique (McEwen, 1947; Hudson, 1950; Foggie, 1951; Gordon *et al.*, 1962). Les études décrivaient la variété des formes rencontrées dans les cellules-hôtes. Ces observations furent complétées par des études en microscopie électronique (Tuomi et von Bonsdorff, 1966; Woldehiwet et Scott, 1982b).

Taylor *et al.* (1941) étudièrent les altérations hématologiques provoquées chez des moutons et remarquèrent qu'un des signes pathologiques caractéristiques de l'infection était le développement d'une leucopénie, et plus particulièrement d'une neutropénie, suivant la phase fébrile.

En enquêtant sur des maladies respiratoires, Hudson (1950) décrivit les premiers cas de fièvre à tiques chez le bétail en Angleterre.

Tuomi (1965) établit que ce que l'on appelait la fièvre de pâture ("Pasture fever") chez les bovins en Finlande, était en fait ce que les Anglo-saxons appelaient "tick-

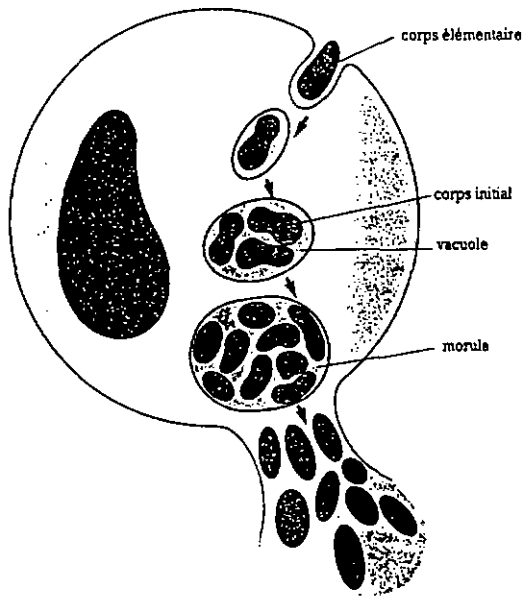


Fig. 2. Multiplication d' *Ehrlichia* sp dans un leucocyte
(d'après Davoust, 1993)

borne fever". Il entreprit des recherches de grande envergure sur l'infection dans son pays (Tuomi, 1967a, 1967b, 1967c, 1967d, 1967e).

Foggie (1951) apporta d'importantes contributions à la description de l'organisme et à la connaissance de l'immunité contre l'infection. L'auteur suggéra, d'après la localisation intracellulaire, son association avec un vecteur arthropode et sa ressemblance morphologique avec les membres du genre *Rickettsia*, que l'on classifie l'agent responsable de la fièvre de pâture dans le genre *Rickettsia*, sous le nom de *Rickettsia phagocytophila*. A cause de la similitude avec *Cytoecetes microti*, rickettsie observée dans les leucocytes d'un rongeur aux Etats-Unis (Tyzzer, 1938), il proposa plus tard d'inclure le micro-organisme dans le genre *Cytoecetes* et de l'appeler *Cytoecetes phagocytophila*.

Par la suite, ce genre fut éliminé et inclus dans le genre *Ehrlichia* (Ristic et Huxsoll, 1984); l'espèce fut alors appelée *Ehrlichia phagocytophila*.

2. 2. 3. Epidémiologie

2. 2. 3. 1. Multiplification dans l'hôte vertébré

La diversité des formes d' *E. phagocytophila* observée en microscopie optique dans les leucocytes suggéra à de nombreux chercheurs (McEwen, 1947; Foggie, 1951; Gordon *et al.*, 1962) l'existence d'un cycle complexe, comparable à celui des *Chlamydiae* (Bedson et Bland, 1932).

Il faut attendre les travaux en microscopie électronique à transmission (MET) de Tuomi et von Bonsdorff (1966) sur deux souches, l'une ovine et l'autre bovine, pour avoir une idée plus précise du mode de multiplication d' *E. phagocytophila*. Les auteurs ont démontré qu' *E. phagocytophila* présentait trois stades de développement distincts de tailles différentes: des petites formes, des formes intermédiaires et des formes larges ("small, intermediate and large particles").

Le mode de multiplication d' *E. phagocytophila*, proposé par les auteurs, est schématisé sur la Fig. 2.

Des organismes bactériens que l'on appelle des particules ou des corps élémentaires (0.2 à 0.6 μm , "elementary bodies") sont phagocytés par les leucocytes. La membrane d'invagination les entoure et se développe en phagosome. Ces vacuoles cytoplasmiques contiennent un organisme isolé du cytoplasme de la cellule-hôte. A cause de sa taille, ce stade est rarement observé en microscopie optique. Les particules augmentent de taille et se divisent par fission binaire pour former des particules intermédiaires que l'on appelle des particules ou corps initiaux (0.4 à 2.0 μm , "initial bodies"). Les micro-organismes formant ces particules vont se diviser à leur tour et donner de larges inclusions cytoplasmiques qui apparaissent alors en microscopie optique comme des grappes et portent le nom de morula (3.0 à 6.0 μm). Ces morulas sont les formes de développement caractéristiques. Plusieurs morulas peuvent coexister dans un même neutrophile. Elles peuvent être si larges qu'elles remplissent complètement le cytoplasme, déplaçant le noyau et causant la rupture de la cellule-hôte, initiant alors une nouvelle infection.

Les travaux, en microscopies optique et électronique, de Woldehiwet et Scott (1982b) montrèrent que le développement d' *E. phagocytophila* n'est pas aussi complexe que l'on croit. Les auteurs ont observé deux stades morphologiques: une petite forme et une forme plus large, en amas, similaire au stade morula décrit auparavant. Dans leurs expériences menées sur des moutons infectés expérimentalement, ils ont utilisé des échantillons sanguins, soit frais, soit après 24 heures d'incubation dans un milieu de croissance (Woldehiwet et Scott, 1982a). Les petites formes sont plus nombreuses dans le sang frais, et les formes en amas dominant dans les cultures. Selon les auteurs, les petites particules représentent les premiers stades de l'infection qui vont se diviser par fission binaire dans les vacuoles pour donner des formes en grappe. Le mode de multiplication d' *E. phagocytophila* ne peut pas, d'après eux, être assimilé à un cycle.

2. 2. 3. 2. Hôtes et réservoirs

La maladie affecte naturellement les moutons (Gordon *et al.*, 1932b) et les bovins (Hudson, 1950). Au Royaume-Uni, *E. phagocytophila* infecte également des ruminants sauvages: le cerf rouge, *Cervus elaphus* (Foggie, 1962), le daim, *Dama dama* et le

chevreuil, *Capreolus capreolus* (MacDiarmid, 1965), ainsi que des chèvres vivant à l'état sauvage (Foster et Greig, 1969).

E. phagocytophila a été transmis expérimentalement par inoculation de sang infecté à des chèvres (MacLeod, 1932; MacLeod et Gordon, 1933). Foggie et Hood (1961) ont adapté l'agent pathogène à des cobayes et des souris. Ces auteurs ont effectué le premier passage chez des animaux splénectomisés, puis les passages suivants chez des animaux intacts. Chez ces rongeurs, les infections ont toujours été bénignes et irrégulières. Des infections expérimentales chez le lapin, le furet, le porc, le cheval et l'élan ont échoué (Hudson, 1950; Foggie, 1951; Tuomi, 1967a).

2. 2. 3. 3. Vecteurs

Les recherches entreprises sur *E. phagocytophila* et son vecteur la tique, *I. ricinus*, sont rares.

Des expériences, mises en oeuvre par MacLeod (1932), MacLeod et Gordon (1932, 1933) et MacLeod (1936), ont établi que la fièvre de pâture était transmise par *I. ricinus*.

Lewis (1977) a utilisé des techniques d'immunofluorescence directe (IFD) et indirecte (IFI) sur des frottis de tissus d' *I. ricinus*. Il a pu observer des rickettsies sur des frottis d'hémolymphe et d'intestin, cinq jours après un repas sanguin infectieux. Lewis (1979) a également mis en évidence, en MET, des organismes présentant une ultrastructure similaire à celle d' *E. phagocytophila* décrite par Tuomi et von Bonsdorff (1966) chez l'hôte vertébré, dans l'intestin, les glandes salivaires et les ovaires d' *I. ricinus*. Des broyats de glandes salivaires et d'intestin provenant de ces expériences (Lewis, 1977, 1979) ont ensuite été inoculés à des moutons provoquant les signes cliniques caractéristiques de la fièvre de pâture.

En microscopie électronique, Webster et Mitchell (1989) ont démontré *E. phagocytophila* dans des tiques expérimentalement infectées ou récoltées dans la nature. Ils ont pu effectuer une estimation quantitative des *I. ricinus* infectées naturellement par *E. phagocytophila* en Ecosse.

2. 2. 3. 4. Répartition géographique

La distribution géographique d' *E. phagocytophila* est limitée aux pays tempérés européens.

Après la première description de la maladie chez le mouton en Ecosse (Gordon *et al.*, 1932b), la fièvre de pâture a été décrite dans d'autres régions du Royaume-Uni, aussi bien chez le mouton que chez le bétail (Hudson, 1950; Tutt et Loving, 1955). Des cas cliniques ont ensuite été signalés et l'agent pathogène isolé en Norvège (bétail et mouton: Thorshaug, 1940; Överås, 1959), aux Pays-Bas (bétail et mouton: Bool and Reinders, 1964), en Finlande (bétail et mouton: Tuomi, 1965), en Irlande (bétail et mouton: Collins *et al.*, 1970), en Autriche (bétail: Hinaidy, 1973), en Suisse (bétail: Pfister *et al.*, 1987; mouton et chèvre: Pfister, 1993, comm. pers.), en Espagne (mouton: Juste *et al.*, 1986; bétail: Juste *et al.*, 1989) et dans le nord de l'Allemagne (bétail: Friedhoff, 1981).

En fait, dans de nombreux pays, les manifestations cliniques de la maladie étaient connues des personnes liées aux troupeaux, bien avant l'isolation de l'agent responsable.

2. 2. 4. Manifestations cliniques

Comme le nom de la maladie l'indique (fièvre de pâture ou fièvre à tiques), le symptôme le plus important chez les bovins et les moutons est une forte fièvre, coïncidant avec le commencement de l'infection. Le temps de latence, la température maximale et la durée de la phase fébrile sont variables d'un animal à l'autre et dépendent également de la souche infectieuse.

Les premières observations faites du tableau fébrile chez le mouton infecté expérimentalement (MacLeod, 1932; Gordon *et al.*, 1932a, 1932b; MacLeod et Gordon, 1933; Foggie, 1951) peuvent être résumées de la manière suivante: la maladie est caractérisée par une période d'incubation d'environ quatre jours, suivie d'une augmentation brusque de la température. Cette période fébrile, souvent irrégulière, dure généralement 10 jours. Des températures atteignant 42 °C sont communément

rencontrées. Chez les bovins, naturellement ou expérimentalement infectés, la période d'incubation s'étend de 4 à 17 jours (Hudson, 1950; Tuomi, 1966; Kuil *et al.*, 1972; Taylor et Kenny, 1980).

On remarque un autre symptôme important chez les vaches: la diminution considérable et brusque de la production laitière (Hudson, 1950; Tutt et Loving, 1955; Venn et Woodford, 1956; Foggie et Allison, 1960; Överås et Hunshamar, 1962; Bools et Reinders, 1964; Tuomi, 1966, 1967a; Kuil *et al.*, 1972; Cranwell et Gibbons, 1986; Juste *et al.*, 1989; Streit, 1993).

Les travaux de Tuomi (1966) en Finlande ont montré que sur 276 vaches infectées naturellement, 30.4 % présentaient une baisse d'au moins 3/4 de la production laitière normale, 67 %, une baisse de 1/4 à 3/4 et 2.5 % moins de 1/4 ou pas de diminution. La production laitière normale s'est ensuite rétablie dans les 6 jours, pour environ la moitié des cas, avec ou sans traitement; mais 25 % des animaux n'ont pas retrouvé leur niveau de pré-infection. Cranwell et Gibbons (1986) observèrent, chez 42 vaches en Angleterre, que 14.3 % d'entre elles présentaient une baisse d'au moins 3/4, 61.9 %, de 1/4 à 3/4 et 23.8 %, moins de 1/4 de la production laitière normale. Kuil *et al.* (1972) remarquèrent qu'après cinq jours, 50 % des animaux retrouvent leur niveau initial.

Chez le bétail, la forte fièvre et la diminution de la production laitière sont accompagnées parfois de symptômes généraux plus bénins que l'on rencontre également chez les moutons. Les plus importants sont: apathie, perte d'appétit, toux, diarrhée (Gordon *et al.*, 1932b; Hudson, 1950; Tuomi, 1965, 1966, 1967a; Kuil *et al.*, 1972; Streit, 1993). Il est très possible que certains de ces signes cliniques soient provoqués par des infections secondaires (Tuomi, 1965).

Chez les chèvres, on remarque une tachycardie et une inhibition modérée des contractions du rumen (van Miert *et al.*, 1989).

Taylor et Kenny (1980) ont constaté une réduction significative du taux de croissance chez des veaux, durant quatre à cinq semaines, après des infections expérimentales ou naturelles.

2. 2. 5. Pathologie

Aussi bien chez le mouton que les bovins, les lésions histopathologiques les plus couramment observées sont des splénomégalies (Gordon *et al.*, 1932b; Hudson, 1950). Microscopiquement, la rate et les ganglions lymphatiques apparaissent comme vidés de leurs lymphocytes (Hudson, 1950). La rate pourrait être le principal site de multiplication d' *E. phagocytophila* (Weiss et Dasch, 1992).

Mais les changements pathologiques les plus remarquables ont lieu dans les leucocytes circulants. Durant la période fébrile, les organismes sont détectables en grand nombre dans les leucocytes. Le taux de cellules infectées est variable, mais plus de 90 % des neutrophiles peuvent être atteints. Les monocytes sont infectés à un degré bien moindre et généralement durant les derniers jours de l'infection. L'aspect hématologique caractéristique provoqué par la fièvre de pâture est une forte diminution des leucocytes, et surtout des neutrophiles. Cette leucopénie est due, chronologiquement, à une forte baisse du nombre des lymphocytes circulants, puis des neutrophiles et des éosinophiles. Des thrombocytopénies ont aussi été observées chez des agneaux infectés expérimentalement (Taylor *et al.*, 1941; Foggie, 1951; Tuomi, 1967a; Foster et Cameron, 1968b; Cranwell et Gibbons, 1986).

Malgré quelques cas de mortalité en condition naturelle ou expérimentale décrits chez les moutons (Jamieson, 1947, 1950; Foggie et Allison, 1960) et le bétail bovin (Wilson *et al.*, 1964; Purnell et Brocklesby, 1978), les infections à *E. phagocytophila* sont rarement létales et la plupart des animaux atteints guérissent spontanément, en général dans les deux semaines suivant le déclenchement de la maladie (Foggie, 1951).

L'aspect peut-être le plus important de la fièvre de pâture est son implication comme facteur prédisposant à d'autres infections bactériennes ou virales. Les recherches à ce sujet ont essentiellement été entreprises sur des moutons en utilisant des souches ovines d' *E. phagocytophila*.

Ehrlichia phagocytophila et la pyémie à tiques

La pyémie à tiques ("tick pyaemia") est une infection grave à staphylocoques chez les jeunes moutons. Elle est commune dans les foyers à *I. ricinus* au Royaume-Uni et provoque des abcès généralisés. Foggie (1956) suggéra qu' *I. ricinus* n'était pas le vecteur direct des staphylocoques, mais que les symptômes immunodépresseurs provoqués par *E. phagocytophila*, spécialement les sévères neutropénies, permettaient aux staphylocoques naturellement présents sur la peau d'envahir les tissus.

Les travaux de Brodie *et al.* (1986) montrèrent que 20 % (4/20) des moutons chez qui on avait injecté *Staphylococcus aureus*, développaient une pyémie. Lorsque les moutons étaient infectés avec les staphylocoques, lors de la phase fébrile d'une infection à *E. phagocytophila*, la proportion s'élevait à 90 % (9/10).

Ehrlichia phagocytophila et l'encéphalite à louping-ill

On a suggéré que la maladie de louping-ill, transmise également par *I. ricinus*, pouvait être aggravée par la présence simultanée d' *E. phagocytophila* et du virus de louping-ill (MacLeod et Gordon, 1933; Gordon *et al.*, 1962; Foggie, 1962; Brodie *et al.*, 1986; Reid *et al.*, 1986).

Des expériences ont été menées sur des moutons adultes pour confirmer ces affirmations (Brodie *et al.* 1986). Huit moutons ont été infectés par le virus seul et huit autres ont été infectés par le virus, cinq jours après une infection expérimentale à *E. phagocytophila*. Dans le premier groupe, trois animaux développèrent des symptômes passagers de louping-ill et guérirent spontanément. Dans le deuxième groupe, tous les animaux montrèrent des symptômes sévères de louping-ill et moururent ou durent être abattus en dernier recours.

Une autre expérience (Brodie *et al.*, 1986) menée sur 10 agneaux infectés par le virus de louping-ill, cinq jours après une infection expérimentale à *E. phagocytophila*, se conclut par la mort de neuf d'entre eux. Les auteurs suggérèrent que la fièvre de pâture facilitait l'invasion du système nerveux par le virus, et qu'elle augmentait la durée et la virulence de la virémie.

Reid *et al.* (1986) inoculèrent les deux agents pathogènes à huit béliers adultes. Ceux-ci présentèrent des signes sévères de louping-ill et moururent ou durent être

abattus. Dix autres animaux, infectés soit par *E. phagocytophila*, soit par le virus, développèrent de légères réactions.

Ehrlichia phagocytophila et la pasteurellose

En entreprenant des recherches sur la fièvre de pâture, des chercheurs ont observé que des cas de pneumonies à *Pasteurella haemolytica* se déclaraient à la suite d'infections à *E. phagocytophila* (Foggie, 1951, Foster et Cameron, 1970a). On suggéra alors que l'ehrlichiose prédisposait le mouton à la pasteurellose (Överås, 1972; Gilmour *et al.*, 1982).

Gilmour *et al.* (1982) confirmèrent cette hypothèse en infectant sept jeunes moutons avec un aérosol de *P. haemolytica* pendant une infection à *E. phagocytophila*. Les signes cliniques et les lésions pulmonaires provoquées étaient significativement plus sévères que chez sept moutons infectés seulement avec *Pasteurella*.

D'autres maladies pulmonaires sont aggravées par la présence d'une infection à *E. phagocytophila* : les infections à virus parainfluenza (Batungbacal et Scott, 1982c) et à *Chlamydia psittaci* (Murro *et al.*, 1982).

Chez le bétail, il semble que l'ehrlichiose joue un rôle majeur dans un syndrome complexe incluant des infections des muqueuses et une déficience en cobalt chez des jeunes veaux en Ecosse (Greig *et al.*, 1977).

Par ailleurs, d'autres complications peuvent se produire. Des cas d'avortement ou d'animaux mort-nés, survenus à la suite d'une infection naturelle à *E. phagocytophila*, ont été signalés chez des brebis (Stewart, 1936; Överås, 1959) ou des vaches (Hudson, 1950; Venn et Woodford, 1956; Wilson *et al.*, 1964; Juste *et al.*, 1989). Des avortements ont été provoqués expérimentalement après infection d' *E. phagocytophila* chez des moutons, mais aucune trace de l'agent responsable n'a été découverte dans les foetus examinés (Stamp, 1950; Stamp et Watt, 1950; Jamieson, 1950). Des investigations sur une vague d'avortements et d'animaux morts-nés dans un groupe de jeunes vaches portantes en Ecosse conclurent à la responsabilité d' *E. phagocytophila* (Wilson *et al.*,

1964). Sur 120 animaux se déplaçant sur des nouveaux pâturages, 28 avortèrent ou mirent bas des veaux morts dans les mois qui suivirent leur arrivée. En Espagne, des avortements chez des vaches ont été attribués à *E. phagocytophila*; la présence d'anticorps spécifiques de classe IgM, indiquaient une récente infection (Juste *et al.*, 1989).

Chez les moutons, comme chez les bovins, il semble que ces avortements ont lieu chez des animaux auparavant jamais ou peu exposés à des tiques, et infectés durant les dernier mois de gestation (Stamp et Watt, 1950; Cranwell et Gibbons, 1986).

Des stérilités temporaires ont également été remarquées chez des béliers et des taureaux à la suite d'infections à *E. phagocytophila* (Watson, 1964; Retief *et al.*, 1971).

2. 2. 6. Culture in vitro

La propagation in vitro des *Ehrlichieae* a préalablement été nécessaire pour le développement d'un test efficace pour le sérodiagnostic, ainsi que pour des recherches de base, aussi bien au niveau cellulaire que moléculaire.

Actuellement, ni *E. phagocytophila* ni aucun autre *Ehrlichia sp.* granulocytaire n'ont pu être cultivés sur des lignées cellulaires continues.

Des essais d'infections, à partir de sang complet, de plasma ou de concentrations leucocytaires, provenant de moutons infectés, ont été réalisés, sans succès, sur différents substrats: oeufs embryonnés de poule, fibroblastes embryonnaires de poulet, cellules rénales foetales de moutons, cellules L de souris et cultures de macrophages pulmonaires de moutons (Tuomi, 1967a; Thrusfield *et al.*, 1978). Des fusions cellulaires, à partir de concentrations leucocytaires infectées, ont aussi été tentées avec des fibroblastes embryonnaires de poulet, des cultures de macrophages pulmonaires de moutons et des cellules BHK-21, mais également sans résultats (Thrusfield *et al.*, 1978).

L'aptitude des cellules-hôtes à se multiplier est une exigence essentielle au développement de systèmes de culture de rickettsies qui parasitent des leucocytes (Ristic, 1986).

Plus tard, des cultures à court terme d' *E. phagocytophila* dans des granulocytes de moutons et de chèvres ont été réalisées (Woldehiwet et Scott, 1982a; Jongejan *et al.*, 1989).

Woldehiwet et Scott (1982a) ont propagé *E. phagocytophila* dans des cultures de sang hépariné complet additionné de Medium 199 enrichi.

Jongejan *et al.* (1989) se sont servis d'une technique adaptée de celle auparavant décrite pour la culture de neutrophiles infectés par *C. ruminantium* (Logan *et al.*, 1987). Les neutrophiles infectés sont d'abord isolés, par centrifugation et lyse cellulaire, puis incubés dans un milieu de culture RPMI 1640 enrichi. Il semble que l'élimination des érythrocytes avant la mise en culture augmente d'une façon importante la production d'organismes rickettsiens.

Dans ces cultures à court terme, le nombre de neutrophiles infectés, ainsi que celui des inclusions d' *E. phagocytophila* par cellule, augmentent dramatiquement après 24 heures, puis les cellules dégénèrent rapidement. Pourtant, les *Ehrlichieae* continuent à se multiplier même en dehors des cellules-hôtes.

2. 2. 7. Immunité

Bien qu'on ait soupçonné très tôt une immunité protectrice (Gordon *et al.*, 1932b; Hudson, 1950), les connaissances sur le statut immunologique des animaux infectés par *E. phagocytophila* sont très spéculatives. Des infections naturelles et expérimentales sur des ovins et des bovins ont mis en évidence l'existence d'une immunité chez les animaux après une primo-infection. Les questions suivantes restent ouvertes: à quel moment se développe-t-elle, combien de temps dure-t-elle, est-elle dépendante de la persistance d' *E. phagocytophila* dans le sang de l'hôte ? (Gordon *et al.*, 1932b; McEwen, 1947; Jamieson, 1947; Hudson, 1950; Stamp et Watt, 1950; Foggie, 1951; Tuomi, 1967a; Kuil *et al.*, 1972).

Des recherches ont montré que la durée de l'immunité semble liée aux titres d'anticorps circulants. Woldehiwet et Scott (1982d) signalent que les moutons infectés expérimentalement développent en deux semaines des anticorps de classe IgM, suivis d'IgG. Ces anticorps, détectés par un test de fixation du complément,

persistent à un niveau bas plus d'un an. Les moutons sont résistants à la réinfection lorsque des anticorps sont détectés à une dilution supérieure à 1:16. Six à huit semaines après l'infection, les animaux ont des titres inférieurs et développent lors d'une réinfection une parasitémie faible, avec ou sans fièvre. Webster et Mitchell (1988) ont détecté des anticorps chez des moutons, 9 à 11 jours après une infection expérimentale. L'apparition de ces anticorps coïncide avec la disparition des *Ehrlichiae* du sang périphérique. Les anticorps atteignent leur niveau maximum au 15^{ème} jour, puis restent à des niveaux bas pendant 6 à 10 semaines (1:1 à 1:8). Après ce laps de temps, des réinfections ont pu être réalisées, provoquant une symptomatologie et une parasitémie faible.

E. phagocytophila induit des immunosuppressions et prédispose ainsi les animaux à d'autres infections. Des travaux ont montré que la présence de l'agent pathogène réduit la capacité phagocytaire des neutrophiles (Woldehiwet, 1987a), diminue le nombre des lymphocytes B circulants (Batungbacal et Scott, 1982a) et inhibe la réponse humorale (Batungbacal et Scott, 1982b),

Il existe des différences immunologiques entre les souches ovines et bovines, mais également au sein des souches ovines et bovines (Foggie, 1951; Tuomi, 1967c; Foster et Cameron, 1970a). Des infections expérimentales de bovins avec des souches ovines protègent l'animal contre une deuxième infection de souche bovine. Par contre les moutons préalablement infectés avec une souche bovine ne semblent pas être résistants à une infection avec une souche ovine (Hudson, 1950; Tuomi, 1967c; Foggie et Allison, 1960)

2. 2. 8. Diagnostic

La mise en évidence des infections à *E. phagocytophila* se fait chez l'hôte vertébré, soit par l'observation directe des agents pathogènes dans le sang, soit par la détection d'une réaction antigène-anticorps.

- L'observation directe des micro-organismes en microscopie optique est le moyen le plus simple et le plus sûr pour diagnostiquer *E. phagocytophila*. Les frottis sont

préparés à partir de concentration leucocytaire de sang périphérique. Les colorations classiques de Romanowski sont utilisées (May-Grünwald-Giemsa, Giemsa, Wright). *E. phagocytophila* apparaît alors, dans le cytoplasme des granulocytes, comme des amas de petits points plus ou moins serrés, couleur lilas foncé ou comme des grappes de points à l'apparence de mûres. Malheureusement, ce type d'observation n'est possible que durant la phase aiguë, période brève de la maladie.

- Comme techniques sérologiques, des méthodes d'immunofluorescence directe sur des frottis ou des gouttes épaisses sanguins ont d'abord été utilisées (Tuomi, 1967d; Woldehiwet, 1981, in Paxton et Scott, 1989). Lewis (1980, in Webster et Mitchell, 1988) préfère employer des frottis de concentrations leucocytaires à du sang complet; de cette manière, la contamination par les érythrocytes est minimale. Malgré tout, Lewis (1980) et Woldehiwet (1981) remarquèrent la présence de fluorescence non-spécifique.

D'autres chercheurs ont appliqué des techniques de détection d'anticorps spécifiques dirigés contre *E. phagocytophila* dans le sérum des animaux infectés. Il faut souligner que tous les agents ehrlichien induisent une réponse immunitaire humorale spécifique. Toutefois, étant donné qu'une réponse sérologique survient chez chaque animal exposé à *Ehrlichia sp*, sans que l'infection soit démontrée, les tests sérologiques seuls, sans l'appui d'informations cliniques, sont insuffisants pour le diagnostic de la maladie (Rikihisa, 1991).

Snodgrass et Ramachandran (1971) développèrent un test de fixation du complément. Webster et Mitchell (1988) décrivent un test d'immunodiffusion. D'après Paxton et Scott (1989), ce test détecterait seulement les anticorps durant une courte période après l'infection; il serait donc utile pour le diagnostic d'infections récentes.

Entre 1987 et 1989, trois travaux ont été publiés utilisant des tests IFI (Alani *et al.*, 1987; Paxton et Scott, 1989; Jongejan *et al.*, 1989). La source de l'antigène est constituée de neutrophiles, de moutons ou de chèvres, infectés expérimentalement, puis isolés par des méthodes de centrifugation et de lyse cellulaire.

L'utilisation de neutrophiles isolés et concentrés est la source d'antigène la plus efficace pour les tests IFI, étant donné que le nombre de neutrophiles infectés est supérieur à celui des neutrophiles contenant des micro-organismes fluorescents (Lewis, 1980, in Alani *et al.*, 1987; Alani *et al.*, 1987).

Ces derniers auteurs utilisent comme antigène des neutrophiles infectés à plus de 45 %, isolés selon la technique de Naylor et Little, 1975. Le taux des neutrophiles infectés doit être supérieur à 20 % pour que le test soit efficace. La périphérie des cellules infectées fluoresce légèrement. Cette dernière constatation a également été observée par Lewis (1980, in Alani *et al.*, 1987).

Paxton et Scott (1989) isolent les granulocytes selon la méthode de Carlson et Kaneko (1973) et emploient comme antigène des préparations de neutrophiles centrifugées sur des lames de microscope ("cytopspin"). Grâce à cette cyto-centrifugation, les cellules sont concentrées sur une petite surface, donnant une "impression bidimensionnelle" à la préparation. D'après les auteurs, cette technique semble diminuer et parfois éliminer la fluorescence non-spécifique.

Jongejan *et al.* (1989), lors d'une étude sur des réactions sérologiques croisées entre *E. phagocytophila* et *C. ruminantium*, utilisèrent comme antigène, une culture à court terme d' *E. phagocytophila* dans des neutrophiles. Il semble qu'une pré-incubation de l'antigène avec un tampon glycine acide (Montenegro-James *et al.*, 1985), avant de déposer les immun-sérums, ainsi qu'une contre coloration au bleu d'Evans, réduisent considérablement la fluorescence non-spécifique.

En utilisant des tests IFI, on n'observe pas de réactions sérologiques croisées entre les *Ehrlichiae* et les *Rickettsiæ* ou les *Chlamydiae* (Ristic *et al.*, 1972; Holland *et al.*, 1987; Holland et Ristic, 1991). Cette constatation est également valable entre *E. phagocytophila* et *Babesia motasi*, *B. divergens*, *Theileria recondita*, *Sarcocystis ovicanis* et *Toxoplasma gondii* (Alani *et al.*, 1987).

Certaines souches de *Cowdria ruminantium* partagent des déterminants antigéniques avec *E. phagocytophila*. Des réactions croisées ont été détectées en IFI entre *Cowdria ruminantium* et *E. phagocytophila* (Camus, 1987, in Jongejan *et al.*, 1989; Du Plessis *et al.*, 1987). Jongejan *et al.* (1989) ont signalé une légère réaction croisée bilatérale entre *Cowdria* et *E. phagocytophila*. La relation sérologique entre *Cowdria* et *E. phagocytophila* ne confère pas une immunité croisée (Jongejan et Wassink, 1991).

2. 2. 9. Traitement

Des antibiotiques du groupe des tétracyclines, comme l'oxytétracycline, sont très efficaces pour le traitement d' *E. phagocytophila*.

Administrés chez des vaches laitières malades, ils provoquent une rapide baisse de la fièvre, généralement dans les 24 heures; mais la récupération de la production laitière est variable (Tutt et Loving, 1955; Venn et Woodford, 1956; Foggie et Allison, 1960; Tuomi, 1966). Etant donné que les effets secondaires de l'oxytétracycline sont incertains et que le lait des animaux traités ne peut être consommé immédiatement, le traitement par antibiotiques n'est pas obligatoirement employé (Cranwell et Gibbons, 1986).

Taylor *et al.* (1980), lors d'essais de vaccination contre la piroplasmose (*Babesia divergens*) en Irlande du Nord, ont démontré que l'injection d'oxytétracycline à des veaux diminuait également la sévérité de l'ehrlichiose sur les valeurs hématologiques.

L'administration d'oxytétracycline, lorsque l'infection à *E. phagocytophila* est bien établie, n'a pas d'impact sur le développement d'une immunité protectrice (Kuil *et al.*, 1972; Brodie *et al.*, 1988; Cranwell, 1990).

2. 3. Revue des connaissances actuelles des autres *Ehrlichia* spp.

Ehrlichia canis

Découverte en 1935 dans le sang d'un chien à l'Institut Pasteur d'Alger (Donatien et Lestoquard, 1935), *E. canis*, espèce type du genre *Ehrlichia*, est responsable de l'ehrlichiose canine ou, pour les formes graves, de la pancytopénie tropicale canine. *E. canis* est transmis par la tique *Rhipicephalus sanguineus* (Groves *et al.*, 1975). Actuellement, l'infection est cosmopolite. Sa distribution semble se superposer à celle du vecteur entre le 50° de latitude Nord et le 35° de latitude Sud (Davoust, 1993). En Europe, elle sévit dans les pays du pourtour méditerranéen. C'est à partir de la guerre du Vietnam, où des chenils de l'armée américaine furent décimés par

l'ehrlichiose canine, que des moyens importants ont alors été consacrés à son étude (Huxsoll *et al.*, 1970; Walker *et al.*, 1970; Nims *et al.*, 1971).

E. canis envahit les leucocytes mononucléaires, principalement les monocytes. On retrouve l'agent pathogène dans les organes contenant des cellules phagocytaires, en particulier la rate, le foie et les ganglions lymphatiques.

La maladie se divise en trois phases: aiguë, subclinique et chronique. Les signes cliniques et anomalies clinico-pathologiques associés avec chaque phase de la maladie ont largement été décrits après des infections expérimentales ou naturelles (Walker *et al.*, 1970; Huxsoll *et al.*, 1972; Buhles *et al.*, 1974; Troy *et al.*, 1980; Reardon et Pierce, 1981; Kuehn et Gaunt, 1985; Waddle et Littman, 1988; Woody et Hoskins, 1991). La forme aiguë est caractérisée principalement par une hyperthermie brutale, de l'anorexie, une perte de poids et de l'asthénie. Des thrombocytopenies sont fréquemment observées, ainsi que des leucopénies et des anémies. Cette phase est suivie d'une phase subclinique, où les symptômes s'atténuent, puis d'une forme chronique, symptomatique ou grave. Les formes sévères se distinguent par une amplification des signes présents lors de la phase aiguë. On observe des lésions oculaires, un amaigrissement extrême et une évidente hyperplasie médullaire. Des hémorragies ou des infections secondaires peuvent mener à une issue fatale. Cette phase chronique grave se développe plus facilement chez des chiens de race berger allemand (Hildebrandt *et al.*, 1973b).

Les canidés sauvages et domestiques sont les seul hôtes naturels connus (Groves *et al.*, 1975).

Le diagnostic des infections à *E. canis* est réalisé par une mise en évidence directe d'*E. canis* dans les monocytes lors de la phase aiguë de l'infection ou en utilisant des tests sérologiques: test IFI (Ristic *et al.*, 1972; Weisiger *et al.*, 1975) et dosage immunoenzymatique (ELISA) (Rikihisa *et al.*, 1992).

Ehrlichia equi

L'agent responsable de l'ehrlichiose équine a pour la première fois été décrit en Californie (Gribble, 1969; Stannard *et al.*, 1969). En Europe, des cas ont été signalés en Allemagne (Büscher *et al.*, 1984), en Suisse (Hermann *et al.*, 1985) et en Suède (Bjöersdorff *et al.*, 1990).

On trouve *E. equi* uniquement dans le cytoplasme des neutrophiles et des éosinophiles. L'infection est généralement bénigne ou de sévérité moyenne, rarement mortelle. Les signes cliniques de l'infection sont une forte fièvre, anorexie, apathie, ataxie, une augmentation du rythme cardiaque et de la respiration. Durant cette phase fébrile, des leucopénies, thrombocytopénies et anémies sont observées. Des oedèmes et des hémorragies sont des signes pathologiques couramment détectés (Gribble, 1969).

Le seul hôte naturel est le cheval, mais de nombreuses infections expérimentales ont été réussies chez les moutons, les chèvres, les chiens, les chats, les singes et les ânes. Chez ces animaux, les symptômes sont absents ou bénins (Gribble, 1969; Lewis *et al.* 1975).

Les vecteurs et les réservoirs ne sont pas connus.

Le diagnostic se fait soit par mise en évidence directe de l'agent dans les granulocytes, soit par un test IFI (Nyindo *et al.*, 1978).

Ehrlichia risticii

E. risticii cause une infection sévère chez les chevaux: l'ehrlichiose équine monocytaire ou fièvre équine du Potomac. Décrite pour la première fois en 1979, près du fleuve Potomac aux Etats-Unis, l'agent responsable n'a été isolé que quelques années plus tard (Holland *et al.*, 1985a; Rikihisa et Perry, 1985). Depuis lors, elle a été signalée dans d'autres régions d'Amérique du nord, ainsi qu'en France (Rikihisa, 1991).

Les symptômes associés avec l'infection sont les suivants: fièvre, apathie, anorexie, leucopénie, oedèmes, coliques et diarrhées. La mortalité chez les chevaux peut atteindre 30 % (Holland *et al.*, 1985a).

E. risticii montre une prédilection pour les cellules de l'épithélium intestinal, provoquant des problèmes de transport membranaire. Les monocytes sanguins, les macrophages tissulaires et les mastocytes sont également infectés (Rikihisa, 1991).

Le mode de transmission d' *E. risticii* reste inconnu.

Des tests sérologiques, IFI (Ristic *et al.*, 1986) et ELISA (Pretzman *et al.*, 1987), sont utilisés pour le diagnostic. Une technique d'identification rapide par amplification génomique (PCR) est en cours d'évaluation (Biswas *et al.*, 1990).

Ehrlichia sennetsu

E. sennetsu est l'agent responsable de la rickettsiose humaine de Sennetsu dans l'ouest du Japon et d'autres régions du Sud Est Asiatique. Elle a été isolée pour la première fois au Japon, en 1953, chez des souris infectées par du sang, de la moelle osseuse ou des broyats de ganglions lymphatiques provenant d'un patient. Les signes cliniques sont une forte fièvre, des malaises, des maux de tête, de l'anorexie et une adénopathie (Fukuda *et al.*, 1954; Misao et Kobayashi, 1954; Ristic, 1986).

Des infections ont été reproduites chez des singes (Ohtaki et Shishido, 1965).

Le mode de transmission est inconnu.

Les souris sont très sensibles à *E. sennetsu* et sont utilisées pour isoler les organismes provenant d'échantillons humains. *E. sennetsu* est visible dans les cellules péritonéales après coloration avec des méthodes de Romanowsky ou par marquage en immunofluorescence (Fukuda *et al.*, 1954; Misao et Kobayashi, 1955).

Ehrlichia chaffeensis

Jusqu'à récemment, *E. sennetsu* était la seule espèce connue d' *Ehrlichia* pouvant infecter les êtres humains. Les premiers cas d'ehrlichiose humaine, en dehors d'Asie, sérologiquement et cliniquement différents de l'ehrlichiose de Sennetsu, sont apparus aux Etats-Unis (Maeda *et al.*, 1987). Depuis, plus de 260 cas confirmés sérologiquement ont été signalés aux Etats-Unis, mais aussi en Espagne, au Portugal et au Mali (Dawson *et al.*, 1991; Guerrero *et al.*, 1991; Morais *et al.*, 1991; Uhaa *et al.*, 1992).

Les signes cliniques sont proches de ceux provoqués par *Rickettsia rickettsii*, agent de la fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses (Fishbein *et al.*, 1987; Maeda *et al.*, 1987). Les bouleversements hématologiques, leucopénie et thrombocytopénie, ressemblent à ceux provoqués par *E. canis* (Eng *et al.*, 1988; McDade, 1990). Cette similitude est renforcée par le fait que les diagnostics de l'ehrlichiose humaine, jusqu'en 1991, utilisaient comme antigène, *E. canis*.

Les monocytes sont les cellules-hôtes principales (Dunn *et al.*, 1992; Dumler *et al.*, 1993).

Des réactions sérologiques croisées et, depuis peu, des méthodes PCR utilisées sur la séquence du gène de l'ARNr 16S, ont montré que l'agent responsable de l'ehrlichiose humaine aux Etats-Unis est proche d' *E. canis* et d' *E. ewingii* (Anderson *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1992). Isolé en 1991, il a été appelé *E. chaffeensis* (Anderson *et al.*, 1991). Depuis lors, la création d'amorces spécifiques (Anderson *et al.*, 1991) a permis d'amplifier l'ADN d' *E. chaffeensis* et de le mettre en évidence dans des extraits de liquide céphalorachidien, moelle osseuse, sang et plasma prélevés chez des patients (Dunn *et al.*, 1992, Anderson *et al.*, 1992a).

Des recherches utilisant également ces amorces, ont montré que les adultes de la tique *Amblyomma americanum*, peuvent être les vecteurs de l'infection (Anderson *et al.*, 1993).

Ehrlichia ewingii

En 1971, une nouvelle souche d' *E. canis* a été décrite dans les granulocytes, principalement les neutrophiles, d'un chien (Ewing *et al.*, 1971). Elle provoque chez l'animal une forme atténuée d'ehrlichiose canine aiguë et une forme chronique associée avec des polyarthrites, différente de celle rencontrée dans l'ehrlichiose canine classique, appelée ehrlichiose canine granulocytaire (Ewing *et al.*, 1971; Carillo et Greene, 1978; Stockham *et al.*, 1985; Bellah *et al.*, 1986; Cowell *et al.*, 1988; Anziani *et al.*, 1990). Antigéniquement apparentée à *E. equi* et *E. canis*, cette *Ehrlichia* granulocytaire canine est néanmoins distincte (Rikihisa *et al.*, 1992). L'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S a révélé une séquence différente de celles des autres *Ehrlichiae* (Anderson *et al.*, 1992b). Les observations génomiques et phénotypiques ont justifié la création d'une nouvelle espèce, *E. ewingii* (Anderson *et al.*, 1992b).

Quelques autres micro-organismes apparentés au genre *Ehrlichia* ont plus ou moins bien été caractérisés: *E. bovis* (Donatien et Lestoquard, 1936, 1940), *E. ovina* (Donatien et Lestoquard, 1936), *E. (=Cytoecetes) ondiri* (Haig et Danskin, 1962; Krauss *et al.*, 1972), *E. platys* (Harvey *et al.*, 1978; French et Harvey, 1983; Glaze et Gaunt, 1986; Baker *et al.*, 1987 et 1988; Hoskins *et al.*, 1988; Gaunt *et al.*, 1990; Simpson *et al.*,

1991), *E. (=Cytoecetes) microti* (Tyzzer, 1938), *E. kurlovi* (Moshkovski, 1937) et *E. (=Cytoecetes) kamtchouilli* (Gretillat *et al.*, 1981).

Le genre *Cytoecetes*, une rickettsie envahissant les granulocytes, a été éliminé et inclus dans le genre *Ehrlichia* (Ristic et Huxsoll, 1984).

Des études sur le génome, et en particulier l'analyse comparative des séquences amplifiées de l'ADNr 16S, reconnaissent parfaitement la classification actuelle du genre *Ehrlichia*, à une seule exception près. En effet, il semblerait qu' *E. phagocytophila* et *E. equi* soient des souches différentes d'une même espèce. En comparant les séquences 16S des deux organismes, on trouve une homologie de 99.9 % (Anderson *et al.*, 1991; van Vliet *et al.*, 1992).

2. 4. Les infections à *Ehrlichia spp.* en Suisse

Excepté *E. phagocytophila*, deux autres *Ehrlichia spp* ont été isolés en Suisse chez des animaux.

Hermann *et al.* (1985) citent, pour la première fois, un cas d'ehrlichiose chez un jument suisse. Les symptômes cliniques (anorexie, fièvre, ataxie, oedèmes aux membres), les résultats hématologiques (leucopénie, légère anémie, bilirubine élevée et présence d'organismes ehrlichien dans les neutrophiles) font penser à une infection à *E. equi*, agent responsable de l'ehrlichiose équine. Après des traitements à l'oxytétracycline, quatre jours après la déclaration de la maladie, l'animal se rétablit.

Deux études sérologiques et épidémiologiques sur *E. canis* et *E. equi* ont été menées chez des chiens et des chevaux en Suisse.

Les sérums de 25 chiens fébriles et anémiques ont été examinés en IFI pour *E. canis* et *E. equi* (Winkler *et al.*, 1988). Sur ces 25 sérums, 11 présentaient une réaction positive à la présence d'anticorps contre *E. canis* et 11 contre *E. equi*. Parmi ces chiens, quatre montraient également des symptômes de leishmaniose ou de babésiose.

Aucun corps d'inclusion d' *E. canis* dans les monocytes périphériques n'a été décelé. Par contre, la mise en évidence d'inclusions dans des neutrophiles, dans un des cas sérologiquement négatif à *E. canis*, a été réussie. Les auteurs conclurent à la présence d' *E. equi*, l'agent de l'ehrlichiose équine. Ce chien présentait bien une réaction sérologique positive contre des antigènes d' *E. equi*. Il est connu qu' *E. equi* peut engendrer une forme atténuée de l'ehrlichiose chez le chien (Lewis *et al.*, 1975).

La source de l'infection des chiens n'a pu être mise en évidence. On ne sait pas s'ils se sont infectés en Suisse ou à l'occasion d'un séjour dans le sud de l'Europe ou en Asie.

Des recherches sur la séroprévalence d' *E. equi* dans la population équine suisse ont été entreprises (Bretscher, 1990). 1645 sérums provenant de chevaux sans signes cliniques ont été testés en IFI, afin de mettre en évidence des anticorps contre *E. equi*. 66 chevaux (4 %) présentaient des titres positifs, s'étalant de 1:40 à 1:1280. Ils provenaient de 16 cantons. A Bâle Campagne, Schaffhouse et Vaud, les séroprévalences étaient marquées, respectivement 17.9, 12.1 et 9.1 %.

D'après l'auteur, la relation entre les résultats positifs et l'exposition à des tiques, ou à un historique d'infestation par les tiques, renforcent fortement l'hypothèse qu' *I. ricinus* est responsable de la transmission d' *E. equi* en Suisse.

2. BUTS DU TRAVAIL

Notre but principal dans ce travail est d'approfondir les connaissances épidémiologiques, sérologiques et hématologiques de l'infection à *E. phagocytophila* chez les bovins en Suisse.

Pour cela, nous avons entrepris:

- la recherche de foyers d'infections à *E. phagocytophila*, afin d'avoir une meilleure idée de la distribution géographique et de la fréquence de la maladie
- une enquête sérologique sur le cheptel bovin dans l'ouest de l'Oberland bernois, afin d'évaluer la présence de la fièvre de pâture au sein du cheptel bovin et de détecter l'évolution saisonnière des anticorps, dans une région où l'on rencontre les cas les plus nombreux d'infections à *E. phagocytophila*
- l'étude du rôle joué par les animaux sauvages dans le cycle de l'infection
- l'isolation d' *E. phagocytophila* chez son vecteur, *I. ricinus*
- des infections expérimentales chez des veaux, afin de mettre en évidence les bouleversements hématologiques provoqués par des souches suisses d' *E. phagocytophila*.

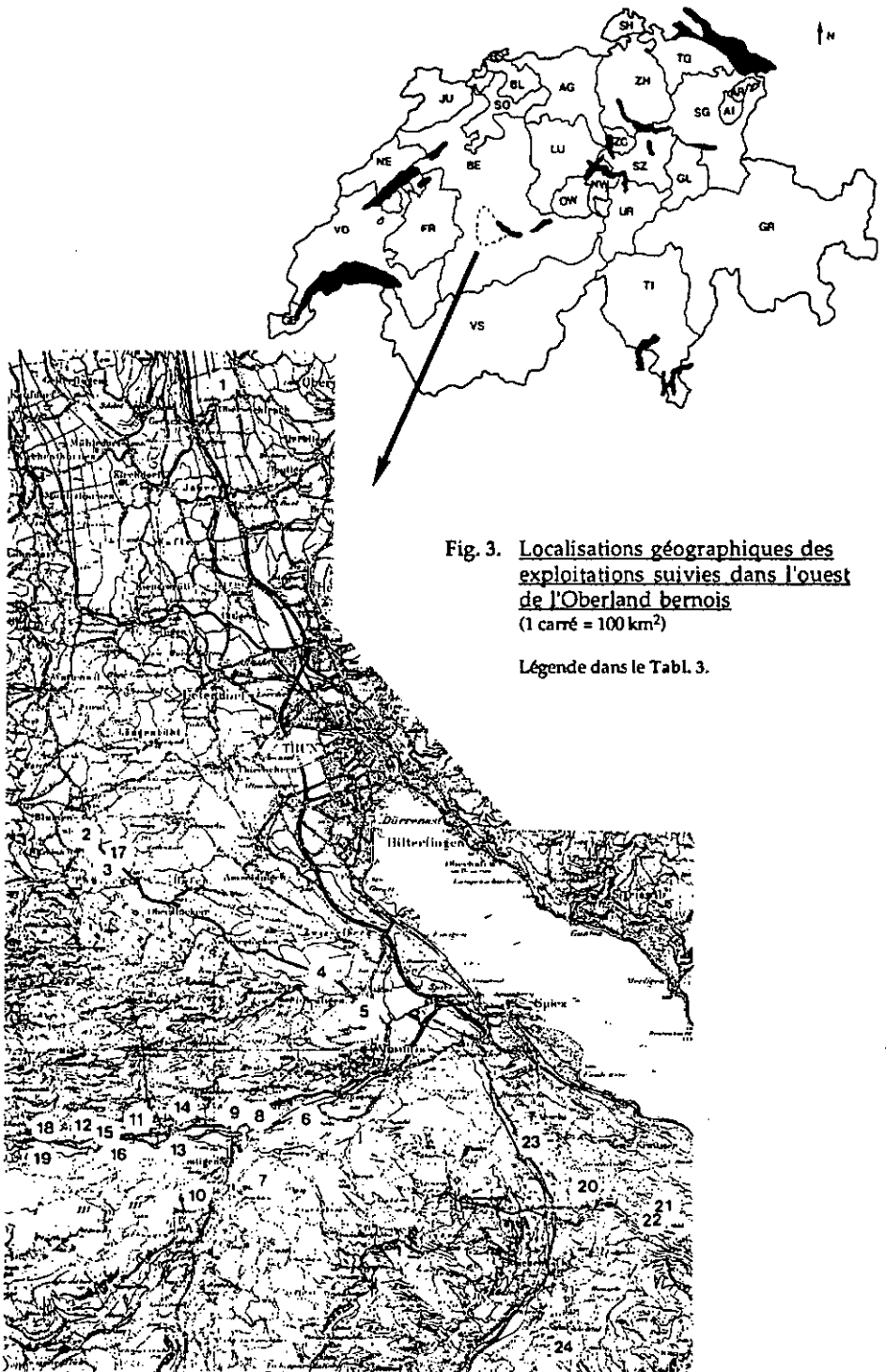


Fig. 3. Localisations géographiques des exploitations suivies dans l'ouest de l'Oberland bernois
(1 carré = 100 km²)

Légende dans le Tabl. 3.

4. MATERIEL ET METHODES

4. 1. Hôtes

4. 1. 1. Les bovins

4. 1. 1. 1. Recherche des foyers d'infections à *E. phagocytophila* en Suisse

Afin d'avoir une idée plus précise de la répartition géographique et de la fréquence des infections à *E. phagocytophila* en Suisse, des questionnaires ont été envoyés à l'ensemble des vétérinaires de Suisse s'occupant de gros bétail (Annexe I). Nous leur avons demandé s'ils avaient déjà observé des animaux présentant des symptômes de fièvre de pâture. Pour répondre au questionnaire, un résumé des signes cliniques de l'infection avait été établi à leur attention. Dans un deuxième temps, les vétérinaires ayant répondu positivement ont à nouveau été contactés pour l'envoi de tout échantillon sanguin, provenant de bovins suspectés de fièvre de pâture. Dans plusieurs cas, nous nous sommes déplacés pour les prélèvements.

Les prises de sang sont effectuées avec une aiguille hypodermique au niveau de la veine du lait ou de la veine jugulaire chez les vaches, et de la veine jugulaire chez les génisses et les veaux. Le sang est recueilli dans des tubes de 5 ml contenant un anticoagulant (K-EDTA: 1.6 mg EDTA/ml, n° 34.343, Sarstedt).

Le diagnostic est effectué par détection directe d' *E. phagocytophila* dans le sang (cf. Chap. 4. 2. 1.)

4. 1. 1. 2. Enquête sérologique dans l'ouest de l'Oberland bernois

Entre septembre 1988 et décembre 1989, nous avons effectué régulièrement des prises de sang chez des bovins provenant de 24 exploitations disséminées dans l'Oberland bernois, au nord et à l'ouest du lac de Thoune (Fig. 3 et Tabl. 3).

Ces exploitations sont situées dans le Niderrsimmental (n° 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19), Stockental (2, 3, 4, 5, 17), Diemtigtal (7, 10), Frutigtal (23), Kiental (24), ainsi que dans la région de Aeschiried (20, 21, 22) et au nord de Thoune (1).

1. H. BACHHOFNER 3114 Wichtrach	9. M. GFELLER Kreuzgasse, 3758 Latterbach	17. J. WIEDMER 3611 Pohlern
2. P. HEGER Eschli, 3638 Blumenstein	10. A. KLOSSNER Thalweid,, 3754 Diemtigen	18. O. KÜPFER Römberg, 3763 Därstetten
3. V. SCHWENDIMANN Bachtelen, 3611 Pohlern	11. D. REBER Eschlenallmand, 3762 Erlenbach	19. H. TREUTHARDT Klostermatte, 3763 Därstetten
4. H. KREBS Moosacher, 3647 Reutigen	12. K. SEILER Balzenberg, 3762 Erlenbach	20. U. LUGINBÜHL Sandgruben, 3703 Aeschiried
5. P. KAPPELER Stadi, 3647 Reutigen	13. F. SCHMOCKER Gattenfeld, 3762 Erlenbach	21. H. LUGINBÜHL 3703 Aeschiried
6. W. KÜNG Ansmatte, 3753 Oey	14. H. JUTZELER Thal, 3762 Erlenbach	22. C. DÄPP Senn, 3703 Aeschiried
7. P. TRUMMER Bächlen, 3753 Oey	15. A. ESCHLER 3762 Ringoldingen	23. K. OSWALD Alte Str., 3711 Emdthal
8. K. SCHÜTZ Oeyachern, 3758 Latterbach	16. A. WIDMER Zieg, 3762 Ringoldingen	24. R. VON KÄNEL Schrazenbühl, 3761 Scharnachtal

Tabl. 3. Localisations et propriétaires des exploitations examinées

Tous les bovins composant les troupeaux appartiennent aux races tachetées Simmental, Red Holstein et aux croisements issus de ces deux races.

Les prises de sang sont effectuées comme décrit dans le Chap. 4. 1. 1. 1. Le sang est prélevé dans des tubes de 10 ml contenant des granulés activant la coagulation (n° 26.323, Sarstedt). Les échantillons sont stockés dans un endroit frais, puis à la fin de la journée, sont centrifugés à 2000 x G pendant 20 min. Les sérums sont conservés au congélateur (- 20 °C).

Chaque échantillon sanguin est accompagné d'informations sur l'animal:

- numéro
- nom
- code racique
- mois et année de naissance
- lorsque l'animal est né en 1988 ou 1989, nom ou le numéro de sa mère est demandé
- l'animal est-il né à la ferme ou a-t-il été acheté ?
- lorsque l'animal a été acheté, la date de l'achat (mois et année) et sa provenance sont demandées
- l'animal a-t-il déjà été malade de la fièvre de pâture, si oui, quand ?

Toutes ces informations sont normalement indiquées dans la fiche d'identité accompagnant chaque animal. Très souvent, les renseignements sont fournis par le propriétaire.

4. 1. 1. 3. Infections expérimentales

Des infections expérimentales à *E. phagocytophila* (Infex) ont été entreprises sur des bovins de races croisées Simmental-Red Holstein. Nous avons utilisé des veaux mâles âgés de trois à cinq mois et pesant au début des expériences, entre 110 et 130 kg. Les animaux sont isolés par deux et installés dans des enclos de 20 m², prévus à cet effet. Ces enclos sont maintenus à une température de 23 °C, une humidité relative de 60 à 70 % et éclairés pendant 12 heures de 06.00 à 18.00. Les animaux sont

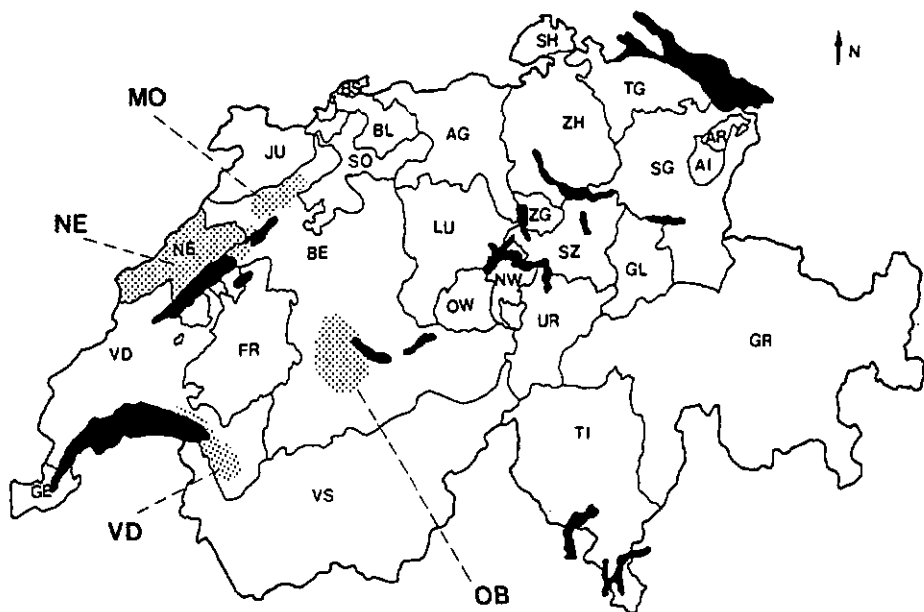


Fig. 4. Provenances des échantillons sanguins de chamois et de chevreuils

Régions	Sociétés de chasse	Lots distribués
OB Oberland bernois	Jagdverein Kandertal Jägerverein Niedersimmental Natur-, Jagd- und Wildschutzverein Stockental	150 150 120
MO Région de Moutier	Société des chasseurs du district de Moutier	150
NE Canton de Neuchâtel	La Diana et la Cantonale neuchâteloise	192
VD Est du canton de Vaud	Section Aigle de la Diana vaudoise	150

Tabl. 4. Sociétés de chasse participant aux prises de sang

nourris, durant leur séjour avec des cubes de maïs et des granulés pour bétail. Avant chaque expérience, les jeunes bovins ont été soumis à une période d'adaptation de deux à trois semaines.

Pendant toute la période des expériences, les animaux n'ont subi aucun traitement thérapeutique.

Toutes les prises de sang sont effectuées par ponction dans la veine jugulaire.

Pour les examens sérologiques, le sang est prélevé dans des tubes à prélèvement sous vide de 10 ml sans additif (Vacutainer® n° 606430, Becton Dickinson). Les échantillons reposent une heure à température ambiante, puis sont centrifugés à 2000 x G pendant 20 min. Les sérums sont ensuite conservés au congélateur (- 20 °C).

Pour les examens hématologiques, le sang est recueilli dans des tubes à prélèvement sous vide de 4.5 ml contenant un anticoagulant (EDTA K₃ 15 %, Vacutainer® n° 606452, Becton Dickinson).

A la fin des expériences, les veaux sont traités à la tétracycline (Oxysentin®, Ciba-Geigy).

Toutes les infections expérimentales, excepté les infex 9 et 10 (chez F. Pfister, Niederwangen b. Bern/Be) ont eu lieu au Centre de Recherches Agricoles de CIBA-GEIGY SA à St Aubin (Fribourg).

4. 1. 2. Les mammifères sauvages

Des prélèvements sanguins sur des chamois (*Rupicapra rupicapra*) et sur des chevreuils (*Capreolus capreolus*), provenant de régions où la fièvre de pâture sévit chez le cheptel bovin, ont été réalisés (Fig. 4).

Pour cela, lors des réunions précédant la période de chasse en automne, nous avons distribué 912 sets (Tabl. 4) affranchis à forfait et déjà adressés, contenant: une feuille d'information sur la maladie, un questionnaire (Annexe II), deux tubes pour les échantillons sanguins (un tube de 5 ml K-EDTA pour l'hématologie (Sarstedt) et un tube de 10 ml pour la sérologie (Sarstedt)), une seringue de 20 ml et son aiguille hypodermique pour le prélèvement du sang.

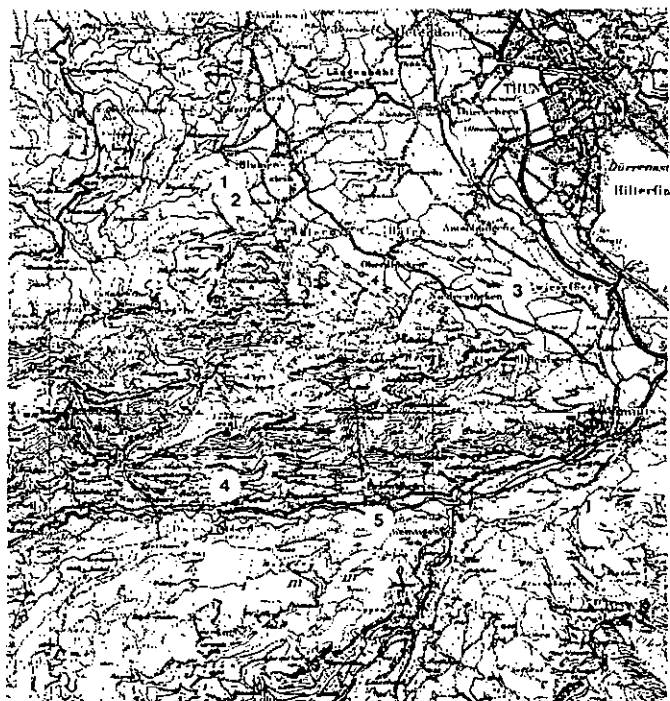


Fig. 5. Oberland bernois: localisations des piégeages de micromammifères et des récoltes de tiques (1 carré = 100 km²)

- | | | |
|----------------|----------------|---------------|
| 1. Hözli | 3. Rosselstein | 5. Gattenfeld |
| 2. Stierenweid | 4. Im Zil | |

Nous avons demandé expressément aux chasseurs de prélever le sang par ponction cardiaque à l'aide de la seringue, le plus rapidement et le plus proprement possible, et d'éviter de prendre du sang souillé des cavités thoracique ou abdominale. Ensuite, après avoir été deux ou trois fois légèrement remués, les tubes sont mis dans l'enveloppe, ainsi que le questionnaire rempli, et postés au plus vite. Dans le canton de Neuchâtel, la plupart des échantillons ont été récupérés directement par nos soins aux lieux de contrôles de la chasse.

4. 1. 3. Les micromammifères sauvages

Dans l'ouest de l'Oberland bernois, où l'étude sérologique sur les bovins a été entreprise, nous avons capturé des micromammifères aux alentours directs de pâturages "réputés" pour être des lieux d'infection (information donnée par les propriétaires de bétail) (Fig. 5):

1. Hözli 870 m (605.2 - 175.4), près de Blumenstein (Stockental)
2. Stierenweid 880 m (604.9 - 175.7), près de Blumenstein (Stockental)
3. Rösselstein 650 m (611.9 - 173.1), près de Niederstocken (Stockental)
4. Im Zil 920 m (604.2 - 167.9), près de Därstetten (Niedersimmental)
5. Gattenfeld 760 m (608.2 - 167.0), près de Erlenbach (Niedersimmental)

Les deux premiers pâturages sont fréquentés par les troupeaux de M. Heger, les autres sont visités, respectivement, par les animaux de MM. Kappeler, Schmocker et Treuthardt.

Les micromammifères sont capturés vivants à l'aide de pièges "tchèques", pièges en bois à porte latérale métallique basculante. Ils n'ont pas été disposés de manière à estimer la population des rongeurs, mais simplement à des endroits jugés propices.

Nous avons placés 100 à 120 pièges, en lignes parallèles, dans les sous-bois longeant les aires de pâture. Leurs relevés ont eu lieu le matin et le soir, pendant deux jours et une nuit, par lieu et par mois. Les rongeurs ont été appâtés avec des graines de tournesol et des granulés.

Les micromammifères capturés sont manipulés après narcose à l'éther. Les animaux sont marqués à l'oreille (encoche) et leur espèce déterminée. Tout

micromammifère recapturé est relâché. Le sang est ensuite prélevé dans le sinus rétroorbital à l'aide d'une pipette Pasteur (Ryley, 1960). Après coagulation et centrifugation des échantillons sanguins (20 min à 2000 x G), les sérums sont déposés dans des Eppendorf® et congelés (- 20 °C).

4. 1. 4. Les tiques

Les tiques ont été récoltées sur les pâturages cités dans le Chap. 4. 1. 3., aux endroits accessibles aux bovins (Fig. 5).

Elles sont collectées sur le terrain à l'aide de la technique du drapeau, puis déterminées et stockées au congélateur (- 20 °C) (cf. Chap. 4. 3. 2. 3.) dans des tubes à vis de 1.5 ml (n° 72694006, Sarstedt).

4. 2. Mise en évidence d'*E. phagocytophila*

4. 2. 1. Détection directe

Chez l'hôte vertébré, le diagnostic des infections aiguës à *E. phagocytophila* se fait par l'observation directe des agents pathogènes dans le sang périphérique.

L'examen direct des frottis sanguins est long et fastidieux. Grâce à une méthode de concentration leucocytaire, on peut sur un même champ microscopique observer de très nombreux globules blancs. Une meilleure visualisation est donc obtenue, à faible grossissement, des cellules infectées.

La méthode est la suivante:

Le sang est recueilli dans un tube de 5 ml contenant un anticoagulant (K-EDTA, Sarstedt) et centrifugé (5 min à 2000 x G). Le plasma est éliminé et, à l'aide d'une micro-pipette, une petite quantité de la couche intermédiaire leucocytaire est prélevée. Un étalement est effectué avec ces leucocytes. Le frottis est séché à l'air et fixé 10 min au méthanol. Il est ensuite coloré avec une solution Giemsa (Merk, n° 9204; 5 ml Giemsa dans 30 ml tampon PBS pH 7.2: 2.45 g de KH_2PO_4 + 5.45 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dans 5 l d'eau distillée) pendant 12 min. Le frottis est ensuite rincé à l'eau courante et séché.

Infex	N° de l'animal	Date de l'infection	Isolat	ml	DMSO	Passages	Conservation (- 80 °C) (en semaines)	Présence d' <i>E. phagocytophila</i> dans le sang de l'animal
9	"Sepp"	10.8.90	SR	50	+	1	18	+
* 10	737	19.11.90	SR	100	-	2	-	+
11	204	22.4.91	CH	50	-	1	39	+
12	205	22.4.91	SR	50	-	2	36	+
13	206	9.8.91	SR	50	+	3	15	+
14	207	9.8.91	SR	50	+	3	15	+
** 15	239	28.11.91	SR	40	+	3	30	-
** 16	240	28.11.91	SR	35	+	3	30	+
17	250	5.12.91	SR	50	-	4	16	+
18	253	5.12.91	SR	50	-	4	16	-
19	274	31.1.92	SR 1	50	+	-	78	-
20	273	31.1.92	SR 2	50	-	-	80	-
21	295	21.4.92	SR	50	-	5	18	+
22	296	21.4.92	SR	50	-	5	18	+
23	493	4.6.93	SR	50	-	6	77	+
24	494	11.6.93	SR	50	-	6	77	+

Tabl. 5. Infections expérimentales (Infex) de bovins

- * Infex 10 : l'animal a été infecté avec 100 ml de sang provenant de "Sepp" (Infex 9) prélevé le même jour.
- ** Ces deux veaux ont, une première fois, été infectés avec des tiques (cf. Chap. 4. 3. 3)

CH	=	Provenant d'une génisse, née en déc. 1987 à Malleray (BE) Prise de sang effectuée le 18.07.90
SR	=	Provenant d'une vache (Senta MM 4148) de Oey (8E) Prise de sang effectuée le 20.05.90
SR1	=	Provenant d'une vache (Lerche) de Wimmis (8E), née en nov. 85 Prise de sang effectuée le 31.07.90
SR2	=	Provenant d'une vache (Fichte MM 9914) de Erlenbach (8E) Prise de sang effectuée le 12.08.90

Tabl. 6. Isolats sanguins utilisés pour les infections expérimentales

Les formes caractéristiques d' *E. phagocytophila* apparaissent colorées en violet dans le cytoplasme des granulocytes. Les organismes se différencient facilement, surtout lorsqu'ils sont nombreux, des autres composants de la cellule (Annexe XI Photos).

La fine couche leucocytaire contient un nombre très important de cellules mononucléaires; la grande majorité des neutrophiles se trouve, après centrifugation, dans la fraction érythrocytaire (Carlson et Kaneko, 1973). Malgré cela, le nombre restreint de granulocytes est amplement suffisant pour le diagnostic d' *E. phagocytophila* lors de la phase aiguë de l'infection.

4. 2. 2. Détection indirecte

La détection indirecte se fait, soit par détection d'anticorps de classe IgG dirigés contre *E. phagocytophila* dans le sérum des hôtes vertébrés (cf. Chap. 4. 5. 1., 4. 5. 2., 4. 5. 3.), soit chez le vecteur par marquage des micro-organismes avec un immun-sérum provenant de veaux expérimentalement infectés n'ayant jamais eu de contact avec des tiques, associé dans un deuxième temps, à une antiglobuline fluorescente (cf. 4. 5. 4.).

4. 3. Infections expérimentales (Infex)

4. 3. 1. Infection de bovins avec du sang contaminé par *E. phagocytophila*

4. 3. 1. 1. Souches utilisées

a. Provenance

Pour toutes les infections expérimentales (Tabl. 5), nous avons utilisé quatre isolats sanguins provenant de vaches malades infectées naturellement (Tabl. 6): un provenant du Jura bernois (CH) et les trois autres de l'Oberland bernois (SR, SR 1 et SR 2).

b. Isolation

Avant la prise de sang, le cou de l'animal est désinfecté. A l'aide d'une canule de prélèvement (Capsa[®], n° 260000024, Bichsel AG), 100 ml de sang sont recueillis, au niveau de la veine jugulaire, dans une bouteille stérile à capuchon caoutchouc, contenant de l'héparine comme anticoagulant (5'000 ua/ml de sang, Liquémine[®], Roche SA).

c. Conservation

Très rapidement, le sang est ensuite réparti par doses de 10 ml, sous condition stérile, dans des tubes à fermeture à vis de 16 ml (n° 46.26100, ABS). Ces tubes sont conservés au congélateur (- 80 °C). Certains échantillons sanguins stockés, en vue d'une longue conservation, sont additionnés d'un cryoprotecteur (DMSO, diméthylsulfoxyde, n° 802912, Merck) jusqu'à une concentration finale de 10 %. L'adjonction du DMSO dans le sang doit être effectuée lentement, par petites quantités. Le mélange doit constamment être maintenu à froid.

4. 3. 1. 2. Inoculation des animaux

Avant l'inoculation, les tubes contenant le sang infecté sont rapidement décongelés dans de l'eau tiède. Ensuite, après avoir rasé et désinfecté le cou de l'animal (Vioform[®] spray, Ciba-Geigy), on injecte lentement le sang infecté, à l'aide d'une seringue dans la veine jugulaire.

4. 3. 1. 3. Contrôles des infections

La température des veaux est contrôlée quotidiennement trois fois par jour avant l'apparition de la phase fébrile, puis deux fois par jour. Lorsque la température redevient normale, un seul contrôle, le matin, est effectué jusqu'à la fin de l'expérience. Toute température supérieure ou égale à 39.5 °C est considérée comme de la fièvre (Tschudi, 1985).

Lorsque la température augmente, des frottis sanguins sont effectués afin de détecter *E. phagocytophila* (cf. Chap. 4. 2. 1).

4. 3. 2. Repas sanguin des tiques sur les animaux infectés

Les tiques utilisées sont des *Ixodes ricinus* provenant de l'élevage de l'Institut de Zoologie de Neuchâtel.

4. 3. 2. 1. Adultes

Autant de mâles que de femelles sont déposés dans des chambres en mousse synthétique (6x6 cm de côté et 3 cm de hauteur) collées sur les hanches préalablement rasées de l'animal. La partie supérieure de ces chambres est recouverte d'une gaze à fermeture rapide Velcro®. Ces chambres sont fixées quelques jours avant la mise des tiques. Les adultes sont déposés le jour de l'inoculation de l'animal et les chambres sont quotidiennement contrôlées. Par la suite, des tiques adultes ont également été placées sur la queue (cf. Chap. 4. 3. 2. 2.).

4. 3. 2. 2. Nymphes et larves

Les nymphes et les larves prennent leur repas sanguins sur les deux tiers supérieurs de la queue de l'animal. Celle-ci est préalablement tondu, puis le jour où la présence d' *E. phagocytophila* est détectée dans le sang, les tiques y sont déposées. La queue est ensuite entourée d'un sac en nylon fermé à ses deux extrémités par une bande adhésive. Le fourreau est contrôlé une à deux fois par jour. Les tiques gorgées et détachées sont recueillies en ouvrant son extrémité inférieure.

4. 3. 2. 3. Conservation des tiques

Les tiques gorgées sont mises dans des tubes à une température de 22 °C et une humidité de 95 %, jusqu'à la mue ou la ponte des femelles, puis l'éclosion des larves.

Infex	N° de l'animal	Date de l'infection	Inoculum
15	239	7.11.91	* 78 nymphes ← larves gorgées sur le veau 205 (infex 12)
16	240	7.11.91	** 40 nymphes + 35 femelles récoltées sur le terrain

Tabl. 7. Infections expérimentales de bovins avec des broyats de tiques

- * Nymphes stockées au congélateur (- 20 °C)
- ** Rösselstein (sept. 91). Tiques conservées vivantes.

Les tiques sont ensuite congelées (- 20 °C). Les tiques sont conservées dans des tubes contenant un milieu RPMI 1640 additionné de tampon Hepes 25 mM et L-Glutamine (n° 041-02400, Gibco) complété de 20 % de sérum foetal de veau (n° 011-06290, Gibco).

4. 3. 3. Infection de bovins avec des tiques

Deux veaux ont été inoculés avec des tiques *I. ricinus* (Tabl. 7). Les deux lots de tiques sont finement broyés dans un mortier et mélangés avec un milieu RPMI 1640 additionné de tampon Hepes 25 mM et L-Glutamine (n° 041-02400, Gibco). Après filtration à travers une gaze fine, 10 ml sont injectés dans la veine jugulaire des animaux. La température rectale des animaux est contrôlée et des analyses sanguines (cf. Chap. 4. 6) sont effectuées quotidiennement.

4. 4. Production de l'antigène

L'antigène est produit à partir de cultures à court terme d' *E. phagocytophila* dans des neutrophiles de bovins provenant de veaux infectés expérimentalement avec la souche SR (cf. Chap. 4. 3. 1.).

4. 4. 1. Prélèvement du sang chez les animaux infectés

Après avoir rasé et désinfecté le cou de l'animal (Vioform® spray, Ciba-Geigy), les prélèvements sanguins se font comme décrit dans le Chap. 4. 3. 1. 1. b. Pour une culture, 300 ml de sang sont récoltés à chaque fois.

4. 4. 2. Isolation et culture d' *E. phagocytophila* dans des neutrophiles

La technique d'isolation et de culture d' *E. phagocytophila* dans les cellules de bovins est adaptée de la méthode décrite par Jongejan *et al.* (1989), effectuées avec des cellules caprines.

Le sang prélevé est divisé en parts de 35 ml réparties dans six tubes à fond conique de 50 ml (BlueMax™, n° 2070, Falcon®, Becton Dickinson) et centrifugé (15 min à 1500 x G). Le plasma, la couche intermédiaire leucocytaire et la partie supérieure de la fraction érythrocytaire sont éliminés. Le contenu restant (globules rouges et leucocytes) est bien mélangé. Les érythrocytes sont lysés avec 20 ml d'H₂O distillée que l'on laisse agir 30 secondes en mélangeant doucement. L'isotonicité est rétablie en ajoutant 10 ml de NaCl 2.7 %. Le niveau du tube est alors complété à 50 ml avec du tampon saccharose-phosphate-glutamate (Tampon SPG) (Annexe III). La suspension cellulaire est centrifugée de nouveau (10 min à 200 x G). Une partie du surnageant est éliminée jusqu'à laisser environ 5 ml. Après avoir bien décollé les cellules du culot, on recommence une deuxième lyse cellulaire, avec adjonction de NaCl 2.7 % et de tampon SPG. On centrifuge de nouveau (10 min à 200 x G). Le surnageant est éliminé et les cellules sont bien décollées du culot. Le contenu des six tubes est ensuite réparti dans deux tubes. Le culot est lavé avec du tampon SPG et centrifugé (10 min à 200 x G). Il est ensuite resuspendu dans un milieu de culture RPMI 1640 enrichi (Annexe III). Les cultures sont incubées 12 - 24 heures à 37 °C et 5 % CO₂ dans des bouteilles de culture de 75 ml (n° 3375, Costar®).

Les manipulations se font sous hotte stérile. Tous les produits utilisés doivent être stériles et conservés froid.

4. 4. 3. Contrôles des cultures

Après 12 heures d'incubation, les cultures sont examinées régulièrement par cytocentrifugation (Préparation "cytospin" Shandon, centrifugeuse Hettich, Universal 30 RF, Inotech SA). On prélève 100 µl de culture que l'on centrifuge 10 min à 200 x G. Les lames sont ensuite séchées, fixées et colorées au Giemsa (cf. Chap. 4. 2. 1.) Les préparations "cytospin" ont l'avantage de concentrer les cellules infectées sur une petite surface (Ø env. 4 mm), ainsi beaucoup plus de cellules peuvent être vues dans le champ du microscope. De cette manière, on connaît la concentration de la culture et le taux de neutrophiles infectés.

Après 24 heures d'incubation, le nombre d'inclusions d' *E. phagocytophila* dans les cellules, ainsi que le nombre de cellules infectées, augmentent et les cultures

dégénèrent rapidement. Nous avons préféré, pour une meilleure lecture des lames en IFI, laisser les cultures incuber 18 à 24 heures. De cette manière, un nombre moins important de cellules est détruit et les neutrophiles restent fortement infectés par *E. phagocytophila* (Annexe XI Photos).

4. 4. 4. Préparation des lames d'antigène

Les cultures sont lavées avec du tampon PBS pH 7.2 (Annexe III), centrifugées (10 min à 200 x G), puis de nouveau resuspendues dans du tampon PBS. Elles sont alors appliquées avec un "technical pen" (Leroy®, Keuffel & Esser Co.), muni d'un réservoir que l'on remplit avec de l'antigène, sur des lames porte-objets pourvues de masques imprimés standard (30 cercles, Ø 2 mm, n° 4016, Semadeni). On fait de cette manière 30 spots d'environ 1 mm de diamètre. Après les avoir séchées, les lames sont fixées à l'acétone 100 % (10 min). Elles sont alors prêtes à être utilisées ou stockées (-80 °C).

4. 4. 5. Conservation de l'antigène

Les lames d'antigènes sont conservées par groupes de une à quatre lames, selon le besoin. Les lots sont enveloppés dans du papier de laboratoire, mis dans des enveloppes plastiques hermétiques et stockés au congélateur (-80 °C).

4. 5. Sérologie: test d'immunofluorescence indirecte (IFI)

4. 5. 1. Les bovins

4. 5. 1. 1. Déroulement du test

Le déroulement du test est adapté de la méthode décrite par Jongejan *et al.* (1989).

Les lames d'antigène sont laissées à température ambiante dans leur sachet pendant 45-60 min. Ensuite, elles sont incubées pendant 45 min dans du tampon

glycine acide pH 2.8 (Annexe III), puis de nouveau trois fois pendant 5 min dans le même tampon. On restitue le pH en les lavant trois fois pendant 5 min dans du tampon PBS pH 7.2. Les sérums à tester sont dilués, en progression géométrique de deux, dans du tampon PBS pH 7.2 et appliqués sur l'antigène pendant 30 min à 37 °C et humidité saturée. Les lames sont ensuite lavées comme précédemment avec du tampon PBS et incubées, pendant 30 min à 37 °C et humidité saturée, avec le conjugué. Elles sont de nouveau lavées et montées avec deux gouttes de glycérine tamponnée (glycérine/tampon PBS: 9/1).

Les observations s'effectuent au microscope à fluorescence, en lumière U.V. (365 nm), à un grossissement en immersion de 400 x. (Microscope Olympus BH2, équipement de fluorescence BH-RFL-W).

4. 5. 1. 2. Conjugué fluorescent

Nous avons utilisé un conjugué FITC (Fluorescein IsoThiocyanate Conjugate, ICN, ImmunoBiologicals) contre des immunoglobulines IgG (H+L) de bovin, préparé à partir de sérum de lapin. Le conjugué est dilué 1:80 dans du tampon PBS pH 7.2 additionné de 0.2 % de bleu d'Evans (Fluka, n° 46160) comme contre-coloration.

4. 5. 1. 3. Contrôles

Des neutrophiles isolés à partir de sang provenant d'animaux sains sont utilisés comme antigène contrôle négatif.

Les sérums de bovins, n'ayant jamais eu de contacts avec des tiques, ou des veaux utilisés dans les infections expérimentales, juste avant l'inoculation, sont utilisés comme contrôle négatif.

Les sérums de bovins, infectés expérimentalement ou naturellement, sont utilisés comme contrôle positif.

4. 5. 1. 4. Seuil de spécificité

Des tests IFI sur 17 veaux, n'ayant jamais eu de contacts avec des tiques, ont été effectués. Expérimentalement, le seuil de spécificité a été fixé à 1:40. Tout titre égal ou supérieur chez les sérums de bovins est considéré comme positif. Nous avons considéré comme négative la dilution du sérum où aucune fluorescence du micro-organisme est observée (Annexe XI Photos).

4. 5. 1. 5. Analyses de sérums de bovins sur d'autres antigènes rickettsiens

Des analyses en IFI ont été entreprises avec 50 sérums bovins, possédant des titres élevés d'anticorps IgG dirigés contre *E. phagocytophila*, sur des antigènes de *E. chaffeensis*, *E. canis*, *Coxiella burnetti* et *Rickettsia helvetica*.

Les résultats sont exposés dans l' Annexe IV.

a. Provenance des antigènes

Ces antigènes proviennent de l'Unité des Rickettsies de Marseille (CHU La Timone, Prof. D. Raoult). Les antigènes sont conservés dans 0.1 % d'azide de sodium, deux ou trois mois au réfrigérateur (4 °C), ou stockés durant plusieurs mois au congélateur (- 20 °C).

C. burnetti, *E. chaffeensis* et *E. canis* ont été produits à partir de cultures sur des lignées cellulaires de macrophages canins (DH82).

Rickettsia helvetica provient d'infections expérimentales chez des souris à partir d'une souche suisse isolée d' *I. ricinus*.

b. Déroulement des tests

Les lames d'antigènes sont préparées juste avant l'usage (Méthode utilisée dans l'Unité des Rickettsies, Marseille).

L'antigène est appliqué à la pointe de plume sur des lames porte-objets pourvues de masques imprimés standard (10 cercles, Ø 6 mm, n° 4012, Semadeni). Plusieurs antigènes peuvent être mis dans le même cercle. Les lames sont séchées (10 min à l'étuve 37 °C), puis fixées 10 min à l'acétone 100 %. Les sérums dilués 1:25 et 1:50 dans du tampon PBS pH. 7.4 - lait 3 % (Annexe III) y sont déposés. Après 30 min à l'étuve (37 °C) et humidité saturée, les lames sont lavées (deux fois 10 min PBS pH. 7.4 - Tween Standard 0.1 % (Annexe III) et une fois H₂O distillée). On les sèche et on dépose le conjugué (30 min à l'étuve et humidité saturée). Les lames sont ensuite lavées comme précédemment, puis séchées. On dépose deux gouttes de glycérine/PBS (1/9) et une lamelle.

Les observations s'effectuent comme précédemment décrit dans le Chap. 4. 5. 1. 1.

c. Conjugués fluorescents

Les conjugués fluorescents contre des immunoglobulines IgG de bovin, chèvre et souris utilisés sont ceux cités dans les Chap. 4. 5. 1. 2., 4. 5. 2. et 4. 5. 3..

Nous avons également utilisé pour les contrôles positifs (cf. Chap. 4. 5. 1. 5. d), des conjugués FITC (ICN Biomedicals, Inc.) contre des immunoglobulines IgG (H+L) de chien (dilut. 1:200), préparé à partir de sérum de lapin et un conjugué FITC (BioMérieux) contre des immunoglobulines IgG (H+L) humaines (dilut. 1:200), préparés à partir de sérum de chèvre.

Tous ces conjugués sont dilués dans du tampon PBS pH 7.2 additionné de 0.2 % de bleu d'Evans.

d. Contrôles

Les sérums positifs de contrôle utilisés, ainsi que les titres IgG homologues en IFI et les seuils de spécificité, sont les suivants:

- antisérum humain	<i>C. burnetti</i> (phase 2)	1:40'960	1:100
- antisérum souris	<i>R. helvetica</i>	1:256	1:128
- antisérum humain	<i>E. chaffeensis</i>	1:5120	1:50
- antisérum canin	<i>E. canis</i>	1:200	1:50

4. 5. 2. Les mammifères sauvages

Pour les mammifères sauvages (chamois et chevreuils), le déroulement des tests IFI est semblable à celui effectué pour les bovins (cf. Chap. 4. 5. 1).

Nous avons utilisé un conjugué FITC (ICN Biomedicals, Inc.) contre des immunoglobulines G (H+L) de chèvre, préparé à partir de sérum de lapin. Le conjugué est dilué 1:80 dans du tampon PBS pH 7.2 additionné de 0.2 % de bleu d'Evans.

Des sérums de chèvres n'ayant jamais eu de contact avec des tiques ont servi de contrôle négatif.

Des sérums de chevreuils ont également été testés sur des antigènes de *Rickettsia helvetica* (cf. Chap. 4. 5. 1. 5.).

4. 5. 3. Les micromammifères sauvages

Pour les micromammifères sauvages, le déroulement des tests IFI est identique à celui effectué pour les bovins (cf. Chap. 4. 5. 1).

Nous avons utilisé un conjugué FITC (ICN Biomedicals, Inc.) contre des immunoglobulines G (H+L) de souris, préparé à partir de sérum de lapins. Le conjugué est dilué 1:80 dans du tampon PBS pH 7.2 additionné de 0.2 % de bleu d'Evans.

Des sérums de souris de laboratoire, n'ayant jamais eu de contact avec des tiques, ont servi de contrôle négatif.

4. 5. 4. Les tiques

4. 5. 4. 1. Préparation des lames d'antigène

Sous la loupe binoculaire, les organes internes des tiques sont étendus à l'aide de pinces fines sur des lames préalablement dégraissées. Deux types de lames ont été

utilisés: des lames porte-objets pourvues de masques imprimés standard (10 cercles, \varnothing 6 mm, n° 4012 ou 30 cercles, \varnothing 2 mm, n° 4016, Semadeni) et des lames sur lesquelles des cercles ont été gravés manuellement. Ces dernières doivent être bien nettoyées avec de l'alcool pour enlever les particules de verre provoquées par la gravure. Le matériel doit être étalé le plus uniformément possible sur tout le cercle, afin d'en rendre la lecture plus facile. Parfois, pour mieux étendre le contenu de la tique, on ajoute un peu de tampon PBS pH 7.2. Les lames sont ensuite laissées quelques heures dans une étuve à 37 °C, puis sont fixées dans un bain d'acétone 100% pendant 20 min. Elles peuvent être stockées ainsi à 4 °C ou pour plus longtemps au congélateur (-20 °C).

4. 5. 4. 2. Déroulement du test

Pour les tiques, le déroulement des tests IFI est identique à celui effectué pour les bovins (voir Chap. 4. 5. 1), à la seule différence près qu'une d'incubation préalable des lames dans le tampon glycine n'est pas nécessaire.

Les immun-sérums viennent des veaux infectés expérimentalement et sont dilués dans du PBS pH. 7.2 (1:80 et 1:160). Les anticorps contre *E. phagocytophila* sont associés dans un deuxième temps à un conjugué FITC (cf. Chap. 4. 5. 1. 2)

4. 5. 4. 3. Contrôles

Des tiques non infectées, provenant de l'élevage d' *I. ricinus* de l'Institut de Zoologie de Neuchâtel, sont utilisées comme contrôle négatif.

On utilise également des neutrophiles infectés comme antigène contrôle positif.

4. 6. Hématologie

Les prises de sang chez les veaux infectés expérimentalement, sont effectuées quotidiennement entre 7h00 et 8h00. La première est accomplie juste avant l'inoculation (Jour 0).

4. 6. 1. Numérotation des érythrocytes, des leucocytes et des thrombocytes

Le comptage des érythrocytes, des leucocytes et des thrombocytes est effectué automatiquement et électroniquement à l'aide d'un compteur cellulaire Sysmex E-500 (TOA Medical Electronics Co., Ltd).

Les érythrocytes sont exprimés en $\times 10^{12}/l$, les leucocytes et les thrombocytes, en $\times 10^9/l$.

4. 6. 2. Détermination de l'hématocrite et dosage de l'hémoglobine

La détermination du volume des globules rouges par rapport au volume de sang total et le dosage de l'hémoglobine ont été réalisés également par un Sysmex E-500.

L'hématocrite est exprimée en % et l'hémoglobine en g/dl.

4. 6. 3. Etablissement de la formule leucocytaire

L'établissement de la formule leucocytaire est accompli sur un étalement mince sur lame microscopique effectué à l'aide d'un appareil " Uni - Smear Spinner " (Coleman 90, Perkin Elmer). Après avoir séché la lame, elle est colorée au May-Grünwald-Giemsa. Les frottis sanguins sont d'abord colorés et fixés dans une solution filtrée de May - Grünwald (Merck, n° 1424) pendant 5 min, puis rincés à l'eau bidistillée. Ils sont ensuite plongés dans une solution Giemsa (1/30 PBS pH 7.0: Na_2HPO_4 0.041 mol/l et KH_2PO_4 0.028 mol/l. Solution Ciba-Geigy) pendant 15 min, puis rincés à l'eau du robinet et séchés par ventilation.

Les préparations sont examinées au microscope (Olympus BH-2) à un grossissement 400 x.

Pour chaque lame, deux comptages différentiels de 100 cellules sont effectués. Les valeurs relatives obtenues sont transformées également en valeurs absolues ($\times 10^9/l$).

4. 6. 4. Détection du taux de cellules infectées

Afin d'évaluer le pourcentage de cellules infectées, les préparations, réalisées pour les comptages différentiels leucocytaires sont utilisées (grossissement 1000 x). Pour chaque frottis, 100 neutrophiles sont examinés. La présence d' *E. phagocytophila* chez d'autres cellules est également notée.

4. 6. 5. Valeurs hématologiques normales de référence

Pour mettre en évidence des valeurs hématologiques pathologiques chez des veaux expérimentalement infectés par *E. phagocytophila*, nous les avons comparées à des valeurs provenant de bovins sains (Tables de référence, Tschudi, 1985) (Annexe IX). Toute valeur s'écartant des références sera considérée comme anormale. Les suffixes -cytose ou -philie et -pénie correspondront toujours respectivement à une augmentation ou une diminution d'un type de cellules par rapport à ces tables de référence. Dans l'Annexe IX, des valeurs hématologiques normales sont présentées pour des veaux de deux à quatre mois et des bovins adultes. Les animaux que nous avons infectés peuvent atteindre, à la fin des expériences, six mois, nous avons alors considéré comme anormale toute valeur hématologique en dehors des limites; et ceci, aussi bien pour la catégorie deux à quatre mois que pour la catégorie adulte.

4. 7. Tests statistiques

- Dans les Chap. 5. 2 et 5. 3., nous avons appliqué le test du chi-carré (χ^2) pour la comparaison des fréquences (différence significative: $p \leq 0.05$).

- Dans le Chap. 5. 2., pour exprimer le titre moyen mensuel d'anticorps chez les bovins, nous avons eu recours à la moyenne géométrique des titres d'anticorps (Annexe V). D'autre part, pour mettre en évidence les variations de la distribution des titres d'anticorps, nous avons utilisé des figures "box plots" (Annexe V).

- Dans le Chap. 5. 5., pour confirmer les résultats sur la variation des valeurs hématologiques après des infections expérimentales à *E. phagocytophila*, des statistiques ont également été utilisées.

Pour chaque animal, nous avons pris la moyenne des valeurs sur une période donnée (P). Suivant la durée de l'expérience, on aura quatre ou cinq périodes, de quatre ou cinq jours.

1ère période (P1):	jours 0 à 3,	correspondant au début de l'expérience
2ème période (P2):	jours 4 à 7	
3ème période (P3):	jours 8 à 11	
4ème période (P4):	jours 12 à 16,	correspondant à la fin de l'expérience, si l'expérience dure 15 ou 16 jours
5ème période (P5):	jours 17 à 21,	correspondant à la fin de l'expérience, si l'expérience dure 21 jours.

Les valeurs de la période P1 sont considérées comme des valeurs de début d'expérience.

Un test T de Student est utilisé pour comparer les valeurs P1 (début de l'expérience) avec les valeurs des périodes suivantes (P2 à P5). Lorsque les variances entre deux périodes sont significativement différentes ($p \leq 0.05$), le nombre de degré de liberté du test de Student devient trop petit; dans ce cas, nous avons employé le test U de Mann-Whitney (test non paramétrique) (différence significative: $p \leq 0.05$).

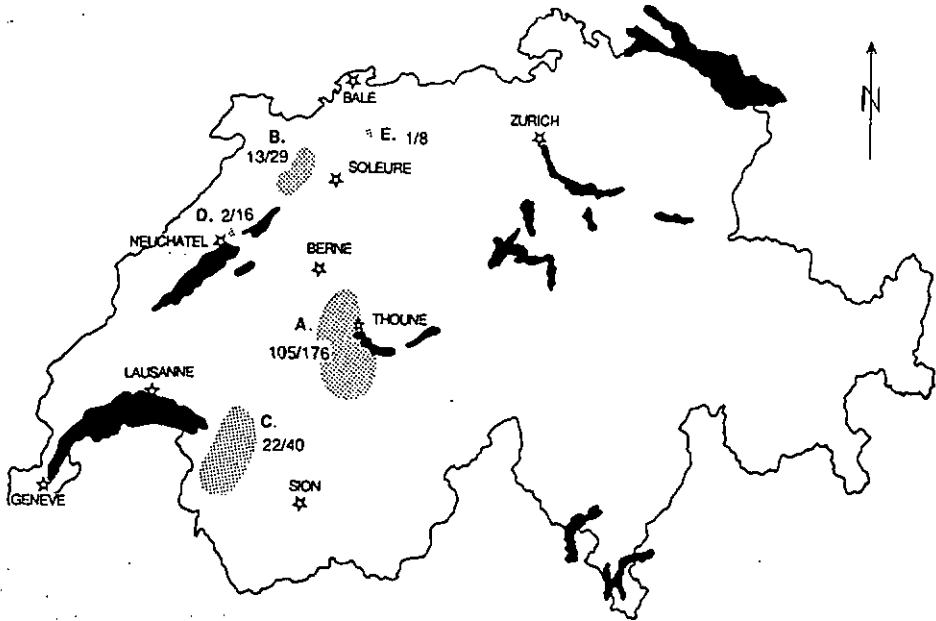


Fig. 6. Régions endémiques d'infections à *E. phagocytophila* en Suisse

Cas diagnostiqués/Cas déclarés entre 1988 et 1990

(Les Fig. 7 à 10 présentent les localisations exactes des cas diagnostiqués)

5. RESULTATS ET DISCUSSIONS

5. 1. Répartition géographique des cas d'infections à *E. phagocytophila* chez les bovins en Suisse

5. 1. 1. Enquête auprès des vétérinaires

Au début de nos recherches, nous nous sommes mis en contact avec des vétérinaires s'occupant de gros bétail, afin de savoir s'ils avaient déjà remarqué des animaux présentant des symptômes de la maladie. Sur les 850 questionnaires que nous leur avons envoyés, 390 vétérinaires, provenant de toutes les régions de Suisse, nous ont répondu. Parmi eux, 51 avaient constaté des cas cliniques suggérant une fièvre de pâture. Ces derniers provenaient de 12 cantons (Argovie, Appenzell, Berne, Grisons, Jura, Lucerne, Neuchâtel, Saint-Gall, Soleure, Tessin, Vaud et Valais). La grande majorité citaient des bovins (48) comme animaux atteints d'ehrlichiose, mais quelques uns indiquaient également des moutons (3) et des chevaux (2).

5. 1. 2. Cas diagnostiqués

Grâce à l'examen des échantillons collectés ou envoyés dans un deuxième temps par les vétérinaires, nous avons pu détailler les aires contaminées et la fréquence de l'infection en Suisse. Entre 1988 et 1990, 269 prélèvements sanguins provenant de bovins suspects originaires de six cantons (Berne, Neuchâtel, Soleure, Vaud et Valais) furent analysés afin de mettre directement *E. phagocytophila* en évidence. L'examen des frottis sanguins nous a permis de détecter la rickettsie dans 143 échantillons.

Une première carte de la distribution géographique des aires endémiques a pu être réalisée. La Fig. 6 signale les cinq régions où la fièvre de pâture sévit chez les bovins:

- A. Oberland bernois, à l'ouest du lac de Thoune
- B. Jura bernois, dans la région de Moutier
- C. Chablais vaudois et valaisan
- D. Plateau de Diesse, dans les cantons de Neuchâtel et de Berne
- E. Jura soleurois



Fig. 7. Localisation des cas d'infections à *E. phagocytophila*:
 Région du lac de Thonon (A) (1 carré = 100 km²)

- | | | |
|----------------|------------------|------------------|
| 1. Wichtrach | 10. Aeschiried | 19. Gattenfeld |
| 2. Blumenstein | 11. Aeschi | 20. Ringoldingen |
| 3. Pohlern | 12. Emdthal | 21. Balzenberg |
| 4. Oberstocken | 13. Krattigen | 22. Därstetten |
| 5. Rosselstein | 14. Scharnachtal | 23. Weissenburg |
| 6. Reutigen | 15. Kiental | 24. Diemtigen |
| 7. Kapf | 16. Latterbach | 25. Horboden |
| 8. Wimmis | 17. Oey | 26. Entschwil |
| 9. Hasli | 18. Erlenbach | |

Sur les Fig. 7 à 10 sont indiqués, par région, les lieux d'origine des bovins infectés. Chaque point blanc sur les cartes représente un ou plusieurs cas de fièvre de pâture diagnostiqués. Tous les cas proviennent d'endroits situés entre 400 et 1300 m.

A part les trois petites aires isolées dans le nord et nord-ouest du pays, dans les cantons de Neuchâtel, Berne et Soleure, la presque totalité des cas diagnostiqués (88.8 %) se situe dans 2 larges zones, une dans le Chablais vaudois et valaisan, l'autre à l'ouest du lac de Thoune. Jusqu'à ce jour, cette dernière constitue la région la plus touchée (73.4 %) par la fièvre de pâture.

5. 1. 3. Discussion

Jusqu'à présent, les quelques cas d'infections à *E. phagocytophila* inventoriés en Suisse provenaient de l'ouest de l'Oberland bernois. Bien que l'agent responsable n'ait été isolé qu'en 1987 (Pfister *et al.*, 1987), la fièvre de pâture est connue dans cette région depuis le début du siècle, et est toujours intimement associée à une présence massive de tiques sur les bovins.

Dans l'Oberland, le Chablais vaudois et valaisan, ainsi que dans la chaîne du Jura, les aires de répartition de la fièvre de pâture et de la piroplasmose bovine, à cause de la présence du même vecteur, se superposent. Dans ces régions, *I. ricinus* est la seule tique présente sur les bovins (Morisod *et al.*, 1972; Aeschlimann *et al.*, 1975; Brossard, 1976; Gern *et al.* 1982; Gern, 1984).

Dans le Chablais, plus précisément dans la basse plaine du Rhône, région située en aval de Martigny et s'étendant jusqu'au lac Léman, *I. ricinus* transmet la piroplasmose; l'agent responsable a été identifié par Morisod *et al.* (1972) comme *Babesia bovis*. Entre 1969 et 1973, Brossard (1976) a recensé 26 cas de piroplasmose, dont la plupart (21/26) ont été confirmés par la présence du sporozoaire dans les érythrocytes des animaux malades. Du fait de la forte similarité des signes cliniques entre les deux infections: apathie, température élevée, manque d'appétit, baisse de la production laitière chez les vaches et surtout absence d'hémoglobinurie, certains cas



Fig. 8. Localisation des cas d'infections à *E. phagocytophila*:
Jura bernois et soleurois (B, E) (1 carré = 100 km²)

- 1. Beinwil (SO)
- 2. Roches (BE)
- 3. Montagne de Moutier
- 4. Petit Champoz
- 5. Corcelles
- 6. Malleray

cliniques de fièvre de pâture ont, auparavant, très bien pu passer pour des cas de piroplasmose.

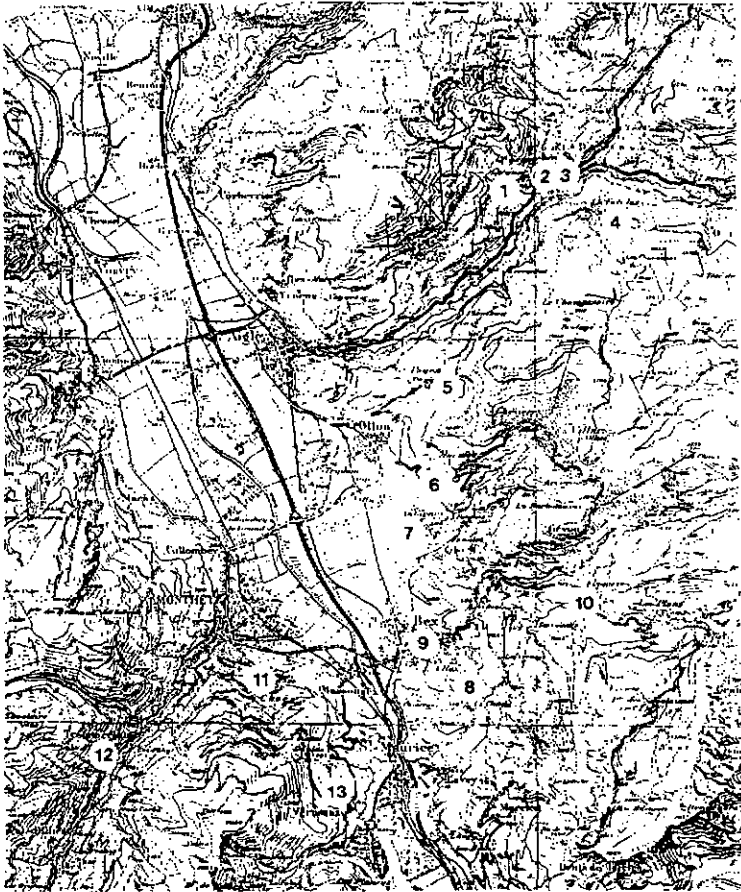
Les symptômes atténués de piroplasmose (absence d'hémoglobinurie) pourraient également nous faire penser à une infection double. Purnell *et al.* (1976a, 1977) ont démontré chez des veaux splénectomisés que les altérations hématologiques provoquées par une infection simultanée d' *E. phagocytophila* et *B. divergens*, sont moins graves que celles causées par une unique infection de babésie et ressemblent plus à une fièvre de pâture. D'après les auteurs, en présence des *Ehrlichieae* dans le sang, la parasitémie érythrocytaire produite par le piroplasma est diminuée.

La chaîne jurassienne est également connue comme zone endémique de piroplasmose bovine. Dans le canton du Jura, en particulier dans le Clos-du-Doubs, où se développent encore régulièrement des cas typiques de piroplasmose, *I. ricinus* est le vecteur de *Babesia divergens* (Aeschlimann *et al.*, 1975; Quenet, 1978; Gern *et al.*, 1982; Gern, 1984; Gern *et al.*, 1988). Wyssmann (1922) décrit également des cas de piroplasmose dans les régions de Laufon, Tavannes et Roggenburg. Les formes graves de piroplasmose se différencient clairement de la fièvre de pâture par la présence d'hémoglobinurie. Malgré tout, certains cas, diagnostiqués comme des formes bénignes de piroplasmose, pourraient être en fait des ehrlichioses.

La piroplasmose bovine a également été citée dans la région de Thoune par Wyssmann (1922). Depuis lors, un cas de piroplasmose à *B. divergens* a été décrit chez un veau (9 mois) présentant une légère hémoglobinurie (Pfister, 1992, comm. pers.).

Cette superposition entre la répartition géographique d' *E. phagocytophila*, celle d' *I. ricinus* et des maladies que le vecteur transmet (piroplasmose chez les bovins, pyémie et louping-ill chez les mouton) a été abondamment décrite (MacLeod, 1932; Gordon *et al.*, 1932a; Foggie, 1956; Tuomi, 1965, 1966; MacKellar et Donnelly, 1968; Collins *et al.*, 1970; Kuil *et al.*, 1972; Purnell *et al.*, 1976a, 1977; Purnell et Brocklesby, 1978; Friedhoff, 1981; Webster et Mitchell, 1989).

Cette première distribution géographique des cas d'infections à *E. phagocytophila* n'est pas exhaustive et de nouveaux foyers apparaîtront dans le futur, lorsqu'un



**Fig. 9. Localisation des cas d'infections à *E. phagocytophila*:
Chablais vaudois et valaisan (C) (1 carré = 100 km²)**

- | | |
|-----------------|-------------------|
| 1. Cergnat (VD) | 8. Le Châtel |
| 2. Le Sépey | 9. Bex |
| 3. La Combe | 10. Frenières |
| 4. La Forclaz | |
| 5. Panex | 11. Chœx (VS) |
| 6. Glutières | 12. Troistorrents |
| 7. Antagnes | 13. Vérossaz |

nombre plus important de vétérinaires seront sensibilisés. Dernièrement, *E. phagocytophila* a été isolé dans le sang de moutons à Cressier (Neuchâtel) et dans le Val Maggia (Tessin), ainsi que chez des bovins dans le Rheintal (Saint Gall) et dans la vallée de Joux (Vaud) (Pfister, 1993, comm. pers.). D'autre part, cette carte est incomplète, car elle ne tient compte que des infections graves ayant exigé l'intervention d'un vétérinaire. L'existence de guérisons spontanées chez certains animaux fournissent une raison pour ne pas appeler le praticien. Des cas de fièvres de pâture, surtout chez les animaux non-lactants, passent également fréquemment inaperçus des propriétaires. Pour toutes ces raisons, le nombre des cas déclarés doit être certainement très inférieur au nombre réel total des infections à *E. phagocytophila* en Suisse.

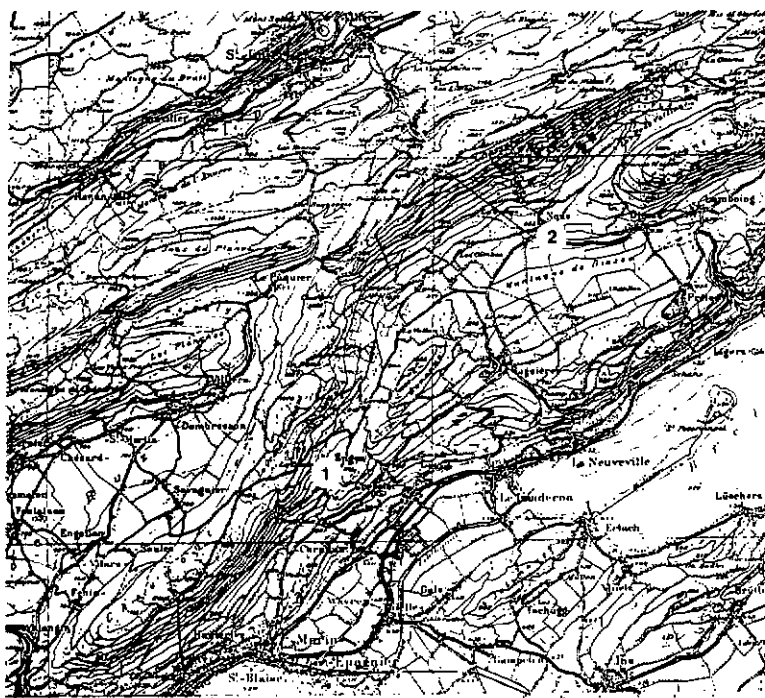


Fig. 10. Localisation des cas d'infections à *E. phagocytophila*:
Région du plateau de Diesse (D) (1 carré = 100 km²)

1. Enges (NE)
2. Nods (BE)

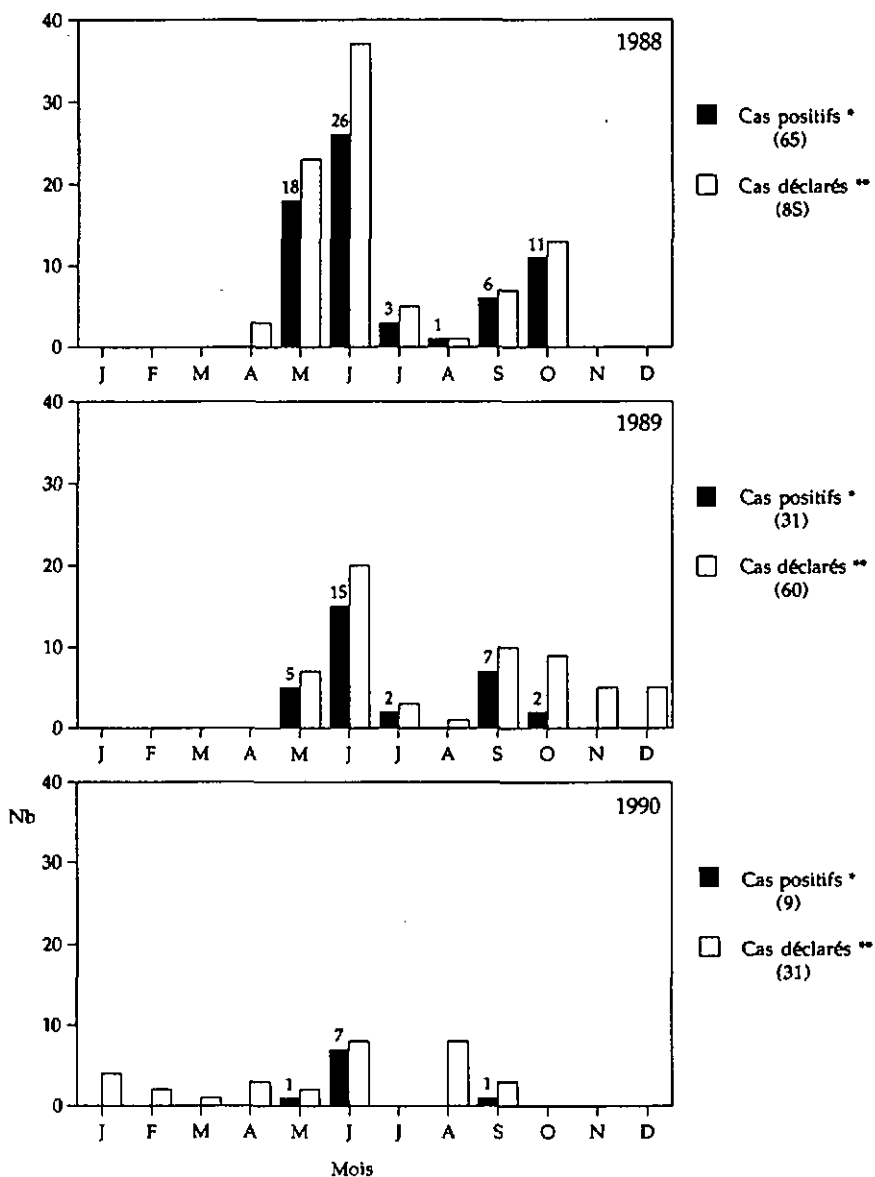


Fig. 11. Répartition annuelle des cas de fièvre de pâture dans l'ouest de l'Oberland bernois (1988, 1989 et 1990)

* diagnostic par mise en évidence directe d' *E.phagocytophila* dans le sang

** animaux présentant des signes cliniques de fièvre de pâture

5. 2. La fièvre de pâture dans l'ouest de l'Oberland bernois

5. 2. 1. Répartition annuelle des cas de maladie

Dans cette région de l'Oberland bernois, entre 1988 et 1990, comme en général toutes les années, les animaux sont arrivés sur les pâturages au printemps, selon les exploitations, entre le 20 avril et la première semaine de mai. A la fin du mois de juin, ainsi qu'en juillet et août, certains animaux, en particulier des génisses, estivent sur des alpages d'altitude. En automne, entre la dernière semaine de septembre et la première semaine d'octobre, les bovins rentrent dans les étables pour passer l'hiver (6 - 7 mois, d'octobre à avril).

Pendant ces trois ans, 176 prélèvements sanguins de bovins, présentant des symptômes cliniques d'infection à *E. phagocytophila*, nous sont parvenus (Fig. 11). Les agents pathogènes ont pu directement être mis en évidence dans 105 échantillons (59.7 %).

Quelle que soit l'année, les premiers cas ont été diagnostiqués en mai, puis leur nombre atteint des maximums en juin. En juillet et en août, ils diminuent brusquement ou disparaissent, puis réapparaissent à nouveau en septembre et en octobre. Aucun cas de fièvre de pâture, diagnostiqué par détection directe d' *E. phagocytophila*, n'est survenu pendant la période hivernale. Néanmoins, pendant les mois de novembre 1989 à avril 1990, des vétérinaires nous ont signalés 20 bovins présentant des signes cliniques d'infection.

La différence entre le nombre de cas cliniques déclarés en 1988 (85), 1989 (60) et 1990 (31) s'explique par le fait que les vétérinaires de la région deviennent de plus en plus familiers avec les symptômes de la maladie et traitent ainsi de plus en plus les animaux sans envoyer d'échantillons sanguins au laboratoire pour le diagnostic.

MOIS	1988			1989							
	Sept	Oct	Nov	Fév	Avr	Mai	Juin	Août	Sept	Oct	Déc
SERUMS TESTES	43	185	291	287	344	275	118	211	165	200	390
SEROPREVALENCE (%)	25.6	48.6	32.6	21.6	8.1	25.1	12.7	37.0	47.9	34.0	40.0

Tabl. 8. Nombre de sérums testés et séroprévalences mensuelles chez des bovins dans l'ouest de l'Oberland bernois

5. 2. 2. Etude sérologique du cheptel bovin

Les animaux infectés par *E. phagocytophila* présentent une infection démontrable de durée très limitée. En dehors de la phase aiguë de la maladie, les *Ehrlichiae* ne sont plus décelables par le simple examen des frottis sanguins en microscopie. Le diagnostic sérologique est alors nécessaire, permettant la mise en évidence d'anticorps spécifiques, signes d'un contact passé avec l'agent responsable.

En recherchant des anticorps IgG dans le sang des bovins, nous tentons d'évaluer la prévalence d' *E. phagocytophila* au sein des troupeaux, ainsi que l'évolution saisonnière de ces anticorps.

5. 2. 2. 1. Evolution saisonnière de la séroprévalence

La séroprévalence et les titres moyens d'anticorps (moyenne géométrique) mensuels chez les bovins sont exposés dans la Fig. 12.

La répartition mensuelle des titres d'anticorps (de < 1:20 à 1:5120) est présentée sous forme de "plots box" dans la Fig. 13. Dans ce cas précis, le haut des rectangles, représentant le troisième quartile, indique le titre d'anticorps maximum fixant la limite des 75 % de l'ensemble des données, que nous considérerons comme la majorité des données. De plus leurs distributions sont précisées par la médiane.

Tous les sérums testés (Tabl. 8) proviennent d'animaux d'âges et de races différents, achetés ou nés dans les exploitations inspectées, mais qui ont la particularité d'avoir déjà fréquenté les pâturages de ces exploitations durant l'année 1988.

Lors de la prise de sang en octobre 1988, tous les animaux étaient déjà rentrés des pâturages et 48.6 % d'entre eux possédaient des anticorps. Pendant les mois d'hivernage, en l'absence de stimulation antigénique occasionnée par les tiques, les anticorps sont catabolisés (demi-vie des IgG bovines sériques: 17 à 22 jours, Tizard, 1987). On remarque que ce phénomène intervient assez rapidement et se reflète déjà sur les titres d'anticorps détectés en novembre (32.6 %, $p < 0.001$), un mois après le

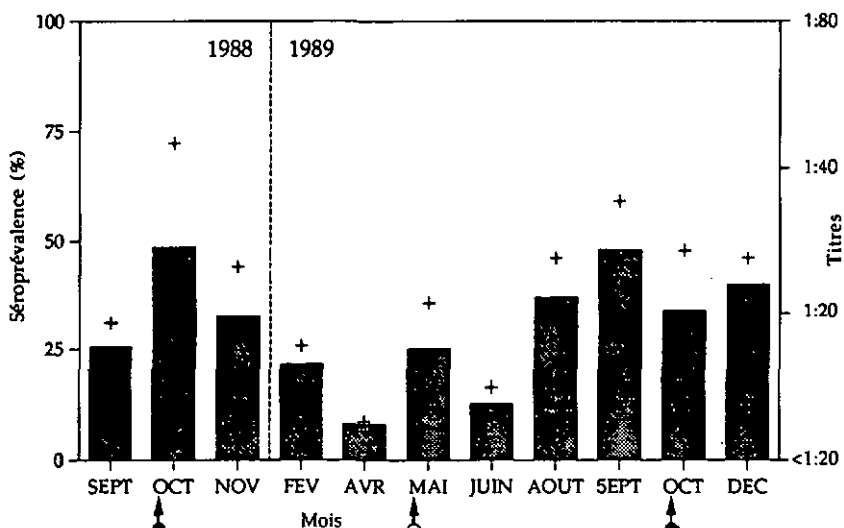


Fig. 12. Séroprévalences (■) et titres moyens d'anticorps (+) IgG mensuels anti-*E.phagocytophila* chez des bovins dans l'ouest de l'Oberland bernois (de septembre 1988 à décembre 1989)

○ sortie des animaux pour les pâturages ● rentrée des animaux dans les étables

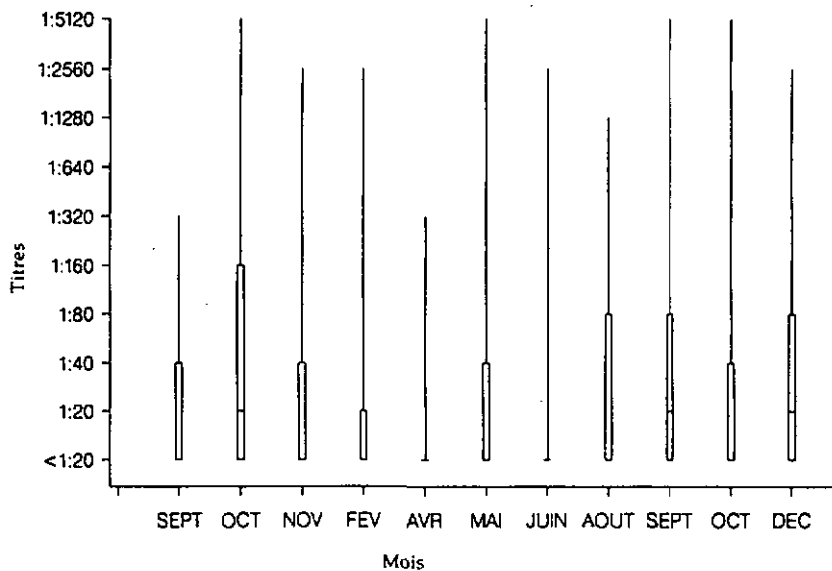


Fig. 13. Distribution mensuelle des titres d'anticorps IgG anti-*E.phagocytophila* (de septembre 1988 à décembre 1989)

retour des pâturages. Cette destruction naturelle des anticorps se manifeste à nouveau sur les titres de février 1989 (20.3 %, $p < 0.01$). En avril juste avant la sortie des animaux, seulement 8.1 % ($p < 0.001$) des animaux ont des d'anticorps IgG contre *E. phagocytophila*. Au mois de mai, au moment de la prise de sang, les bovins sont en contact depuis quelques semaines avec des tiques infectées. Cela se traduit par une augmentation de la présence des anticorps chez les animaux (25.1 %, $p < 0.001$). La séroprévalence chute en juin (12.7 %, $p < 0.01$). Cette baisse peut s'expliquer par le départ de génisses vers les alpages d'été. On remarque clairement, dans le Tabl. 9 (animaux de la classe G2 et certains de G3), que l'effectif des génisses en juin est inférieur à celui du mois précédent. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, un nombre important de ces génisses, qui ont déjà au moins une année de pâture, sont séropositives en mai. Ensuite la séroprévalence augmente en août (37 %, $p < 0.001$) et atteint son maximum annuel en septembre (47.9 %). Lorsque les animaux rentrent dans les étables pour passer l'hiver, 34 % des bovins sont séropositifs ($p < 0.05$). En décembre, pour des raisons inexplicées, on remarque que la séroprévalence ne diminue pas, mais augmente légèrement (40.0 %).

Les titres moyens (Fig. 12) et la distribution (Fig. 13) des anticorps mensuels accompagnent étroitement les variations de la séroprévalence.

Les titres moyens diminuent pendant l'hivernage et la majorité des données se concentrent significativement de plus en plus vers des titres d'anticorps faibles ($p < 0.001$). Les valeurs extrêmes passent de 1:5120 en octobre à 1:320 en avril. Les titres moyens atteignent leur minimum annuel en avril; 75 % au moins des animaux ont des titres inférieurs à 1:20. Dès la sortie des animaux au printemps 1989, les titres moyens et maximums augmentent ($p < 0.001$), le troisième quartile s'étend vers 1:40. En juin, comme pour la séroprévalence, on retrouve une baisse des titres moyens et, si certains animaux ont des titres élevés (1:2560), la majorité des données (≥ 75 %) est, comme en avril, en-dessous de 1:20. A partir de là, et jusqu'en septembre, on observe une élévation des titres moyens et la répartition des titres s'étire vers le haut ($p < 0.001$). Dès la rentrée des animaux, si les titres moyens d'anticorps et les troisièmes quartiles diminuent en octobre ($p < 0.01$), ils réaugmentent en décembre ($p < 0.001$).

5. 2. 2. Influence de l'âge sur l'évolution des titres d'anticorps

Pour étudier l'influence de l'âge sur l'évolution des anticorps, et donc du contact plus ou moins répété des animaux avec les vecteurs, nous avons réparti les bovins, tous nés dans les exploitations suivies, en trois classes d'âge appelées G1, G2 et G3 (Tabl. 9). Dans ces groupes, les animaux se différencient par le nombre d'années de fréquentation des pâturages endémiques:

- G 1 - bovins nés entre septembre 1988 et janvier 1989,
sortant pour la première fois sur les pâturages en mai 1989
- G 2 - bovins nés entre septembre 1987 et mai 1988,
sortant pour la deuxième fois sur les pâturages en mai 1989
- G 3 - bovins nés avant mai 1987 et sortant, au moins,
pour la troisième fois sur les pâturages en mai 1989.

		G 1		G 2		G 3	
1988	SEPT	0/1	0.0	5/14	35.7	3/27	11.1
	OCT	5/13	38.5	28/38	73.7	43/106	40.6
	NOV	9/48	18.8	35/76	46.1	41/140	29.3
1989	FEV	13/90	14.4	14/76	18.4	35/170	20.6
	AVR	4/132	3.0	8/90	8.9	19/187	10.2
	MAI	9/62	14.5	24/51	47.1	23/95	24.2
	JUIN	0/31	0.0	1/7	14.3	9/57	15.8
	AOUT	29/65	44.6	5/10	50.0	27/84	32.1
	SEPT	24/46	52.2	16/26	61.5	23/51	45.1
	OCT	18/37	48.6	21/40	52.5	22/81	27.2
	DEC	44/86	51.2	37/79	46.8	43/141	30.5

Tabl. 9. Séroprévalences mensuelles (%) par classes d'âge chez des bovins dans l'ouest de l'Oberland bernois

(sérums positifs/sérums testés séroprévalence)

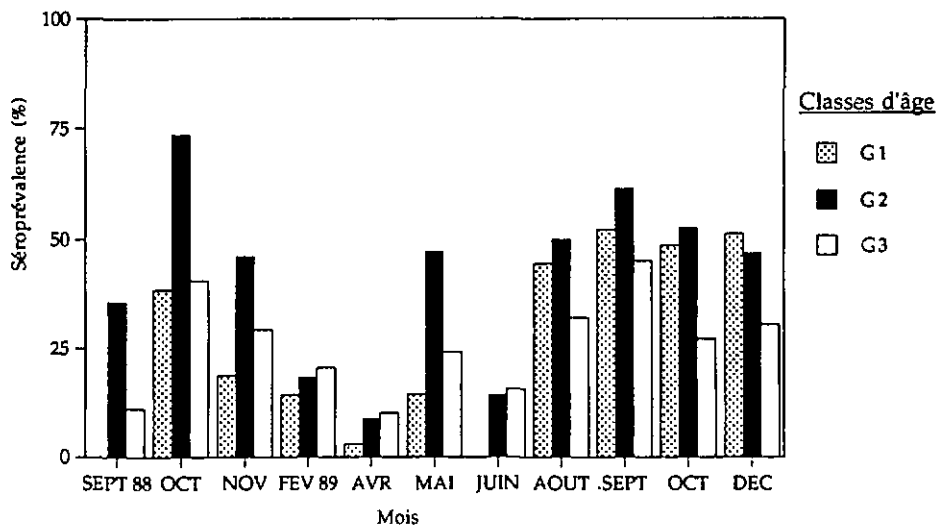


Fig. 14. Influence de l'âge des bovins sur la séroprévalence

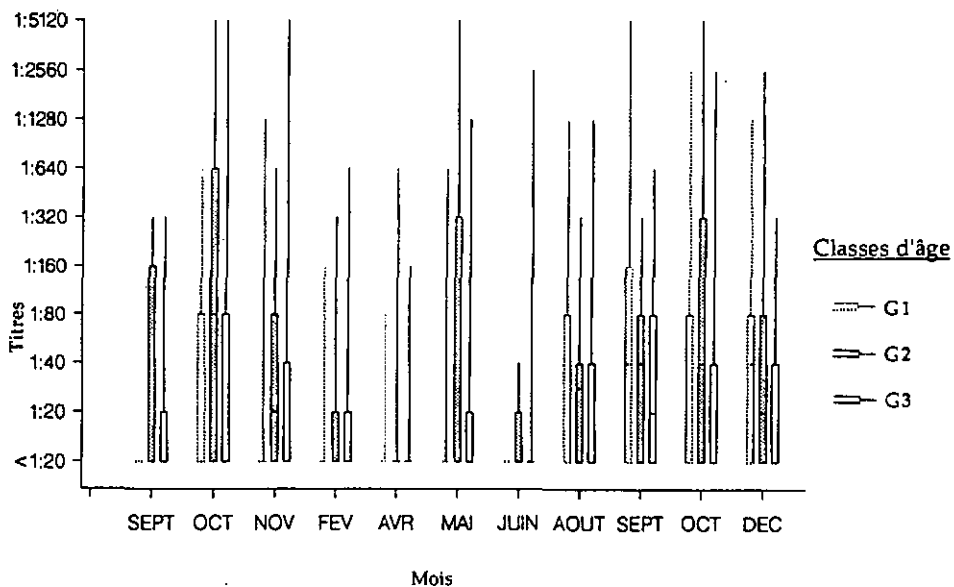


Fig. 15. Influence de l'âge des bovins sur la distribution des titres d'anticorps IgG anti-*E. phagocytophila*

L'évolution mensuelle de la séroprévalence, ainsi que la distribution des titres d'anticorps décrits dans le chapitre précédent, se retrouvent également, lorsqu'on considère les animaux par classes d'âge préalablement définies (Fig. 14 et 15).

Entre septembre 1988 et avril 1989, les veaux G1 n'ont jamais eu de contact avec l'extérieur. Malgré cela, des jeunes animaux séropositifs sont détectés. L'acquisition des anticorps est sans doute uniquement passive et due à l'ingestion du colostrum maternel. Chez les ruminants, le placenta, de type syndesmochorial, empêche le passage de toutes les immunoglobulines vers le fœtus. Le veau nouveau-né est donc entièrement dépendant des anticorps colostraux qu'il prend tout de suite après sa naissance en tétant (Tizard, 1987). Pour les autres groupes, lors de la rentrée en octobre 1988, les animaux ont déjà eu des contacts durant l'année avec des tiques infectées. La séroprévalence (73.7 %, $p < 0.001$) et les titres sont plus élevés chez les animaux G2 (3ème quartile à 1:640, $p < 0.05$), venant de passer leur première année de pâture, que dans le groupe G3.

Malgré ces différences, à la fin de l'hivernage, les trois classes d'âge, se retrouvent avec des séroprévalences ne se différenciant significativement pas les unes des autres (G1: 3.0 %, G2: 8.9 % et G3: 10.2 %). Bien que les titres d'anticorps soient plus élevés dans le groupe G2 ($p < 0.05$) (jusqu'à 1:640), quelle que soit la classe d'âge, 75 % au moins des animaux présentent des titres faibles, inférieurs à 1:20.

En mai, l'arrivée des animaux sur les pâturages endémiques se répercute sur les titres d'anticorps. Si dans les trois classes d'âge, on détecte une augmentation significative des titres par rapport au mois précédent (G1: $p < 0.01$, G2: $p < 0.001$, G3: $p < 0.01$), c'est parmi les animaux G2 que la stimulation antigénique provoque la plus forte réponse sérologique. Cette classe d'âge se différencie des autres par sa séroprévalence (47.1 %, $p < 0.001$) et ses titres d'anticorps plus élevés ($p < 0.001$). Dans le groupe G1, la majorité des titres reste en-dessous de 1:20.

En juin, chez tous les groupes, la séroprévalence et les titres d'anticorps chutent (G1: $p < 0.05$, non significatif pour G2 et G3). Au mois d'août, les séroprévalences augmentent et les titres s'élèvent, mais aucune différence significative entre les trois groupes n'est observée. Pour les classes G2 et G3, les valeurs du mois d'août ne se différencient non plus pas de celles relevées lors de la sortie des animaux en mai. Par contre, l'augmentation la plus forte est observée dans le groupe G1, la séroprévalence et les titres d'anticorps sont plus élevés qu'en juin et même qu'en mai ($p < 0.001$). En

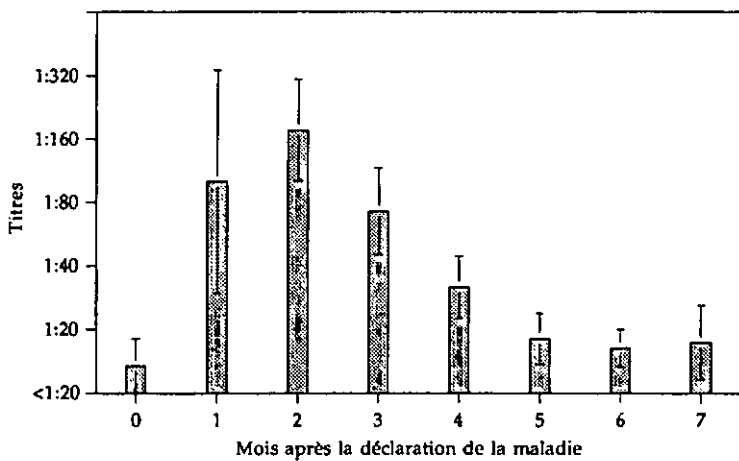


Fig. 16. Evolution des titres moyens d'anticorps IgG anti- *E. phagocytophila* chez des bovins malades (n=7) de septembre (0) 1988 à avril (7) 1989

(moyenne géométrique ± erreur standard)

septembre, il n'existe toujours pas de différence significative entre les trois groupes. Par contre, en octobre et en décembre, la séroprévalence ($p < 0.01$), ainsi que les titres d'anticorps (oct. : $p < 0.01$; déc. : $p < 0.001$) sont inférieurs chez les animaux G3.

Pour les trois classes d'âges, les séroprévalences maximales sont détectées au mois de septembre. Ceci est également valable pour les titres d'anticorps des groupes G1 et G3; octobre pour G2. Néanmoins, à partir du mois d'août et pour chaque classe, aucune différence significative n'est observée d'un mois à l'autre.

5. 2. 2. 3. Evolution des titre d'anticorps chez les bovins malades

Nous avons suivi l'évolution des titres d'anticorps chez sept animaux atteints de fièvre de pâture. La première prise de sang a été effectuée le jour même du diagnostic, puis tous les mois, durant sept mois, de septembre 1988 à avril 1989. Durant cette période, les bovins sont restés à l'intérieur des étables et n'ont subi aucun traitement thérapeutique contre l'infection.

L'origine, ainsi que l'âge des animaux, sont divers (Annexe VI).

En septembre, lors de la première prise de sang, tous les bovins présentaient des signes cliniques d'ehrlichiose et *E. phagocytophila* était présent dans leur sang. Un mois plus tard, l'agent pathogène n'était plus détectable.

Les titres d'anticorps sont variables d'un animal à l'autre (Annexe VI).

La Fig. 16 montre l'évolution mensuelle des titres moyens d'anticorps IgG contre *E. phagocytophila*. A la première analyse, tous les animaux présentaient des titres d'anticorps inférieurs à 1:20, sauf pour une génisse (1:80) provenant du canton de Neuchâtel. Les titres moyens maximums sont atteints le 2ème mois (1:176). Les titres maximums individuels sont détectés, un à trois mois après la déclaration de la maladie (de 1:40 à 1:1280). Quatre animaux possèdent des titres positifs entre le 4ème et 7ème mois (n° 1, 2, 3 et 4), mais l'ensemble des bovins deviennent séronégatifs dès le 4ème mois.

	n° de l'animal	Nom	Date de naissance	1989				1989										
				Titres réciproques mensuels														
				S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N
1	5232	Pfau	nov. 79			40			80	-								
	9586	V	nov. 88			160			-	-								
2	7825	Kander	nov. 81			320			-	80						2560		
	9587	V	nov. 88			320			80	-								
	9588	V	nov. 88			320			80	-								
3	8835	Otma	déc. 85			160			-	-						640	-	
	9644	V	jan. 89						40	40						40		40
4	3697	Sandra	avr. 86		640				160	-	-			40		320		-
	4070	V	oct. 88						160	-	-			1280		2560		1280
5	3698	Freude	avr. 86		80						40	-		80		40		-
	4239	V	oct. 89															40
6	4806	Adriana	oct. 87	160														
	6145	V	déc. 88						80	-	-			80				
7	8533	Sonia	nov. 84			40					40					40		-
	?	V	oct. 88			40					-							
8	6351	Chantal	jan. 86		40				-	-	-			-	-			-
	6724	V	sep. 88		160				-	-	-			80	320			-
9	7544	Vera	fév. 80		320				40	-	-			80	40			160
	?	V	oct. 88		640													
	?	V	oct. 88		320													
10	4164	Ulme	nov. 84		80						-							
	?	V	sep. 88		80													
11	1312	Tagora	mai. 83			-					-	-			80			80
	?	V	oct. 89															40
12	4350	Petra	déc. 77			40			320		160	320			80			320
	5363	V	juil. 89											40	-			
13	4696	Lupine	jan. 82			640			80		40	-			160			320
	5339	V	jan. 89						80		-	-			-			320
14	5066	Kreta	jan. 86			-			-		-				80			
	5379	V	oct. 89															40
15	4253	Bellina	nov. 82			320			-									
	405	V	jan. 89						40		-	-			80	40		-
16	9725	Regina	déc. 86			1280			-		-	-			-	40		-
	?	V	jan. 89						80									



sortie des animaux pour les pâturages

Tabl. 10. Transmission colostrale des anticorps IgG anti-*E. phagocytophila*

Chaque couple de bovins est représenté par la mère et son/ses veau(x), la mère est indiquée par son prénom et les veaux par la lettre V

- = mois de naissance du veau
 - = titre < 1:40

5. 2. 2. 4. Les anticorps colostraux

Nous avons vu précédemment que, pendant les mois d'hivernage, plusieurs veaux n'ayant jamais eu de contact avec l'extérieur, montraient des anticorps IgG contre *E. phagocytophila* (Tabl. 9: G1). Entre septembre 1988 et avril 1989, 14.2 % de ces jeunes animaux (24/169) ont, été au moins une fois, séropositifs. On retrouve un pourcentage similaire (14.3 %, 10/70), entre septembre et décembre 1989, pour des veaux nés à cette période. Les titres des anticorps colostraux, prélevés le mois de la naissance, varient de 1:160 à 1:320.

Dans le Tabl. 10, nous avons pu montrer un transfert d'immunoglobulines maternelles aux veaux par le colostrum.

Pour les exemples 1, 2 et 9, le sang de la mère et du veau ont été prélevés le même jour. Si dans l'exemple 1, le titre d'anticorps chez le veau est supérieur à celui de sa mère (1:160 et 1:40), dans l'exemple 2, les titres mesurés chez la mère et ses jumeaux sont identiques (1:320). Dans certains cas, il nous a été impossible de prélever du sang le mois de la naissance du veau. Malgré cela, et même à quelques mois d'intervalle, en comparant les titres de la mère, du veau et son mois de naissance, l'origine des anticorps du jeune animal ne fait aucun doute.

En avril, avant leur sortie, la presque totalité des veaux ne présente plus d'anticorps IgG contre *E. phagocytophila*. Sur 132 jeunes bovins contrôlés, quatre seulement étaient séropositifs et montraient des titres faibles (1:40) (Tabl. 9). Dans le Tabl. 10, on remarque que tous les veaux examinés en avril sont déjà séronégatifs. Dès le mois d'août, on détecte des séroconversions dues, cette fois-ci, au contact des animaux avec des tiques infectées.

5. 2. 3. Discussion

En Suisse, la plus grande abondance de tiques, *I. ricinus*, se rencontre au printemps (avril et mai). En été, les tiques disparaissent des strates aériennes de la végétation et s'enfouissent dans des microbiotopes nécessaires à leur survie. C'est la première phase endophile de l'espèce au cours de l'année. Avec l'automne, les conditions de

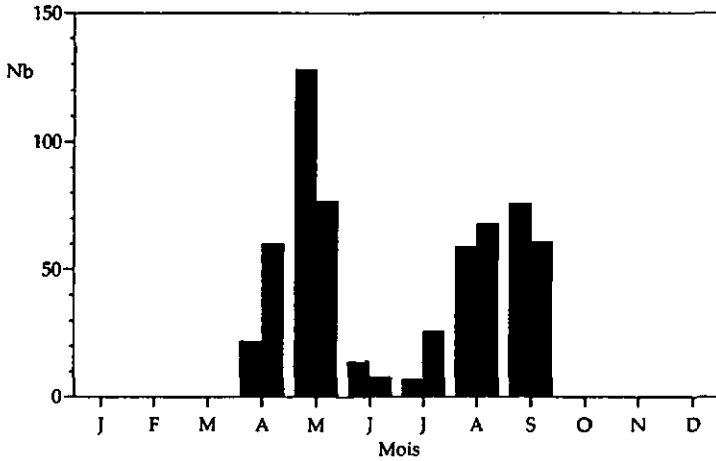


Fig. 17. Nombre de tiques *I. ricinus* récoltées sur 28 bovins dans la région de Emdtal (Oberland bernois) en 1989
 (Les stades n'ont pas été indiqués par l'auteur; d'après Streit, 1993)

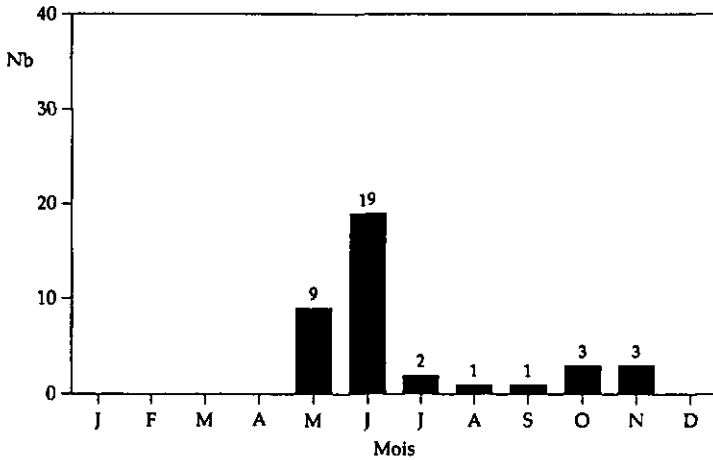


Fig. 18. Distribution cumulée des cas diagnostiqués de fièvre de pâture dans les autres régions de Suisse (B, C, D et E*) (de 1988 à 1990)

(* cf. Fig. 6)

température et d'humidité favorables réapparaissent et permettent à nouveau la sortie des tiques. Mais l'activité des tiques en automne est généralement moins importante qu'au printemps. L'activité extérieure durant l'hiver est nulle (seconde phase endophile de l'année) (Aeschlimann, 1972).

Dans l'Oberland bernois, l'ehrlichiose bovine est toujours intimement liée à l'apparition saisonnière des tiques. En 1988, 1989, ainsi qu'en 1990, malgré le nombre restreint d'échantillons analysés, les cas apparaissent durant l'année en deux vagues successives, l'une au printemps et l'autre, de moindre importance, en automne. Cette répartition particulière de la maladie correspond bien aux deux pics classiques d'activité du vecteur (Aeschlimann, 1972; Mermod *et al.*, 1973).

Des récoltes bimensuelles de tiques, *I. ricinus*, sur 28 bovins de Emdtal (Kandertal, Oberland bernois, 1989) confirment la forte activité du vecteur dans la région en mai et en août-septembre (Fig. 17, d'après Streit, 1993). Ces mois précèdent les périodes de forte fréquence de cas d'ehrlichiose bovine dans cette région, exposées dans la Fig. 11. Le mois de juin, avec 40 % (26/65), 48 % (15/31) et 78 % (7/9) des infections totales diagnostiquées respectivement en 1988, 1989 et 1990, est le moment de l'année où l'on rencontre le plus fréquemment des infections à *E. phagocytophila* parmi les troupeaux bovins. Des constatations similaires sont faites dans les autres régions de Suisse où la maladie sévit (50 %, 19/38, Fig. 18, d'après la Fig. 6).

Entre 1988 et 1989, le nombre de cas déclarés de fièvre de pâture dans l'Oberland bernois a, pour des raisons étrangères à l'épidémiologie de l'infection, diminué. Au cours de la première année, l'agent responsable étant nouveau pour la région, l'intérêt porté par les vétérinaires était considérable et les demandes de diagnostic affluaient.

La résurgence de cas cliniques de fièvre de pâture signalés pendant les mois d'hiver, malgré des diagnostics négatifs sur frottis, s'expliquent éventuellement de deux manières. D'une part, les animaux rentrant à l'étable au mois d'octobre peuvent transporter des tiques infectées, plus précisément des nymphes. Celles-ci retrouveraient dans l'étable une température et une humidité adéquate et, après leurs mues, seraient en mesure de transmettre de nouveau *E. phagocytophila* à un autre animal. D'autre part, des rechutes spontanées, après une primo-infection, ont été

signalées chez des moutons (Foggie, 1951) et des bovins (Tuomi, 1966). Sans la confirmation de la présence de l'organisme pathogène dans le sang des animaux, le diagnostic d'une fièvre de pâture est toujours contestable. Mais trois cas d'infection à *E. phagocytophila* indiscutables ont eu lieu en novembre, trois semaines au moins après le retour des bovins dans les étables.

Le sang d'animaux ne présentant plus de signes cliniques, infectés expérimentalement ou naturellement, reste infectieux pendant une période de durée variable. Chez les moutons, *E. phagocytophila* peut persister jusqu'à 25 mois dans le sang périphérique (Foggie, 1951). Ce dernier précise qu'un échantillon sanguin pris au hasard, à n'importe quel moment de l'année chez des ovins écossais vivant dans des régions à tiques, est toujours infectieux. Hudson (1950) et Tuomi (1967a) décrivent des durées plus courtes chez les bovins (9 à 14 jours). Nous avons pu isoler *E. phagocytophila* dans les neutrophiles et provoquer un accès fébrile chez un veau de quatre mois (Infex 10), infecté par 100 ml de sang provenant d'un autre veau inoculé 101 jours auparavant (Infex 9) (Tabl. 5).

Des constatations similaires sont également décrites chez des animaux infectés avec d'autres espèces d' *Ehrlichiae*. Des chiens inoculés, avec du sang prélevé chez des chiens infectés cinq ans plus tôt avec *E. canis*, ont développé très rapidement une ehrlichiose canine (Lewis, 1976). *E. risticii* a été isolé chez des chevaux plus de deux ans après une première infection (Gordon *et al.*, 1988).

Des recherches en médecine vétérinaire menés par Streit (1993) apportent des informations complémentaires sur la fièvre de pâture dans la région.

Les premiers cas annuels de l'infection se déclarent 11 à 15 jours après l'arrivée des animaux sur les pâturages; d'après Streit (1993), cette durée est inversement proportionnelle à l'âge. Si on considère les animaux par classe d'âge (< 1, 1 à 2, 2 à 3 et ≥ 3 ans), les animaux de trois ans ou plus sont significativement les premiers à tomber malades (32/51). C'est également dans cette même classe que l'on rencontre les cas les plus nombreux de fièvre de pâture (42/72); les moins fréquents se situant chez les plus jeunes (5/72). Expérimentalement, il semblerait que les veaux, âgés de moins de six mois, soient plus résistants à l'ehrlichiose bovine que les adultes (Hudson, 1950; Tuomi, 1966). Nos infections expérimentales, toutes réussies sur des

veaux âgés de trois à cinq mois, ne concordent pas avec les résultats obtenus par ces deux auteurs.

Les résultats de Streit (1993) dans des conditions naturelles vont à l'encontre de la notion généralement admise que la résistance aux infections chez le bétail augmente avec l'âge. Dans le Jura, Gern *et al.* (1982) et Gern (1984) constatent une plus grande résistance à la babésiose chez les bovins les plus jeunes. Les animaux âgés de moins de un an tombent très rarement malades. Ce point de vue est également adopté par d'autres auteurs cités par Gern (1984). Il faut attirer l'attention sur le fait que les infections naturelles à *E. phagocytophila* passent souvent inaperçues chez les animaux non lactants et que les propriétaires ne portent pas la même attention aux jeunes bovins qu'aux vaches laitières.

Streit (1993) signale que le risque de tomber malade est plus élevé pour les bovins arrivant pour la première fois sur les pâturages endémiques (50/71). Mais certains animaux, ayant déjà fréquenté six fois ces lieux, peuvent également faire une fièvre de pâture (4/71). Des récidives, d'une année à l'autre, sont également observées.

Il est un fait bien établi, aussi bien chez les bovins que chez les ovins, que la fièvre de pâture est répandue chez les animaux nouvellement arrivés dans une exploitation ou lors de déplacement des troupeaux vers d'autres pâturages (Hudson, 1950; Jamieson, 1950; Littlejohn, 1950; Tutt et Loving, 1955; Venn et Woodford, 1956; Foggie et Allison, 1960; Watson, 1964; Wilson *et al.*, 1964; Tuomi, 1966; Kuil *et al.*, 1972; Cranwell et Gibbons, 1986; Juste *et al.*, 1989).

Lorsqu'on fait un parallèle entre les résultats de Streit (1993) et les titres d'anticorps que nous avons détectés parmi le cheptel bovin étudié, certains faits marquants peuvent être soulignés. Chez les bovins les plus âgés, ceux de la classe G3, une plus grande fréquentation des pâturages endémiques, et donc des contacts répétés avec les vecteurs, ne se traduisent pas directement par une augmentation des anticorps IgG contre *E. phagocytophila*. Au moment où les animaux sortent au printemps, les séroprévalences des trois classes d'âges définies ne se différencient pas significativement. Mis à part les mois de mai et de juin, où les animaux de la classe G1 qui sortent pour la première fois ont les titres d'anticorps les plus bas, le reste de l'année, la séroprévalence et les titres d'anticorps des animaux les plus âgés restent toujours inférieurs aux deux autres classes, G1 et G2. C'est parmi les animaux de la

classe G3, bovins exposés aux vecteurs depuis au minimum deux saisons de pâture, que Streit (1993) a rencontré le plus grand nombre de cas de fièvre de pâture dans l'Oberland bernois.

Notre enquête sérologique a montré qu'il existe durant l'année, au sein du cheptel bovin, une variation de la séroprévalence et des titres d'anticorps IgG contre *E. phagocytophila*. Malheureusement, les résultats obtenus sont difficilement comparables avec d'autres déjà publiés. A notre connaissance, la seule étude séroépidémiologique a été entreprise chez des troupeaux ovins provenant de foyers à *I. ricinus* dans le nord du Royaume-Uni (Webster et Mitchell, 1988). Les auteurs ont testé 440 sérums ovins par immunoprécipitation. Ils ont également remarqué une variation saisonnière du taux des anticorps totaux avec des séroprévalences maximales en juin (29.3 %, n= 92) et juillet (31.4 %, n=51). Aucun détail n'est donné sur l'âge des moutons.

Certaines études ont montré qu'il existe une bonne corrélation entre les titres d'anticorps, détectés par des tests de fixation du complément ou par immunodiffusion, et la résistance aux infections à *E. phagocytophila* (Woldehiwet et Scott, 1982d; Webster et Mitchell, 1988). En général, les animaux sont plus résistants à des réinfections avec des souches homologues qu'avec des souches hétérologues.

Chez d'autres espèce d' *Ehrlichiae*, des expériences sur des chiens infectés par *E. canis*, ont révélé que des anticorps détectés en IFI sont simplement témoins de l'infection et n'assurent pas de protection lorsque les animaux sont réinoculés avec la souche homologue (Buhles *et al.*, 1974; Davoust, 1991). Par contre, Lewis *et al.* (1978) ont démontré *in vitro* que des immun-sérums canins inhibent légèrement la multiplication d' *E. canis* dans les monocytes.

Dans l'ouest de l'Oberland bernois, la grande majorité des mises bas a lieu dès l'automne et durant la première partie de l'hivernage. Suivant l'état immunitaire des vaches venant de vêler, leurs veaux peuvent bénéficier d'un apport passif d'anticorps contre *E. phagocytophila*. Ces anticorps colostraux ont une durée de vie courte. Lorsque les jeunes animaux sortent et sont en contact avec des tiques infectées, ils n'ont plus d'anticorps. Si les anticorps colostraux ont un rôle protecteur contre la

fièvre de pâture, cette protection est inexistante dans les conditions épidémiologiques de l'Oberland bernois.

Même si des réponses, aussi bien à médiation cellulaire qu'à médiation humorale, ont été observées chez des chiens infectés par *E. canis* (Nyindo *et al.*, 1980), il est très incertain que l'immunité humorale joue un rôle prédominant dans les mécanismes de défense contre des réinfections.

Le pouvoir des anticorps contre un organisme intracellulaire strict est limité. On sait que les *Ehrlichiae* se multiplient à l'intérieur de vacuoles phagocytaires (phagosomes) de la cellule-hôte. Leur survie est possible en inhibant, par des mécanismes encore inconnus, la fusion lysosomiale avec le phagosome (Williams et Vodkin, 1987). Si les anticorps peuvent éliminer les micro-organismes pendant leur phase libre d'invasion des cellules et ainsi réduire la propagation de l'agent pathogène, ils ont peu ou pas d'influence sur les formes intracellulaires.

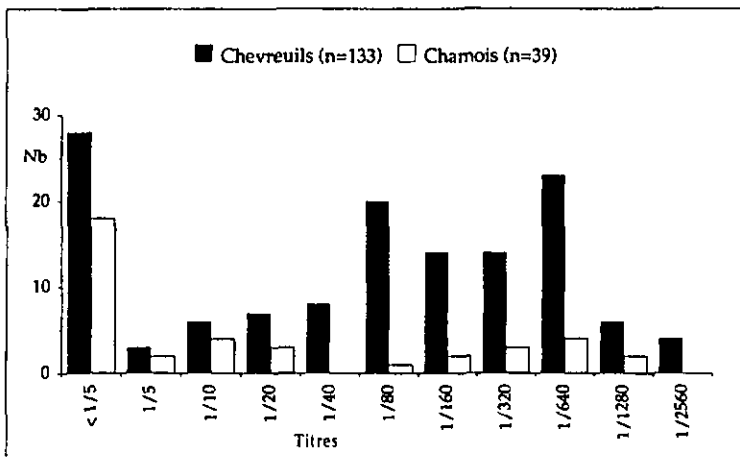


Fig. 19. Répartition des titres d'anticorps IgG anti- *E. phagocytophila* chez le chevreuil et le chamois

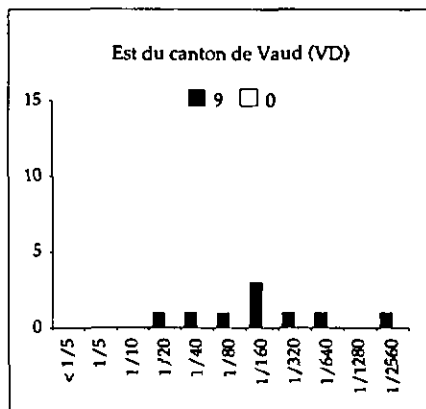
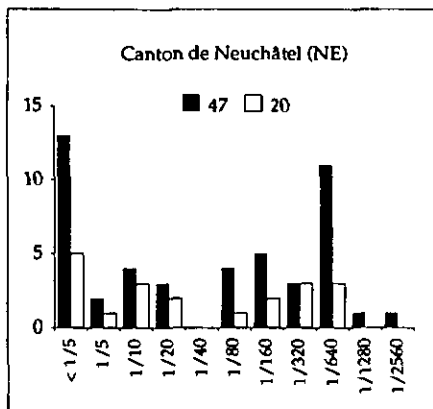
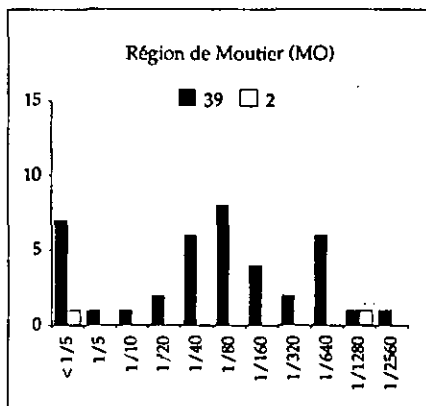
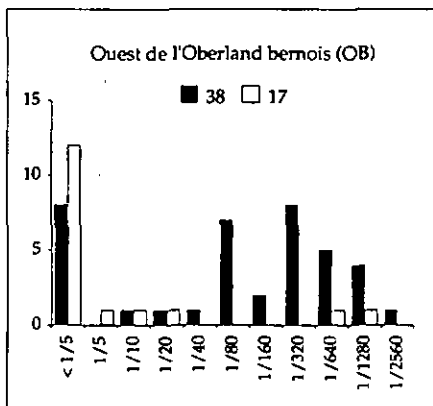


Fig. 20. Répartition des titres d'anticorps IgG anti- *E. phagocytophila* chez le chevreuil et le chamois dans quatre régions de Suisse

5. 3. Les réservoirs sauvages potentiels d' *E. phagocytophila*

Nous avons entrepris ces enquêtes sérologiques dans des régions où la maladie est présente chez les bovins, afin de mieux connaître le rôle des mammifères sauvages dans le cycle de l'infection à *E. phagocytophila*.

Pour les chevreuils (*Capreolus capreolus*) et les chamois (*Rupicapra rupicapra*), nous avons également tenté de détecter directement l'agent pathogène dans le sang, ainsi que de mettre en relation les animaux possédant des anticorps avec la distribution présumée d' *I. ricinus*.

5. 3. 1. Chamois et chevreuils

Sur les 912 sets distribués pour les prises de sang durant les réunions des sociétés de chasse, 180 échantillons nous ont été renvoyés. Les examens hématologiques et sérologiques n' ont pas pu être effectués, vu l'état de décomposition, sur 8 d'entre eux.

Au total, 172 échantillons provenant de 39 chamois et de 133 chevreuils ont été analysés afin de mettre en évidence des contacts entre les animaux et *E. phagocytophila*.

5. 3. 1. 1. Détection directe de l'agent infectieux

Les examens en microscopie optique des 172 frottis sanguins provenant des animaux abattus ne nous ont pas permis d'observer directement *E. phagocytophila*.

5. 3. 1. 2. Tests sérologiques

Nous avons établi par des tests IFI la distribution des titres d'anticorps IgG anti-*E. phagocytophila* chez les chamois et les chevreuils (Fig. 19).

	alt. ≤ 1000 m	alt. > 1000 m	total (%)
OB	-	5/17	5/17 (29.4)
MO	1/1	1/1	2/2 (100.0)
NE	4/4	12/16	16/20 (80.0)
VD	-	-	-
total	5/5	18/34	23/39 (59.0)

Tabl. 11. Séroprévalences chez des chamois dans quatre régions de Suisse

(sérum avec des titres ≥ 1:5/sérum testés)

	alt. ≤ 1000 m	alt. > 1000 m	total (%)
OB	20/21	10/17	30/38 (78.9)
MO	31/37	1/2	32/39 (81.1)
NE	25/29	9/18	34/47 (72.3)
VD	5/5	4/4	9/9 (100.0)
total	81/92	23/41	104/133 (78.2)

Tabl. 12. Séroprévalences chez des chevreuils dans quatre régions de Suisse

(sérum avec des titres ≥ 1:5/sérum testés)

La distribution détaillée de ces titres dans chaque région est exposée dans la Fig. 20.

Dans l'impossibilité de détecter la présence d' *E. phagocytophila* dans le sang de ces ruminants sauvages et d'entreprendre des infections expérimentales sur ces animaux, un seuil de séroconversion a été placé arbitrairement à un titre de 1:5.

Sur le total des résultats, 59 % des chamois (23/39) et 78.2 % des chevreuils (104/133) possèdent des anticorps IgG dirigés contre *E. phagocytophila* (Tabl. 11 et 12). Les séroprévalences sont significativement plus élevées chez les chevreuils ($p < 0.05$).

Chez le chamois, les séroprévalences dans le canton de Neuchâtel (80 %, 16/20) sont supérieures à celles rencontrées dans l'Oberland bernois (29.4 %, 5/17) ($p < 0.01$) (Tabl. 11). On ne tient pas compte des valeurs provenant de la région de Moutier, les échantillons analysés étant trop faibles ($n=2$).

Si on excepte les 100 % obtenus chez un nombre restreint de chevreuils ($n=9$) dans le canton de Vaud, les séroprévalences des chevreuils dans les autres régions varient de 72.3 à 81.1 % et ne se différencient significativement pas entre elles (Tabl. 12).

Les anticorps décelés chez les animaux se répartissent entre des titres inférieurs à 1:5 et 1:2560 pour les chevreuils, 1:1280 pour les chamois (Fig. 19). Pour les chevreuils, un nombre important d'animaux ont des titres $\geq 1:80$ (60.9 %, 81/133). Pour les chamois, le nombre réduit d'échantillons recueillis ne privilégie pas certains titres en particulier, néanmoins, 36.7 % (12/39) des chamois possèdent des titres $\geq 1:80$. La présence de ces titres plus élevés est significativement supérieure chez les chevreuils ($p < 0.01$).

5. 3. 2. Rongeurs

Pendant les mois de mai, juillet et septembre 1990, dans cinq lieux de l'ouest de l'Oberland bernois, nous avons capturé 279 micromammifères, appartenant à trois espèces de rongeurs muridés: 125 mulots ordinaires (*Apodemus sylvaticus*), 66 mulots

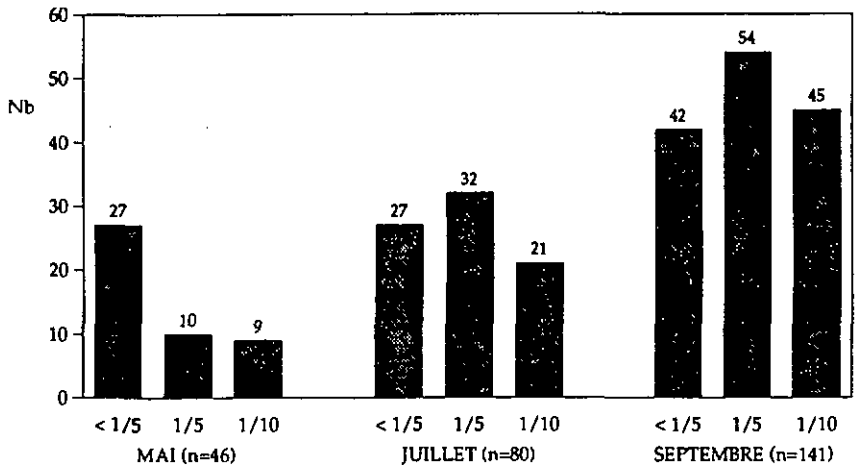


Fig. 21. Distribution des titres d'anticorps IgG anti-*E. phagocytophila* chez des micromammifères en mai, juillet et septembre 1990

à collier roux (*A. flavicollis*), 15 mulots dont ont pas pu déterminer l'espèce (*Apodemus spp*) et 73 campagnols roussâtres (*Clethrionomys glareolus*).

Le bilan des captures est détaillé dans l' Annexe VII. Le nombre des rongeurs piégés augmente du mois de mai au mois de septembre (respectivement 16.5, 31.2 et 53.3 %) ($p < 0.001$).

La Fig. 21 montre la distribution des titres d'anticorps IgG anti-*E. phagocytophila* détectés dans 267 sérums analysés.

Quelques soit l'époque des piégeages, les titres d'anticorps sont faibles et varient de $< 1:5$ à $1:10$.

5. 3. 3. Discussion

Le chamois et le chevreuil sont des hôtes naturels d' *I. ricinus*. Le chevreuil, malgré son caractère éminemment opportuniste, a un territoire vital optimum (forêts pas trop denses à sol riche, dominées par des feuillus) coïncidant avec le biotope du vecteur. Dans beaucoup de régions d'Europe, cet ongulé est considéré comme l'hôte naturel sauvage principal d' *I. ricinus* (Aeschlimann, 1972; Jaenson et Tälleklint, 1992; Gilot *et al.*, 1994).

Certains chasseurs nous ont spontanément envoyé des tiques récoltées sur les animaux abattus; toutes étaient des femelles d' *I. ricinus* plus ou moins gorgées.

Chez les chamois et les chevreuils, nous avons remarqué une baisse des titres d'anticorps avec l'altitude. Cette diminution pourrait être en relation avec la fréquence et la densité du vecteur dans la nature.

L'altitude est un facteur limitant d'une extrême importance pour la distribution géographique d' *I. ricinus* en Suisse (Aeschlimann, 1972). En effet, au-dessus de 900 - 1000 m, la densité des populations de tiques diminue rapidement; le vecteur devient rare au-dessus de 1200 m et est absent dès 1500 m.

	Chamois (4.8 %)		Chevreuils (45.6 %)	
	alt. ≤ 1000 m	alt. > 1000 m	alt. ≤ 1000 m	alt. > 1000 m
OB	-	1/17	15/21	5/17
MO	0/1	0/1	23/39	1/2
NE	1/5	0/18	10/30	7/18
VD	-	-	0/5	1/4
total	1/6	1/36	48/95	14/41

Tabl. 13. Présence de tiques chez les chamois et les chevreuils
(animaux avec tiques/animaux examinés)

Rem.: le nombre d'animaux examinés dans ce tableau diffère parfois de celui des Tabl. 11 et 12, car les sérums de certains animaux n'ont pu être testés.

a.	Tiques +	Tiques -
OB	18/21	17/34
MO	18/32	16/18
NE	15/18	34/49
VD	1/1	8/8
total (%)	52/63 (82.5 %)	75/109 (68.8%)

(sérums avec des titres ≥ 1:5 / sérums testés)

b.	Tiques +	Tiques -
OB	16/21	13/34
MO	12/23	11/18
NE	12/18	21/49
VD	1/1	6/8
total (%)	41/63 (65.1 %)	51/109 (46.8 %)

(sérums avec des titres ≥ 1:80 / sérums testés)

Tabl. 14. Relation entre les titres d'anticorps IgG anti-E. phagocytophila
(a. ≥ 1:5 et b. ≥ 1:80) et la présence de tiques sur les animaux
(chamois et chevreuils)

En fixant une limite arbitraire à 1000 m, on remarque que 88.7 % des animaux (86/97: 5 chamois et 81 chevreuils sur 5 chamois et 92 chevreuils) abattus au-dessous de cette limite possèdent des anticorps, contre 54.7 % (41/75: 18 chamois et 23 chevreuils sur 34 chamois et 41 chevreuils) abattus au-dessus de 1000 m ($p < 0.001$) (Tabl. 11 et 12). On a également constaté des titres $\geq 1:5$ plus nombreux chez les chevreuils que chez les chamois, mammifères que l'on rencontre de préférence à des altitudes supérieures, où la densité des chevreuils est nulle ou plus faible.

Si les séroprévalences chez les chevreuils sont comparables d'une région à une autre, il n'en va pas de même pour les chamois. Les séroprévalences plus élevées rencontrées dans le canton de Neuchâtel par rapport à l'Oberland bernois s'expliquent peut-être par les différences d'altitude rencontrées dans ces deux régions et influençant les habitats des deux espèces. Dans l'Oberland bernois, les chamois peuvent vivre à des altitudes supérieures à 2000 m; tous les animaux ont été tirés au-dessus de 1000 m et certains au-dessus de 2200 m. Dans le canton de Neuchâtel, les altitudes maximales sont bien inférieures et par conséquent le contact des chamois avec les tiques est forcément plus fréquent.

Cette diminution des tiques avec l'altitude est confirmée par la présence des vecteurs sur les animaux: 48.5 % des animaux abattus en-dessous de 1000 m (49/101: 1 chamois et 48 chevreuils sur 6 chamois et 95 chevreuils) étaient porteurs de tiques, contre 19.5 % (15/77: 1 chamois et 14 chevreuils sur 36 chamois et 41 chevreuils) abattus au-dessus de 1000 m ($p < 0.001$) (Tabl. 13).

On retrouve également plus souvent des tiques sur les chevreuils (45.6 %, 62/136), que sur les chamois (4.8 %, 2/42) ($p < 0.001$) (Tabl. 13).

Si des titres d'anticorps $\geq 1:5$ ne sont pas significativement plus nombreux chez les animaux porteurs de tiques (Tabl. 14a), les chevreuils et les chamois possédant des titres supérieurs ($\geq 1:80$) sont plus abondants chez les animaux infestés de tiques ($p < 0.05$) (Tabl. 14b).

Les recherches concernant l'existence d'hôtes réservoirs sauvages d'*E. phagocytophila* sont rares.

Sérums de chevreuils (Neuchâtel)		Présence de tiques* sur les animaux	Titres	
n°	Lieux des tirs (< 1000 m)		<i>E.phagocytophila</i>	<i>R.helvetica</i>
44	Bellevue sur Bevais	+++	1: 320	< 1: 25
51	Savagnier, Val de Ruz	+	1: 160	< 1: 25
55	La Rouvraie, Boudry	+	1: 640	< 1: 25
67	Gorgier	++	1: 640	< 1: 25
91	Le Landeron	+	1: 20	< 1: 25
122	Le Louverain, Val de Ruz	+++	1: 640	< 1: 25
125	Combes, Le Landeron	++	1: 160	< 1: 25
144	Bellevue, Le Landeron	+	1: 10	< 1: 25
147	Bevais	++	1: 160	< 1: 25
158	Au-dessus de Perreux, Boudry	+	1: 10	< 1: 25

Tabl. 15. Analyses sérologiques (IFI) de sérums de chevreuils provenant du canton de Neuchâtel sur des antigènes de *R. helvetica*

* + = < 10 ++ = 10 à 20 +++ = > 20 tiques sur l'animal

E. phagocytophila a été isolé dans les granulocytes d'un cerf élaphe (*Cervus elaphus*) tiré dans l'île de Rhum (Ecosse). L'inoculation du sang de l'animal provoqua une fièvre de pâture chez des moutons (Foggie, 1962).

Des études chez le daim (*Dama dama*) et le chevreuil entreprises dans le sud de l'Angleterre par McDiarmid (1965) n'ont pas permis d'isoler *E. phagocytophila* dans le sang de ces animaux. Par contre, l'inoculation chez des bovins et des moutons, de sang provenant de ces ruminants sauvages, produisent des réactions fébriles avec la présence d'inclusions typiques du micro-organisme dans les granulocytes.

Foster et Greig (1969) ont démontré que des chèvres devenues sauvages en Ecosse peuvent naturellement s'infecter si on les déplace dans des régions où sévit l'ehrlichiose chez les moutons. Le sang de ces chèvres, injecté chez un mouton, provoque chez l'animal des signes cliniques caractéristiques de la maladie et les agents responsables sont alors observables dans le sang. Les auteurs concluent que les chèvres sauvages sont susceptibles d'être infectées naturellement par des souches ovines d' *E. phagocytophila*.

E. phagocytophila n'a pu être détecté dans le sang des chevreuils et des chamois abattus. Malgré cela, différents arguments suggéreraient que les ruminants sauvages, en particulier les chevreuils, peuvent être des hôtes réservoirs potentiels de cet agent pathogène:

- hôtes naturels du vecteur, *I. ricinus*,
- titre élevés d'anticorps, atteignant 1: 2560,
- sang infectieux pouvant provoquer une fièvre de pâture chez un hôte naturel et isolation de l'agent responsable chez un cerf élaphe (Foggie, 1962; McDiarmid, 1965; Foster et Greig, 1969).

En Suisse, des recherches ont démontré que le chevreuil possède des anticorps contre une autre rickettsie, *Rickettsia helvetica*, transmise par *I. ricinus* (Péter, 1985; Beati *et al.*, 1993).

Les travaux menés dans le canton de Neuchâtel par Péter (1985) ont montré que 30.7 % (27/88) des chevreuils possèdent des anticorps contre cette rickettsie. Ces anticorps diminuent avec l'altitude et ont également été détectés chez d'autres animaux sauvages et des bovins de la région.

Des réactions sérologiques croisées en immunofluorescence n'ont jamais été mises en évidence entre les genres *Ehrlichia* et *Rickettsia* (Ristic *et al.*, 1972; Holland *et al.*, 1985a; Holland *et al.*, 1987). Les sérums choisis de chevreuils (Tabl. 15) ont été testés sur de l'antigène de *R. helvetica*. Les titres obtenus sur *R. helvetica* sont tous inférieurs à 1:20 alors que des titres plus élevés sont constatés sur *E. phagocytophila*.

A notre connaissance, les seuls micro-organismes classés dans le genre *Ehrlichia*, décrits comme infectant naturellement des rongeurs sont: *Ehrlichia kurlovi* (Moshkovski, 1937) chez le cobaye, *Ehrlichia*(=*Cytoecetes*) *microti* (Tyzzer, 1938) chez *Microtus pensylvanicus* aux Etats-Unis et *Ehrlichia*(=*Cytoecetes*) *kamtchoulii* (Gretillat *et al.*, 1981) chez le rat de Gambie (*Cricetomys gambianus*) au Sénégal. Des recherches sur les hôtes réservoirs potentiels d' *E. risticii* aux Etats-Unis ont permis de déceler des anticorps IgG (1:20) chez des rongeurs du genre *Peromyscus* (Gordon *et al.*, 1988). Dernièrement un micro-organisme, morphologiquement similaire à *Ehrlichia sp* et donnant des réaction croisées en IFI avec *E. canis*, a été isolé dans la rate d'un campagnol (*Eothenomys kageus*) au Japon (Kawahara *et al.*, 1993).

Chez des souris de laboratoire, *E. risticii* cause des infections cliniques (Rikihisa *et al.*, 1987) et *E. sennetsu* injecté à des souris peut être réisolé (Misao et Kobayashi, 1955). Dans l'intention d'avoir une source d' *E. phagocytophila* et des animaux expérimentaux plus adéquats, Foggie et Hood (1961) ont adapté en laboratoire une souche ovine de l'agent pathogène à des cobayes et des souris splénectomisés, puis, après plusieurs passages, à des rongeurs intacts. Chez le cobaye intact, la souche a tenu 67 passages; chez la souris, elle a été perdue après 23 passages.

Les premiers travaux sur la fièvre de pâture chez les moutons (MacLeod, 1932; MacLeod et Gordon, 1932, 1933; MacLeod, 1936) démontrèrent que s'il existait une transmission transtadiale, il n'y avait pas transmission transovarienne de l'agent pathogène chez le vecteur. Des recherches en microscopie électronique et des récoltes sur le terrain, études menés quelques années plus tard, ont confirmé cette hypothèse (Lewis, 1977, 1979; Webster et Mitchell, 1989).

Des conclusions similaires ont été formulées pour *E. canis*, transmis par la tique *Rhipicephalus sanguineus* (Groves *et al.*, 1975; Lewis *et al.*, 1977).

A la vue des très faibles titres d'anticorps rencontrés et de l'impossibilité pour l'agent de passer d'une génération de vecteur à une autre, on peut supposer que le rôle joué dans le cycle d' *E. phagocytophila* par les trois espèces de micromammifères que nous avons capturés, soit *Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis* et *Clethrionomys glareolus*, est négligeable.

Si tous les rongeurs capturés dans l'Oberland bernois sont des hôtes naturels d' *I. ricinus*, ce sont uniquement les stades subadultes et plus particulièrement les larves qui les parasitent (Aeschlimann, 1972; Mermod *et al.* 1973, Gern, 1984; Matuschka, 1991). Ainsi, la seule manière pour ces micromammifères d'être infectés, serait par une nymphe dont le stade antérieur aurait pris un repas infectieux sur un ruminant domestique ou sauvage, uniques animaux connus susceptibles d'héberger *E. phagocytophila*. Les mammifères de grande taille sont généralement considérés comme des hôtes habituels d'adultes et de nymphes d' *I. ricinus* (Aeschlimann, 1972). Mais des études récentes, en France, en Allemagne et en Suède, ont montrés que le chevreuil peut héberger des larves en grande quantité (Jaenson et Tälleklint, 1992; Matuschka *et al.*, 1993; Gilot *et al.*, 1994).

Si la dissémination de la fièvre de pâture peut-être assurée par les déplacements des chevreuils et des chamois, servant d'hôtes à l'agent pathogène et aux vecteurs, le rôle des micromammifères dans la propagation de l'infection est encore sujet à discussion.

Infex	N	M	F	L*
11	0/46	0/15	0/25	0/50
12	-	0/10	0/20	0/50
13	-	3/27	7/24	-
14	-	1/18	6/15	-
21	-	0/13	0/27	0/50
22	-	11/14	7/25	0/50
23	-	6/6	18/18	0/50
24	-	20/20	20/20	0/50

Tabl. 16. Analyses en IFI de tiques *I. ricinus* à jeun, dont les stades antérieurs se sont gorgés sur des bovins expérimentalement infectés (infex)

(tiques positives/tiques testées) * larves provenant de différentes femelles

L = larves
N = nymphes
M = mâles
F = femelles

5.4 *E. phagocytophila* chez *Ixodes ricinus*

5.4.1. Recherche d' *E. phagocytophila* dans des tiques gorgées sur des bovins expérimentalement infectés

Avant de commencer les analyses en IFI des nombreuses *I. ricinus* récoltées sur le terrain, il nous a paru nécessaire d'avoir un contrôle positif qui puisse confirmer la technique utilisée pour détecter *E. phagocytophila* dans les tiques. Le but de ces expériences était donc d'avoir des lots de tiques "positives".

Les résultats de ces infections expérimentales sont exposés dans le Tabl. 16. On remarque que la fréquence de la transmission d' *E. phagocytophila* de l'hôte au vecteur est très variable d'une expérience à l'autre. Par contre, la transmission transstadiale, de la nymphe à l'adulte, réussit totalement dans les infex 23 et 24. L'agent responsable de la fièvre de pâture n'a jamais été détecté chez des larves provenant de différentes femelles.

Le nombre de tiques examinées a été limité, d'une part parce que nous ne voulions pas faire une étude sur la transmission d' *E. phagocytophila*, d'autre part parce que de grandes pertes de tiques sont survenues lors des repas sanguins ou lors de la mue. Les tiques utilisées proviennent de l'élevage de l'institut de Zoologie et se gorgent depuis de nombreuses générations, suivant les stades, sur des souris ou des lapins. Cette pratique a peut-être sélectionné des populations de tiques, particulièrement des adultes, qui prennent ensuite difficilement un repas sanguin sur des gros mammifères.

5.4.2. Recherche d' *E. phagocytophila* dans des tiques récoltées sur le terrain

Dans les cinq pâturages de l'Oberland bernois où nous avons récolté des tiques, les prés sont entourés sur une bonne partie par des forêts de feuillus et de conifères. Les clôtures délimitant les lieux de pâtures sont adossées directement à la lisière des bois. Les bordures des pâturages, riche en végétation, ainsi que les haies, les arbustes ou les bosquets, disséminés dans les prés, sont souvent fréquentés par les animaux qui recherchent de l'ombre. C'est dans ces biotopes que nous avons fait la presque totalité de nos captures. Très rarement des tiques sont récoltées en plein pâturage;

lorsque cela arrive, c'est généralement sur des lieux plats où l'herbe couchée trahit les fréquentations coutumières des bovins venant se reposer.

Pendant les mois de mai, juillet et septembre 1990, nous avons récoltés, à l'aide de la technique du drapeau, 1655 *I. ricinus*. (Annexe VIII). L'examen en IFI de ces tiques nous a jamais permis de détecter *E. phagocytophila*.

5. 4. 3. Essai d'infection de bovins avec des tiques

Deux veaux ont été infectés avec des organes broyés d' *I. ricinus*, un lot provenait de nymphes et d'adultes récoltés dans la nature et l'autre, de nymphes, dont les larves s'étaient nourries sur un bovin préalablement infecté.

Nous n'avons jamais constaté de réaction fébrile chez les animaux et aucune *E. phagocytophila* n'a été détecté dans leur sang. Les examens sérologiques sont restés également négatifs et les valeurs hématologiques normales.

5. 4. 4. Discussion

Notre objectif principal était de connaître la prévalence des tiques *I. ricinus* infectées, récoltées sur des pâturages réputés pour être des lieux d'infection pour les bovins. Nous avons été surpris par les résultats. Les tests IFI ont déjà été employés auparavant pour mettre en évidence *E. phagocytophila* (Lewis, 1977, 1979) et *E. canis* (Smith *et al.*, 1976) chez leur vecteur. Dans nos expériences, la détection d' *E. phagocytophila* chez des tiques, dont les stades antérieurs se sont gorgés expérimentalement, prouve le bon fonctionnement de la méthode. L'explication est peut être que les tiques récoltées sur le terrain ne sont pas assez infectées pour que *E. phagocytophila* puisse être détecté par IFI. Smith *et al.* (1976) et Lewis *et al.* (1977) ont montré qu'un gorgement partiel des nymphes de *R. sanguineus*, infectées en tant que larves, est un traitement préliminaire nécessaire pour mener à bien des infections d' *E. canis* chez des chiens avec des tiques. Il est très vraisemblable que le repas sanguin puisse déclencher la multiplication des rickettsies dans les tissus des tiques.

A notre connaissance, la seule étude connue sur les infections à *E. phagocytophila* dans une population d' *I. ricinus* est celle de Webster et Mitchell (1989). Ils ont isolé *E. phagocytophila* dans des tiques grâce à une méthode associant la microscopie électronique à transmission à des immun-sérums de moutons ("Antiserum coated grid method"). L'examen des tiques récoltées en Ecosse a montré que 32 % (n=37) des adultes, 44 % (n=54) des nymphes et aucune larve (n=21) d' *I. ricinus* étaient infectés par *E. phagocytophila*.

En fait, dans des conditions naturelles, la transmission des micro-organismes appartenant au genre *Ehrlichia* est mal connue. Les tiques sont indéniablement les vecteurs pour quelques espèces, *E. canis* et *E. phagocytophila*, mais pour les autres membres du genre, leur rôle est indirectement reconnu et les données en leur faveur sont manquantes.

Dès les premières recherches sur la fièvre de pâture, *I. ricinus* a été impliqué comme responsable de la transmission (MacLeod, 1932; MacLeod et Gordon, 1932, 1933; MacLeod, 1936). Ces différents auteurs ont remarqué que les repas sanguins pris par les tiques sur des moutons ou l'inoculation d'organes broyés d' *I. ricinus*, provenant de foyers à louping-ill, provoquaient chez l'animal, une forte poussée de fièvre. Par contre, les injections d'organes provenant des larves ne provoquaient aucun symptôme. MacLeod et Gordon (1933) transmirent la maladie à des moutons en leur déposant des adultes et des nymphes dont les stades antérieurs s'étaient gorgés sur des animaux infectés. Tous ces auteurs conclurent que s'il existait une transmission transstadiale, il n'y avait pas de transmission transovarienne chez la tique. Les travaux de Lewis (1977, 1979) et Webster et Mitchell (1989), ainsi que nos propres observations confirment ces résultats. Des conclusions similaires ont été faites sur la tique *R. sanguineus*, responsable de la transmission d' *E. canis* (Groves *et al.*, 1975; Smith *et al.*, 1976).

Des études en microscopie électronique, en IFI et IFD ont montré que *E. phagocytophila* envahit les cellules de l'épithélium intestinal, les glandes salivaires, l'hémolymphe et les ovaires d' *I. ricinus* (Lewis, 1977, 1979). Très communs dans le cytoplasme des oocytes, Lewis (1979) les a signalés dans les mitochondries de ces cellules. Egalement par des techniques de microscopie électronique et d'immunofluorescence, Smith *et al.* (1976) retrouvent les mêmes sites d'infection pour *E. canis* chez *R. sanguineus*, mais jamais dans les ovaires.

5. 5. Les infections expérimentales

Des animaux ont été infectés expérimentalement (Infex) pour mettre en évidence les bouleversements hématologiques provoqués par des infections à *E. phagocytophila* de souche suisse.

Un total de huit veaux ont été infectés (infex 11, 12, 13, 14, 17, 18, 23 et 24). A chaque fois, les inoculations ont simultanément été menées sur un couple d'animaux.

L'examen des frottis sanguins, réalisés à partir du sang des animaux donateurs, a montré que les deux isolats initiaux utilisés, SR et CH, contenaient respectivement 63 % et 77 % des neutrophiles infectés par *E. phagocytophila*. Les agents pathogènes ont également pu être observés dans des éosinophiles et des monocytes.

Tous les inocula possèdent, au minimum, 50 % de leurs neutrophiles infectés. Ils se différencient par leur provenance, le type et la durée de conservation, ainsi que par le nombre de passages effectués précédemment chez d'autres veaux. A part les animaux des infex 11 et 12, chaque couple d'infections expérimentales a reçu le même inoculum.

5. 5. 1. Analyses hématologiques et biologiques

5. 5. 1. 1. Présentation des résultats

Dans les chapitres suivants, sont présentés uniquement les résultats obtenus chez des veaux manifestant des symptômes cliniques d'infection à *E. phagocytophila* (infex 11, 12, 13, 14, 17, 23 et 24).

L'absence d' *E. phagocytophila* dans les neutrophiles, de réaction fébrile et d'altérations significatives des valeurs hématologiques suggèrent fortement que l'infection a échoué chez l'infex 18.

Les résultats marquants, sous forme de graphiques, sont exposés à la fin du Chap. 5. 4. 1. Ces graphiques sont disposés de manière à mettre en évidence la

variation des valeurs (température, parasitémie, types cellulaires) les unes par rapport aux autres. La durée de la parasitémie est constamment indiquée.

La totalité et le détail des résultats bruts sont présentés dans l'Annexe X.

5. 5. 1. 2. Parasitémie (Fig. 22, 23, 24, 25 et Annexe X)

a) Neutrophiles

Les granulocytes neutrophiles sont les principales cellules sanguines envahies par les agents pathogènes. *E. phagocytophila* apparaît dans leur cytoplasme le 4^{ème} (infex 11, 12, 13 et 14) ou le 6^{ème} jour (infex 17, 23 et 24) après l'infection (= p. i.). En deux à trois jours, 46 à 64 % des neutrophiles sont infectés. Les micro-organismes rencontrés se présentent comme de simples particules ou des amas plus ou moins importants. A partir de ces parasitémies maximales, le nombre des cellules atteintes va diminuer progressivement. Les agents pathogènes resteront présents dans le sang, suivant les infex, jusqu'au 11^{ème} ou 13^{ème} jour.

Pour les infex 11 et 12, la distribution de la parasitémie, tout le long de l'expérience, diffère des autres. Au 13^{ème} jour, après la disparition d' *E. phagocytophila* chez l'infex 11 et un taux très réduit de cellules infectées chez l'infex 12 (1 %), les micro-organismes réapparaissent dans le sang. A la fin de l'expérience (17 jours p. i.), on ne retrouve plus de rickettsies chez l'infex 12, mais 9 % des neutrophiles de l'infex 11 sont encore infectés.

Pour l'infex 17, après une absence le 14^{ème} jour, *E. phagocytophila* est de nouveau observé le dernier jour de l'expérience (15 jour p. i.).

b) Autres cellules

Nous n'avons pas pu mettre en évidence *E. phagocytophila* dans d'autres types de cellules.

5. 5. 1. 3. Température rectale (Fig. 22, 23, 24, 25 et Annexe X)

La moyenne des températures relevée chez les animaux avant le début des expériences, pendant leur période d'adaptation, est de 38.7 ± 0.2 °C.

Une augmentation de la température rectale apparaît brusquement quatre à sept jours p. i.. Des températures supérieures à 39.4 °C persistent un à cinq jours. Pendant cette phase fébrile, les températures maximales varient, entre le 5ème et le 7ème jour, de 39.8 à 40.8 °C, puis diminuent, pour retrouver, 9 à 12 jours p. i., des valeurs normales.

L'augmentation de la température est liée à l'apparition d' *E. phagocytophila* dans le sang des animaux. Des températures supérieures à 39.4 °C apparaissent soit le même jour (infix 13, 14 et 23), soit un jour après (infix 11, 12 et 17), soit un jour avant (infix 24) la détection des rickettsies.

Les taux les plus élevés de neutrophiles infectés se rencontrent durant la phase fébrile; sauf pour l'infix 24, où la parasitémie maximale correspond à une température redevenue normale. Pour les infix 11, 13, 14 et 23, les températures maximales concordent même, jour pour jour, aux parasitémies maximales.

La chute des températures vers des valeurs normales n'est pas associée à la disparition d' *E. phagocytophila* du sang. Parfois même, des températures de 38.6 et 39 °C correspondent à des parasitémies non négligeables, respectivement, de 37 et 45 % (infix 11 et 12).

Pour toutes les autres infections, des températures redevenues normales annoncent une disparition des Ehrlichieae dans les trois jours qui suivent.

Chez les infix 11 et 12, la deuxième vague de parasitémie ne provoque pas une nouvelle hyperthermie.

Les valeurs des Tabl. 17 à 31 sont en exprimées en moyenne \pm erreur standard

P1 : jours 0 à 3	Différences significatives: par rapport à la période P1	* =	$p \leq 0.05$
P2 : jours 4 à 7		** =	$p \leq 0.01$
P3 : jours 8 à 11		*** =	$p \leq 0.001$
P4 : jours 12 à 16			
P5 : jours 17 à 21			

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	9.65 \pm 0.41	* 7.28 \pm 0.56	* 7.58 \pm 0.43	9.68 \pm 0.30	-
12	9.28 \pm 0.53	6.78 \pm 1.13	** 5.10 \pm 0.32	** 6.18 \pm 0.30	-
13	12.65 \pm 0.86	** 5.85 \pm 1.04	*** 6.20 \pm 0.42	** 7.42 \pm 0.66	** 9.32 \pm 0.51
14	11.70 \pm 0.05	** 6.43 \pm 1.20	** 5.68 \pm 0.40	** 7.64 \pm 0.69	* 10.32 \pm 0.20
17	8.18 \pm 0.33	6.68 \pm 0.81	** 4.80 \pm 0.34	** 5.90 \pm 0.27	-
18	6.13 \pm 0.36	6.85 \pm 0.43	6.03 \pm 0.17	5.50 \pm 0.16	-
23	13.42 \pm 0.28	9.93 \pm 1.28	*** 10.0 \pm 0.21	* 11.26 \pm 0.66	13.12 \pm 0.24
24	12.18 \pm 0.57	** 7.18 \pm 1.12	*** 6.83 \pm 0.29	** 8.00 \pm 0.18	* 10.34 \pm 0.21

Tabl. 17. Valeurs des leucocytes ($\times 10^9/l$)

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	6.11 \pm 0.39	* 4.13 \pm 0.52	5.77 \pm 0.60	7.03 \pm 0.41	-
12	5.67 \pm 0.59	* 3.25 \pm 0.60	* 3.86 \pm 0.21	4.58 \pm 0.28	-
13	4.89 \pm 0.31	** 2.44 \pm 0.53	4.45 \pm 0.32	5.24 \pm 0.25	* 6.11 \pm 0.19
14	6.24 \pm 0.33	** 2.90 \pm 0.69	* 4.36 \pm 0.50	5.66 \pm 0.22	6.17 \pm 0.13
17	4.29 \pm 0.12	3.34 \pm 0.48	* 2.70 \pm 0.46	4.28 \pm 0.16	-
18	2.86 \pm 0.21	3.34 \pm 0.27	3.15 \pm 0.18	3.06 \pm 0.15	-
23	8.58 \pm 0.36	* 5.82 \pm 1.06	7.52 \pm 0.30	8.66 \pm 0.35	9.16 \pm 0.30
24	6.08 \pm 0.16	3.01 \pm 1.00	* 4.81 \pm 0.31	5.57 \pm 0.19	5.69 \pm 0.19

Tabl. 18. Valeurs des lymphocytes ($\times 10^9/l$)

5. 5. 1. 4. Leucocytes (Fig. 22, 23, 24, 25 et Annexe X)

Entre le 3ème et le 6ème jour p. i., on remarque une diminution du nombre des leucocytes dans le sang. Les valeurs minimales, comprises entre 3.9 et $7.6 \times 10^9/l$, sont atteintes un à cinq jours après, entre le 5ème et le 10ème jour p. i.. A partir de ce moment, le nombre des leucocytes augmente.

Cette hausse progressive du nombre des leucocytes n'atteint pas les valeurs initiales des expériences. Les périodes P4, excepté pour l'infex 11, restent significativement inférieures aux périodes P1. Pour les expériences poursuivies sur 21 jours, les périodes P5 demeurent, excepté pour l'infex 23, également en-dessous des périodes initiales P1 (Tabl. 17).

Certaines valeurs du début des infex 13, 14, 23 et 24, ainsi qu'à la fin de l'infex 23 sont supérieures aux valeurs des tables de référence (Annexe VIII).

Excepté pour l'infex 13 (5 jours p. i.: $3.9 \times 10^9/l$), nous n'avons pas observé de leucopénie chez les animaux.

La diminution des leucocytes coïncide, à un jour près, avec l'augmentation de la température rectale et l'apparition d' *E. phagocytophila* dans le sang. Chez les infex 17 et 23, cette baisse a lieu avant la phase fébrile.

De plus, lorsque le nombre de leucocytes est faible, la parasitémie est élevée.

a) Lymphocytes (Fig. 26, 27, 28, 29 et Annexe X)

Une diminution des lymphocytes a lieu entre le 4ème et 6ème jour p.i.. Des valeurs minimales, comprises entre 1.705 à $3.767 \times 10^9/l$, sont décelées entre le 5ème et 9ème jour p. i.. Pendant cette période, des lymphocytopénies sont détectées. Elles sont absolues pour les infex 12, 13, 14, 17 et 24 et relatives pour les infex 11, 12, 13, 14, 17 et 24. Ensuite, le nombre des lymphocytes, en valeur absolue, augmente progressivement, et 11 à 15 jours après l'inoculation, les valeurs redeviennent normales. On n'observe plus de différences significatives entre les périodes P4 et P5 (excepté l'infex 13), et les périodes P1 (Tabl. 18).

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	63.13 ± 1.74	56.88 ± 5.67	75.75 ± 4.92	* 72.50 ± 2.77	-
12	60.88 ± 3.99	* 47.50 ± 2.09	* 75.88 ± 1.31	* 74.10 ± 2.54	-
13	38.75 ± 1.27	40.88 ± 3.63	*** 72.00 ± 3.67	*** 71.90 ± 3.67	*** 65.90 ± 1.87
14	53.38 ± 1.86	44.88 ± 6.54	** 76.25 ± 4.64	** 75.40 ± 3.70	* 59.80 ± 0.20
17	52.63 ± 1.57	49.63 ± 2.81	57.13 ± 9.86	*** 72.75 ± 2.76	-
18	46.75 ± 2.93	48.75 ± 2.40	52.25 ± 1.96	* 55.50 ± 1.40	-
23	66.88 ± 1.68	57.50 ± 4.07	** 75.13 ± 1.69	*** 77.20 ± 1.68	* 69.80 ± 1.40
24	50.25 ± 2.47	39.00 ± 6.74	*** 70.38 ± 2.16	*** 69.00 ± 2.05	55.00 ± 0.91

Tabl. 19. Valeurs des lymphocytes (%)

Par contre, en valeur relative, à partir des faibles valeurs atteintes le 6ème et 7ème jour (entre 25 et 46.5 % de la formule leucocytaire), l'augmentation va être très rapide; un à quatre jours après ces seuils minimaux, on observe des lymphocytoses relatives chez les animaux. Si des pourcentages de lymphocytes supérieurs à 65 % sont présents chez tous les animaux, à partir du 10ème jour p. i., une seule lymphocytose absolue est observée (infix 24). Pendant cette période, de nombreux lymphocytes atypiques sont détectés.

Excepté pour les infex 11 et 17, toutes les périodes P3 et P4, cette fois-ci sans exception pour toutes les infex, sont significativement supérieures aux périodes P1. Cela est encore valable pour les périodes P5 des infex 13, 14 et 23 (Tabl. 19).

On peut remarquer que les valeurs relatives des lymphocytes avant l'inoculation, chez les infex 13 et 24, sont en-dessous des valeurs de référence. Chez l'infex 13, ces valeurs basses persisteront jusqu'au 6ème jour p. i..

Si pour certaines infex (11, 12, 13 et 14), la baisse du nombre des lymphocytes a lieu en même temps que l'augmentation de température, pour les autres (infex 17, 23 et 24), elle la précède.

La diminution des lymphocytes débute, soit le même jour que l'apparition d' *E. phagocytophila* (Infex 12, 13, 14 et 17), soit un jour avant (infex 11, 23 et 24). Elle correspond toujours au déclin de la température.

Les valeurs lymphocytaires les plus basses correspondent aux parasitémies les plus élevées (Infex 11, 12, 13, 14, 17 et 23). Pour l'infex 24, elles les précèdent de deux jours.

b) Neutrophiles (Fig. 26, 27, 28, 29 et Annexe X)

Entre le 5ème et 9ème jour p. i., on remarque une diminution des neutrophiles. Cette baisse des neutrophiles est significative, pour certaines expériences (infex 13 et 24), dès la période P2, puis s'accroît fortement dans la période P3 (Tabl. 20). Cette chute continuera les jours suivants pour atteindre, des valeurs minimales à partir du

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	2.49 ± 0.19	2.51 ± 0.48	** 1.07 ± 0.26	1.92 ± 0.25	-
12	2.49 ± 0.32	2.92 ± 0.42	*** 0.51 ± 0.08	** 1.08 ± 0.21	-
13	6.51 ± 0.62	** 2.83 ± 0.53	** 0.73 ± 0.22	*** 1.55 ± 0.44	** 2.42 ± 0.29
14	4.45 ± 0.41	2.88 ± 0.72	** 0.63 ± 0.17	** 1.10 ± 0.31	** 2.66 ± 0.15
17	3.02 ± 0.26	2.69 ± 0.30	1.56 ± 0.61	*** 1.14 ± 0.18	-
18	2.64 ± 0.30	2.91 ± 0.27	2.28 ± 0.13	1.94 ± 0.08	-
23	3.56 ± 0.18	3.29 ± 0.43	*** 1.19 ± 0.08	** 1.55 ± 0.36	** 2.70 ± 0.11
24	4.90 ± 0.45	* 3.43 ± 0.31	* 1.01 ± 0.09	** 1.66 ± 0.19	* 3.56 ± 0.06

Tabl. 20. Valeurs des neutrophiles ($\times 10^9/l$)

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	26.00 ± 2.26	34.25 ± 6.07	14.50 ± 4.18	19.90 ± 2.70	-
12	27.13 ± 3.73	** 43.63 ± 1.48	** 10.00 ± 1.24	17.50 ± 3.30	-
13	51.25 ± 1.56	48.50 ± 2.50	*** 11.63 ± 3.54	*** 19.40 ± 4.40	*** 25.60 ± 1.92
14	37.88 ± 2.38	43.88 ± 6.62	*** 11.50 ± 3.52	*** 13.50 ± 2.46	** 25.70 ± 1.10
17	36.75 ± 2.15	40.63 ± 2.11	31.38 ± 10.71	** 19.00 ± 2.45	-
18	42.88 ± 3.08	42.38 ± 2.55	37.88 ± 1.66	35.38 ± 1.48	-
23	26.63 ± 1.84	33.75 ± 4.07	*** 12.00 ± 1.06	** 13.30 ± 2.25	* 20.60 ± 0.95
24	40.00 ± 1.95	49.38 ± 4.55	*** 14.88 ± 1.56	*** 20.60 ± 2.13	* 34.50 ± 0.76

Tabl. 21. Valeurs des neutrophiles (%)

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	-
12	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	-
13	0.05 ± 0.03	0.17 ± 0.09	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.05	0.08 ± 0.03
14	0.12 ± 0.06	0.27 ± 0.11	0.02 ± 0.01	0.12 ± 0.06	0.09 ± 0.02
17	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.05	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.04	-
18	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.00	-
23	0.03 ± 0.03	0.22 ± 0.09	0.10 ± 0.05	0.09 ± 0.05	0.04 ± 0.02
24	0.14 ± 0.14	0.16 ± 0.06	0.08 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00

Tabl. 22. Valeurs des neutrophiles immatures ($\times 10^9/l$)

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	0.00 ± 0.00	0.63 ± 0.24	0.13 ± 0.13	0.10 ± 0.10	-
12	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.54	0.38 ± 0.24	0.60 ± 0.37	-
13	0.38 ± 0.24	3.63 ± 2.49	0.25 ± 0.14	0.90 ± 0.56	0.90 ± 0.37
14	1.00 ± 0.46	4.63 ± 2.13	0.38 ± 0.24	1.50 ± 0.76	0.90 ± 0.24
17	0.13 ± 0.13	1.00 ± 1.00	1.50 ± 0.61	1.13 ± 0.66	-
18	0.13 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.14	0.50 ± 0.00	-
23	0.25 ± 0.25	2.63 ± 1.14	1.00 ± 0.54	0.80 ± 0.46	0.3 ± 0.12
24	0.13 ± 0.13	2.75 ± 1.09	* 1.13 ± 0.38	0.20 ± 0.12	0.00 ± 0.00

Tabl. 23. Valeurs des neutrophiles immatures (%)

9ème jour (0.256 à $0.876 \times 10^9/l$ et 4 à 11 % de la formule leucocytaire). Durant une période de quatre à huit jours, survenant entre le 8ème et 15ème jour, on observe chez tous les animaux une neutropénie. Des seuils inférieurs à 10 % et égalant 4 % sont atteints. Les valeurs restent à des niveaux bas jusqu'au 13ème et 15ème jour p. i., puis le nombre de neutrophiles augmente, mais sans atteindre les valeurs du début de l'expérience. A partir de la période P4, puis de la période P5, les valeurs remontent, mais restent, sauf pour l'infex 11 (période P4), significativement inférieures aux valeurs des périodes initiales (Tabl. 20). On retrouve des résultats comparables en valeur relative (Tabl. 21).

Cette diminution du nombre des neutrophiles, en valeur absolue, entre le 5ème et 9ème jour, est précédée par une augmentation du pourcentage des neutrophiles dans le sang. Durant un ou deux jours, les valeurs atteignent leur maximum (entre 45.5 et 60 %), et, pour les infex 13, 14, 17 et 24, dépassent les valeurs supérieures des tables de référence (neutrophilies). Ces augmentations en valeur relative sont moins discernables en valeur absolue, excepté peut-être chez les infex 11 et 12.

L'abaissement du nombre absolu de neutrophiles a lieu après celle des lymphocytes. Cette baisse des lymphocytes est compensée par une augmentation du pourcentage de neutrophiles dans le sang. De même, lorsque les neutrophiles atteignent leurs seuils les plus bas, les valeurs relatives des lymphocytes augmentent.

Par rapport à la parasitémie, si la prolifération relative des neutrophiles a lieu le même jour (infex 23 et 24) ou un à deux jours après l'apparition d' *E. phagocytophila* (infex 11, 12, 13, 14 et 17), les valeurs les plus basses correspondent déjà à la diminution des agents pathogènes dans le sang.

c) Neutrophiles immatures (ou juvéniles) (Fig. 26, 27, 28, 29 et Annexe X)

Bien qu'il n'y ait pas de différences significatives entre les périodes P1 et les autres périodes, aussi bien en valeur absolue qu'en valeur relative (Tabl. 22 et 23), on remarque sur les graphiques (surtout chez les infex 13, 14, 17 et 23), une augmentation du nombre des neutrophiles immatures à des moments bien précis des

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	0.25 ± 0.06	0.16 ± 0.04	* 0.07 ± 0.01	0.14 ± 0.03	-
12	0.28 ± 0.08	0.13 ± 0.03	* 0.03 ± 0.01	* 0.04 ± 0.01	-
13	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	*** 0.26 ± 0.03
14	0.25 ± 0.09	0.12 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.42 ± 0.19	** 1.01 ± 0.13
17	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	-
18	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
23	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.10
24	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.03	*** 0.31 ± 0.03

Tabl. 24. Valeurs des éosinophiles ($\times 10^9/l$)

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	2.63 ± 0.75	2.13 ± 0.43	0.88 ± 0.24	1.50 ± 0.32	-
12	2.88 ± 0.69	1.88 ± 0.13	* 0.63 ± 0.24	* 0.60 ± 0.19	-
13	0.13 ± 0.13	0.50 ± 0.20	0.50 ± 0.20	0.60 ± 0.19	*** 2.80 ± 0.20
14	2.25 ± 0.88	2.00 ± 0.20	0.88 ± 0.31	4.90 ± 1.68	** 9.90 ± 1.39
17	0.13 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.38 ± 0.13	-
18	0.13 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
23	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.60 ± 0.37
24	0.50 ± 0.20	0.75 ± 0.32	0.75 ± 0.48	0.70 ± 0.37	*** 3.00 ± 0.27

Tabl. 25. Valeurs des éosinophiles (%)

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	0.15 ± 0.07	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.02	-
12	0.10 ± 0.05	0.05 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	-
13	0.12 ± 0.15	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.02
14	0.04 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	* 0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
17	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.02	** 0.01 ± 0.01	* 0.03 ± 0.01	-
18	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.03 ± 0.02	-
23	0.10 ± 0.02	* 0.01 ± 0.01	** 0.01 ± 0.01	* 0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.03
24	0.09 ± 0.02	* 0.02 ± 0.01	* 0.02 ± 0.01	* 0.02 ± 0.01	0.09 ± 0.02

Tabl. 26. Valeurs des basophiles ($\times 10^9/l$)

expériences. Cette hausse du nombre des neutrophiles juvéniles dans le sang a lieu au moment où la proportion des neutrophiles dans la formule leucocytaire est la plus élevée.

Ce phénomène chez les neutrophiles juvéniles se répète lorsque le nombre des neutrophiles matures, vers la fin des expériences, commence à s'accroître.

Pour toutes les infex, excepté l'infex 11, certaines valeurs, relevées entre le 5ème et le 9ème jour p. i. et, le 11ème (infex 23), le 15ème (infex 13) et le 16ème jour (infex 14), dépassent les valeurs de référence.

d) Eosinophiles (Fig. 30, 31, 32, 33 et Annexe X)

Malgré que les éosinophiles soient potentiellement des cellules-hôtes pour *E. phagocytophila*, nous n'avons pas détecté de changements marqués dans le nombre des éosinophiles durant les expériences. Vers la fin des expériences, à partir du 15ème jour, pour les infex 13, 14 et 24, il y a un accroissement du nombre d'éosinophiles. Les valeurs des périodes P5 sont significativement plus élevées que celles des périodes P1 (Tabl. 24 et 25).

Le nombre d'éosinophile, en valeur absolue ou relative, reste toujours dans les valeurs de référence.

e) Basophiles (Fig. 30, 31, 32, 33 et Annexe X)

Comme pour les éosinophiles, des variations convaincantes dans le nombre des basophiles n'ont pas été relevées.

Excepté chez les infex 11, 12 et 13, au début des expériences, le nombre de basophiles ne dépasse pas les valeurs de référence (Tabl. 26).

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	0.60 ± 0.03	* 0.40 ± 0.05	0.60 ± 0.03	0.50 ± 0.14	-
12	0.73 ± 0.02	** 0.36 ± 0.07	0.61 ± 0.07	* 0.40 ± 0.08	-
13	1.00 ± 0.05	** 0.37 ± 0.10	0.93 ± 0.09	*** 0.47 ± 0.05	** 0.40 ± 0.05
14	0.58 ± 0.05	* 0.24 ± 0.08	0.54 ± 0.07	** 0.30 ± 0.05	0.34 ± 0.08
17	0.75 ± 0.05	0.52 ± 0.13	* 0.44 ± 0.07	*** 0.34 ± 0.04	-
18	0.55 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.48 ± 0.05	** 0.42 ± 0.02	-
23	1.11 ± 0.14	* 0.58 ± 0.07	1.11 ± 0.10	0.85 ± 0.08	1.04 ± 0.05
24	1.00 ± 0.15	* 0.51 ± 0.05	0.78 ± 0.06	0.63 ± 0.07	0.67 ± 0.05

Tabl. 27. Valeurs des monocytes (x 10⁹/l)

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	10.77 ± 0.24	* 9.14 ± 0.38	*** 8.69 ± 0.06	** 8.93 ± 0.18	-
12	10.90 ± 0.11	* 9.68 ± 0.55	*** 7.89 ± 0.22	*** 8.03 ± 0.12	-
13	10.77 ± 0.21	* 9.19 ± 0.45	*** 8.66 ± 0.20	** 9.13 ± 0.31	** 9.37 ± 0.18
14	11.02 ± 0.12	* 8.97 ± 0.56	*** 7.94 ± 0.32	*** 8.67 ± 0.08	*** 9.32 ± 0.05
17	10.55 ± 0.14	* 9.71 ± 0.26	*** 8.91 ± 0.11	*** 9.05 ± 0.19	-
18	9.87 ± 0.28	9.21 ± 0.10	9.18 ± 0.04	9.10 ± 0.14	-
23	10.11 ± 0.15	9.13 ± 0.43	*** 8.19 ± 0.16	* 8.95 ± 0.29	*** 8.40 ± 0.08
24	8.23 ± 0.11	7.38 ± 0.48	* 7.69 ± 0.14	* 7.71 ± 0.02	8.34 ± 0.19

Tabl. 28. Valeurs des érythrocytes (x 10¹²/l)

f) Monocytes (Fig. 30, 31, 32, 33 et Annexe X)

Une diminution du nombre des monocytes apparaît dès le 4ème jour p.i., atteignant des valeurs minimales, comprises entre 0.132 et $0.440 \times 10^9/l$, entre le 4ème et 6ème jour. Cette baisse est significative entre les périodes P2 et P1 pour les infex 11, 12, 13, 14, 23 et 24 (Tabl. 27). A partir de ces valeurs, les monocytes augmentent et leur nombre redevient normal entre le 8ème et 10ème jour. Mais les valeurs ne se stabilisent pas. On retrouve des valeurs faibles, entre le 12ème et 15ème jour (infex 12, 13, 14, 17 et également 18). Pour ces infex, les périodes P4 sont significativement inférieures aux périodes P1 (Tabl. 27).

La première diminution du nombre de monocytes a lieu dès l'apparition d' *E. phagocytophila* et la deuxième semble coïncider avec la fin de la parasitémie.

Chez tous les animaux, même celui de l'infex 18, les valeurs sont, de façon inexplicable, très en-dessus des valeurs de référence.

5. 4. 1. 5. Erythrocytes (Fig. 34, 35, 36, 37 et Annexe X)

Le nombre des érythrocytes commence à chuter entre le 4ème et 6ème jour p. i.. Les seuils les plus bas (6.37 à $8.84 \times 10^{12}/l$) sont atteints entre le 7ème et 8ème jour. A partir de là, les valeurs augmentent légèrement, mais sans atteindre les valeurs initiales. Les périodes P4 sont significativement inférieures aux périodes P1. Pour les expériences dépassant les 16 jours, les périodes P5, excepté pour l'infex 24, restent également en-dessous des périodes P1 (Tabl. 28).

Par contre, les valeurs observées ne s'écartent pas des valeurs de référence.

Cette légère baisse des globules rouges coïncide avec l'apparition d' *E. phagocytophila* dans le sang (infex 14, 17, 23 et 24) ou intervient un ou deux jours après (infex 11, 12 et 13).

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	32.92 ± 0.23	* 28.40 ± 1.04	** 28.00 ± 0.32	** 29.68 ± 0.40	-
12	33.42 ± 0.23	30.80 ± 1.84	*** 25.25 ± 0.86	*** 26.90 ± 0.49	-
13	31.90 ± 0.75	* 26.92 ± 1.27	** 26.02 ± 0.62	* 27.84 ± 1.04	* 29.00 ± 0.48
14	34.77 ± 0.38	* 27.90 ± 1.72	*** 25.65 ± 1.22	*** 29.94 ± 0.38	*** 32.44 ± 0.22
17	31.40 ± 0.56	* 28.82 ± 0.81	*** 26.87 ± 0.46	** 27.57 ± 0.58	-
18	34.35 ± 0.95	* 31.62 ± 0.31	31.80 ± 0.12	* 31.52 ± 0.49	-
23	33.65 ± 0.52	30.22 ± 1.48	*** 27.97 ± 0.71	31.14 ± 1.07	*** 29.28 ± 0.30
24	28.45 ± 0.34	25.72 ± 1.64	27.57 ± 0.54	28.02 ± 0.07	30.32 ± 0.69

Tabl. 29. Valeurs de l'hématocrite (%)

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	11.10 ± 0.23	* 9.62 ± 0.38	** 9.37 ± 0.19	** 9.88 ± 0.12	-
12	11.32 ± 0.11	10.25 ± 0.63	*** 8.37 ± 0.30	*** 8.68 ± 0.11	-
13	10.42 ± 0.21	* 9.12 ± 0.39	*** 8.57 ± 0.21	** 9.12 ± 0.27	** 9.42 ± 0.19
14	11.75 ± 0.09	* 9.75 ± 0.58	* 8.70 ± 0.44	*** 10.00 ± 0.11	*** 10.96 ± 0.05
17	10.87 ± 0.15	* 10.25 ± 0.24	*** 9.35 ± 0.12	*** 9.50 ± 0.15	-
18	11.87 ± 0.29	11.17 ± 0.12	11.12 ± 0.06	* 11.00 ± 0.14	-
23	10.02 ± 0.12	10.92 ± 0.46	*** 9.92 ± 0.18	11.08 ± 0.40	*** 10.40 ± 0.09
24	9.97 ± 0.20	9.12 ± 0.57	9.65 ± 0.18	9.76 ± 0.02	10.60 ± 0.22

Tabl. 30. Valeurs de l'hémoglobine (g/dl)

INFEX	P1	P2	P3	P4	P5
11	629.00 ± 57.93	* 371.75 ± 81.26	449.75 ± 81.02	* 911.67 ± 59.61	-
12	523.75 ± 54.69	* 275.00 ± 74.91	* 246.25 ± 65.60	511.67 ± 12.68	-
13	540.50 ± 49.49	326.25 ± 115.62	472.50 ± 39.50	* 756.67 ± 56.36	* 699.20 ± 29.28
14	713.00 ± 14.68	* 372.00 ± 86.51	* 582.00 ± 54.00	733.67 ± 14.75	* 794.40 ± 3.56
17	610.50 ± 11.50	511.25 ± 47.86	378.00 ± 78.00	636.75 ± 36.63	-
18	490.00 ± 31.00	441.50 ± 11.95	442.50 ± 4.50	417.50 ± 0.96	-
23	397.25 ± 7.45	296.75 ± 64.04	* 192.75 ± 33.81	416.60 ± 15.61	** 440.00 ± 4.57
24	674.50 ± 8.67	467 ± 25 ± 98.93	* 324.25 ± 50.02	659.20 ± 24.90	** 757.60 ± 11.12

Tabl. 31. Valeurs des thrombocytes ($\times 10^9/l$)

Les valeurs de l'hématocrite (Tabl. 29 et Annexe X) et de l'hémoglobine (Tabl. 30 et Annexe X) accompagnent étroitement la variation des érythrocytes.

5. 4. 1. 6. Thrombocytes (Fig. 34, 35, 36, 37 et Annexe X)

Les thrombocytes chutent brusquement entre le 5ème et le 6ème jour p. i.. Les seuils minimums sont atteints entre le 6ème et le 8ème jour (86 à $300 \times 10^9/l$). Pour toutes les infex, les valeurs sont très proches du seuil inférieur de référence ou en-dessous (infex 12, 14 et 24). Le nombre des thrombocytes redevient normal après 11 à 13 jours p. i.. A la fin des expériences, excepté pour les infex 11 et 13, s'il n'y a plus de différences significatives entre les périodes P4 et P1, les valeurs des périodes P5 sont toutes supérieures à celles des périodes P1 (Tabl. 31).

La diminution du nombre de thrombocytes est passagère, les valeurs initiales des expériences sont atteintes, chez toutes les infex, avant la disparition d' *E. phagocytophila* du sang périphérique.

Cette baisse des plaquettes sanguines coïncide avec l'apparition d' *E. phagocytophila* dans le sang (infex 23 et 24) ou a lieu un à deux jours après (infex 11, 12, 13, 14 et 17). Elle précède de un à trois jours celle des neutrophiles. Lorsque les thrombocytes retrouvent des valeurs du début de l'expérience, les seuils les plus bas sont atteints par les neutrophiles.

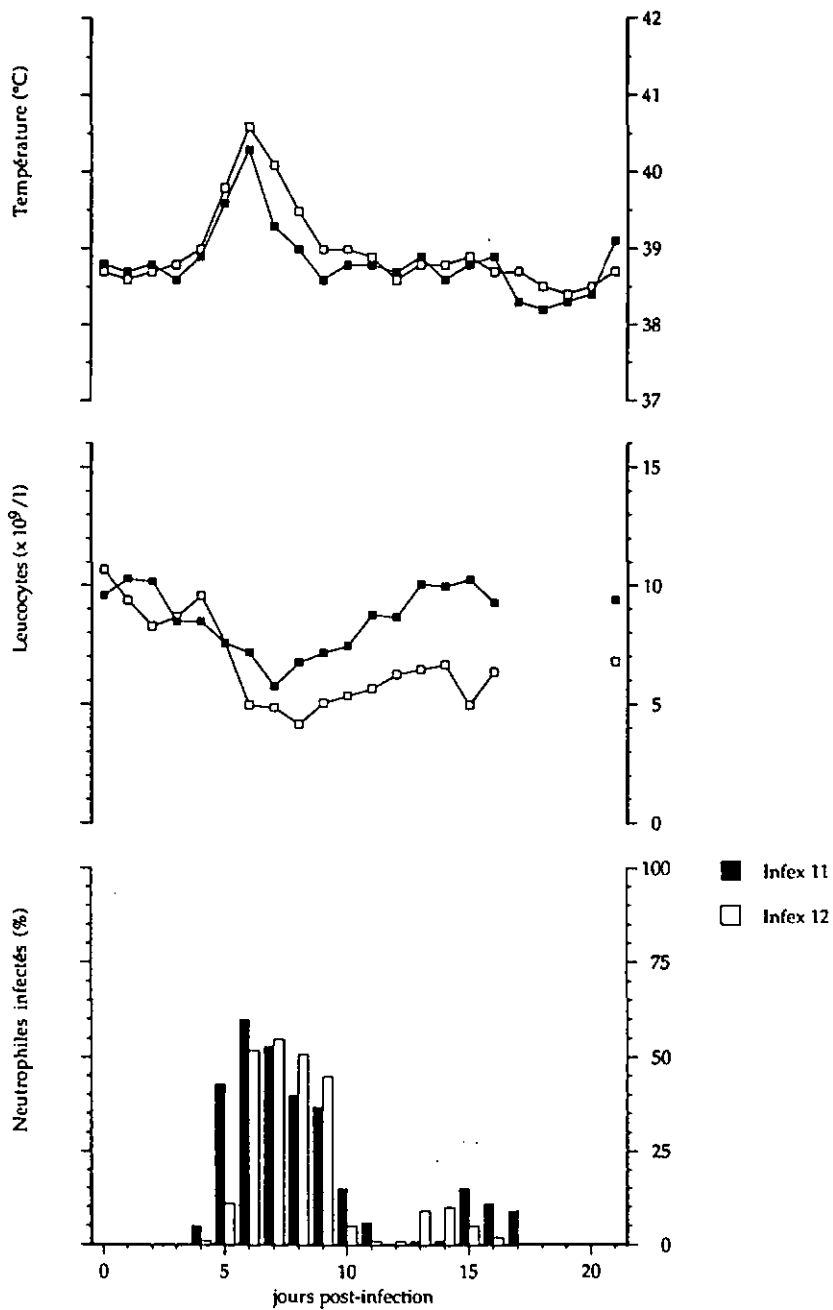


Fig. 22. Infex 11 et 12: Evolution de la température rectale, des leucocytes et de la parasitémie

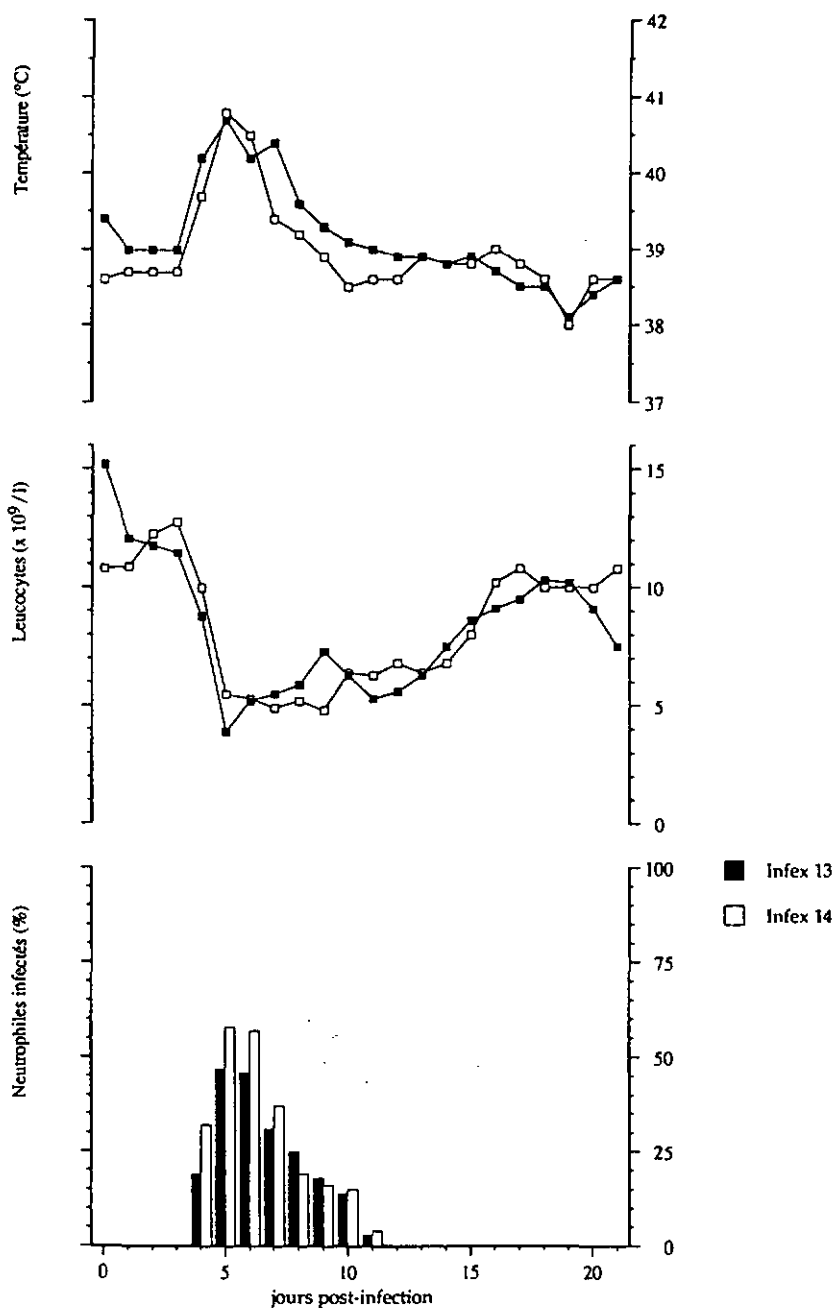


Fig. 23. Infex 13 et 14: Evolution de la température rectale, des leucocytes et de la parasitémie

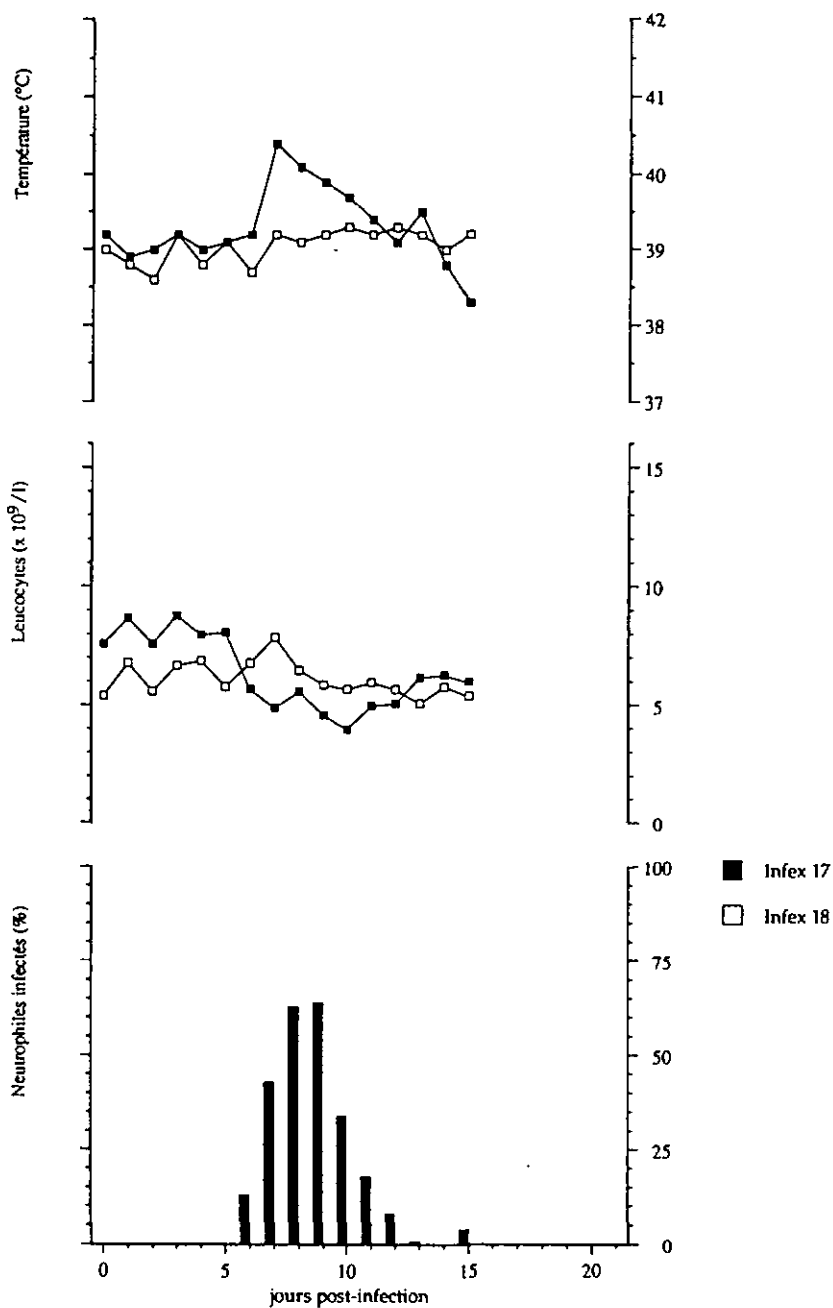


Fig. 24. Infx 17 et 18: Evolution de la température rectale, des leucocytes et de la parasitémie

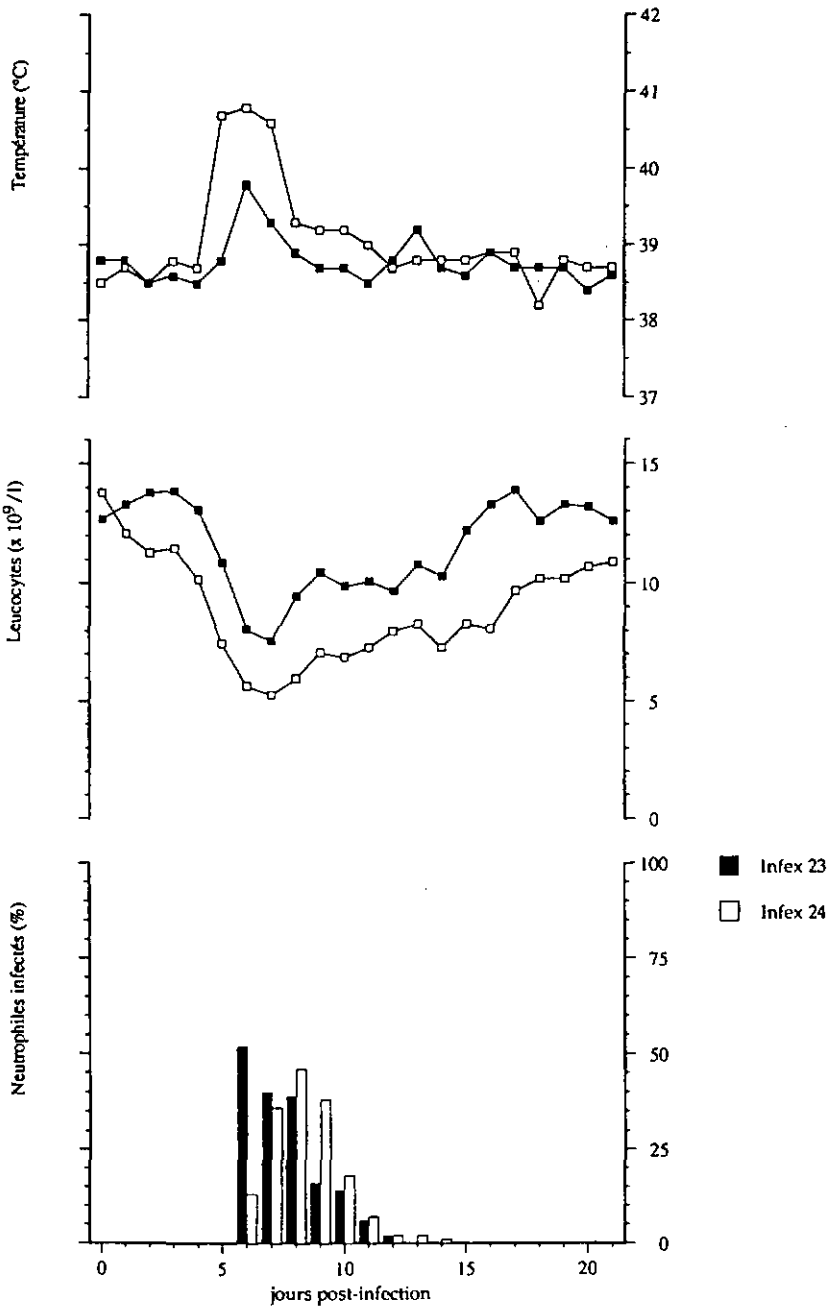


Fig. 25. Infx 23 et 24: Evolution de la température rectale, des leucocytes et de la parasitémie

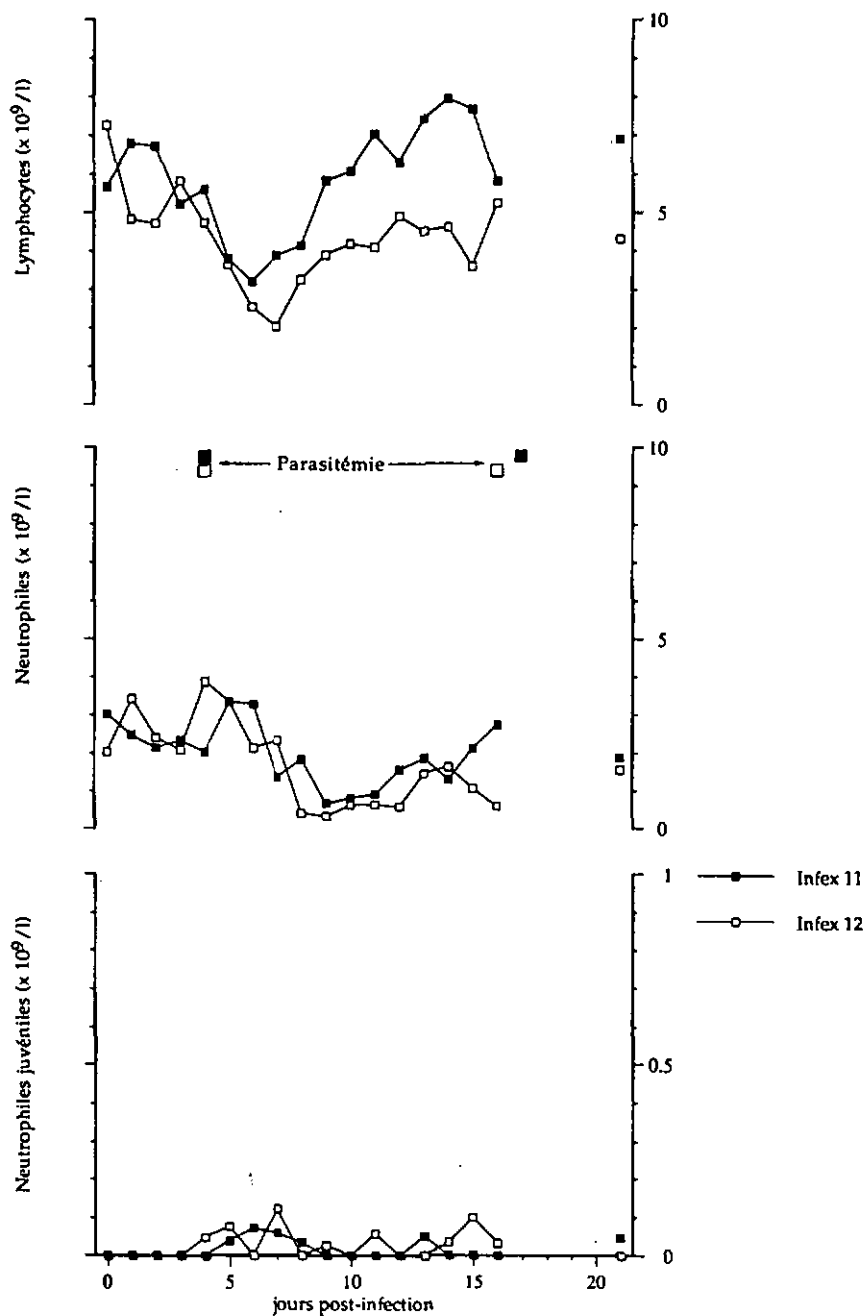


Fig. 26. Infex 11 et 12: Evolution des lymphocytes, des neutrophiles et des neutrophiles juvéniles

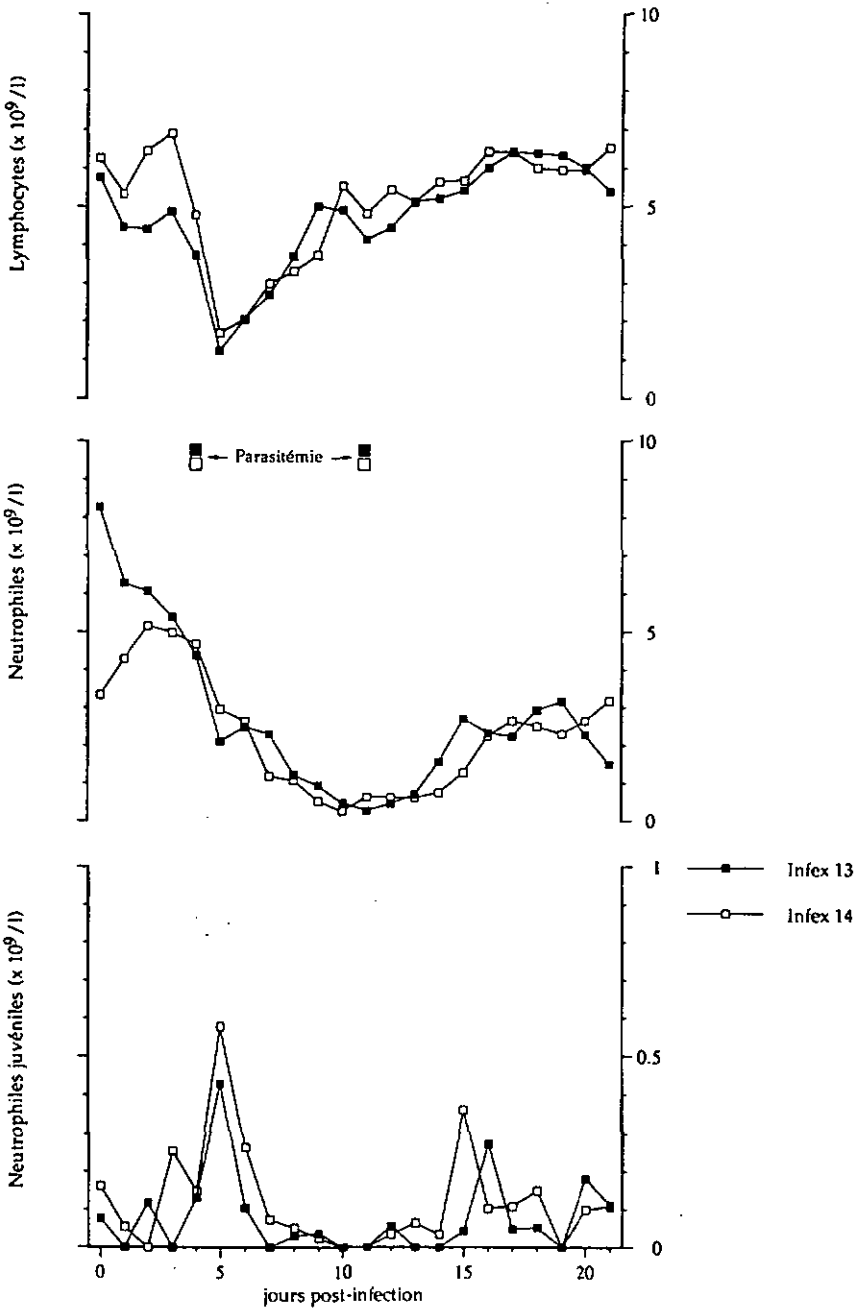


Fig. 27. Infx 13 et 14: Evolution des lymphocytes, des neutrophiles et des neutrophiles juvéniles

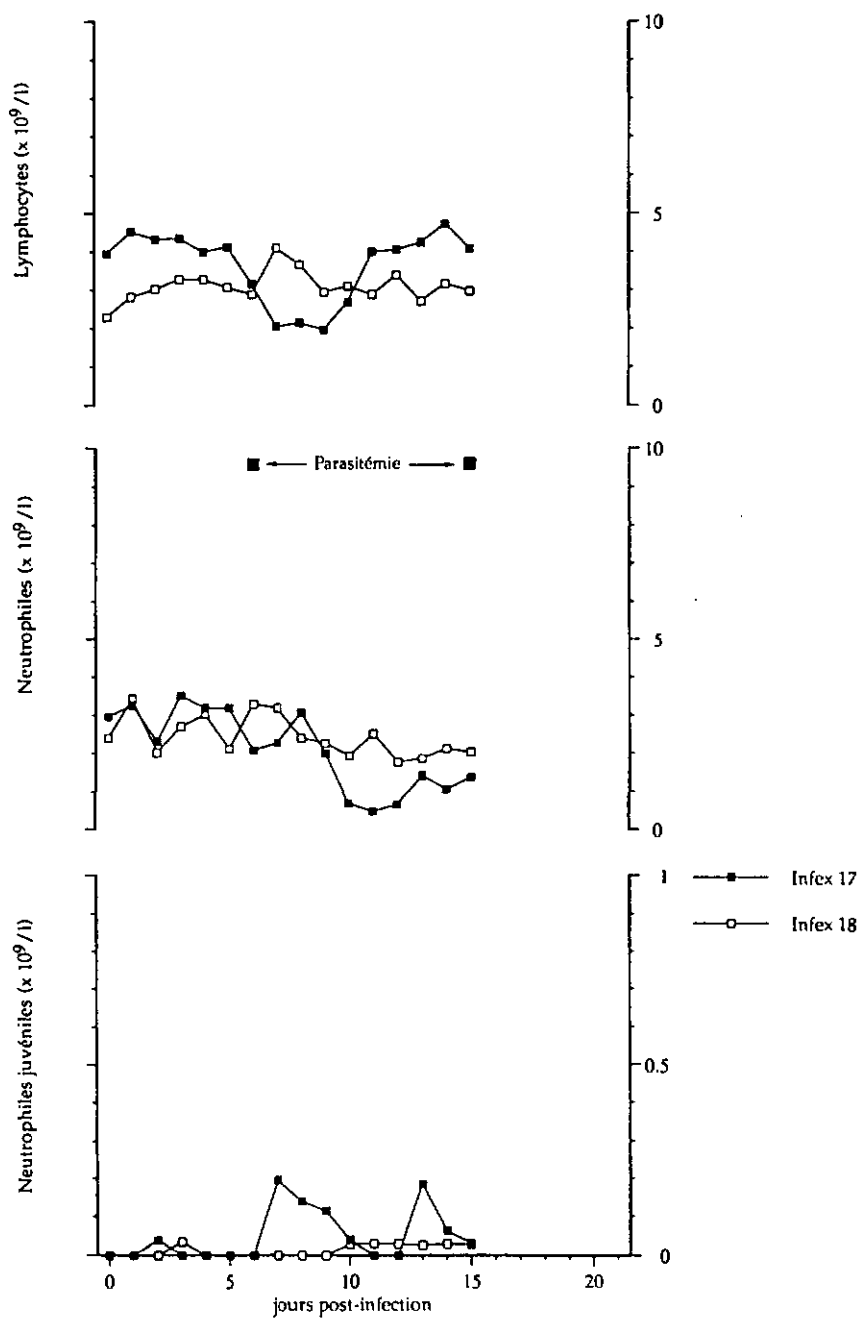


Fig. 28. Infex 17 et 18: Evolution des lymphocytes, des neutrophiles et des neutrophiles juvéniles

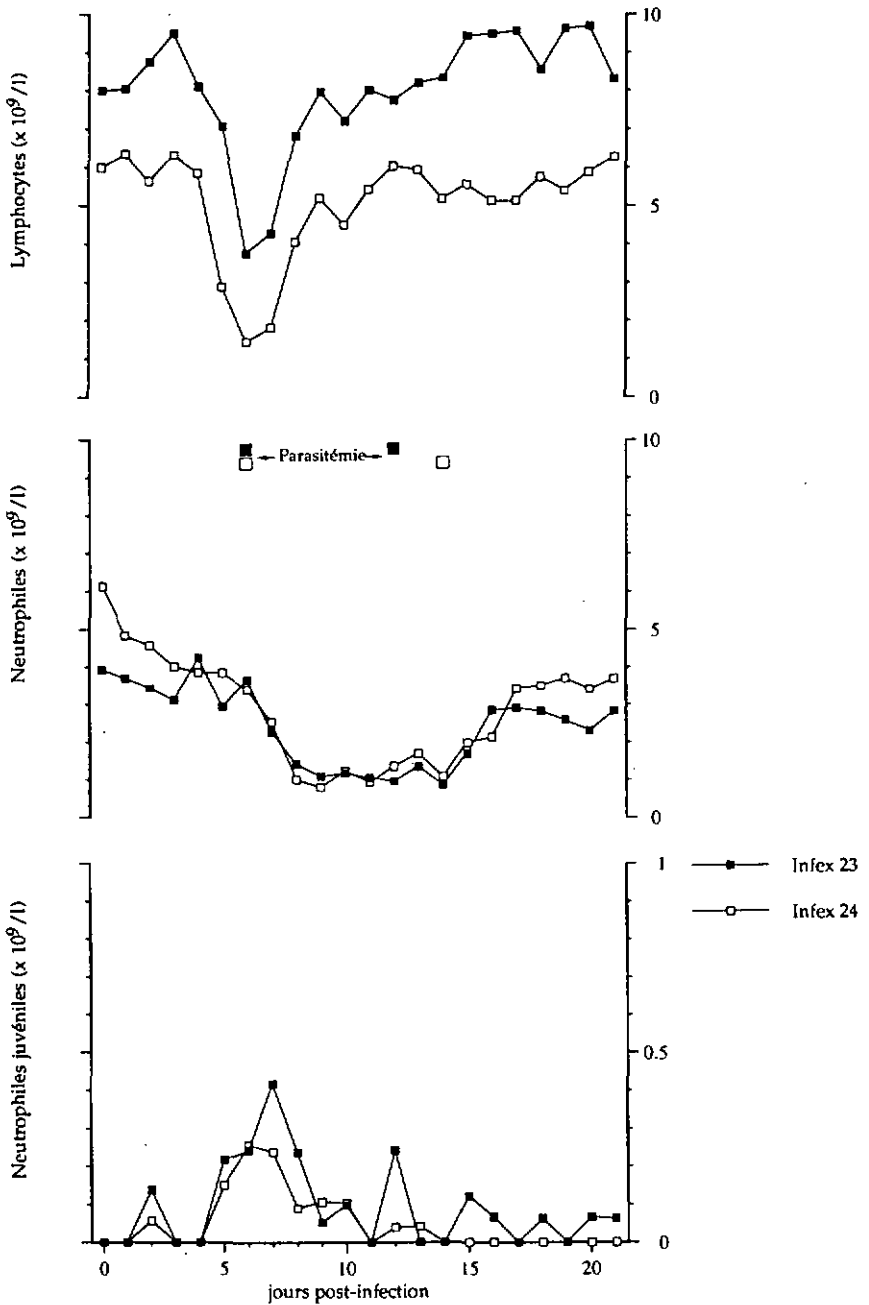


Fig. 29. Infix 23 et 24: Evolution des lymphocytes, des neutrophiles et des neutrophiles juvéniles

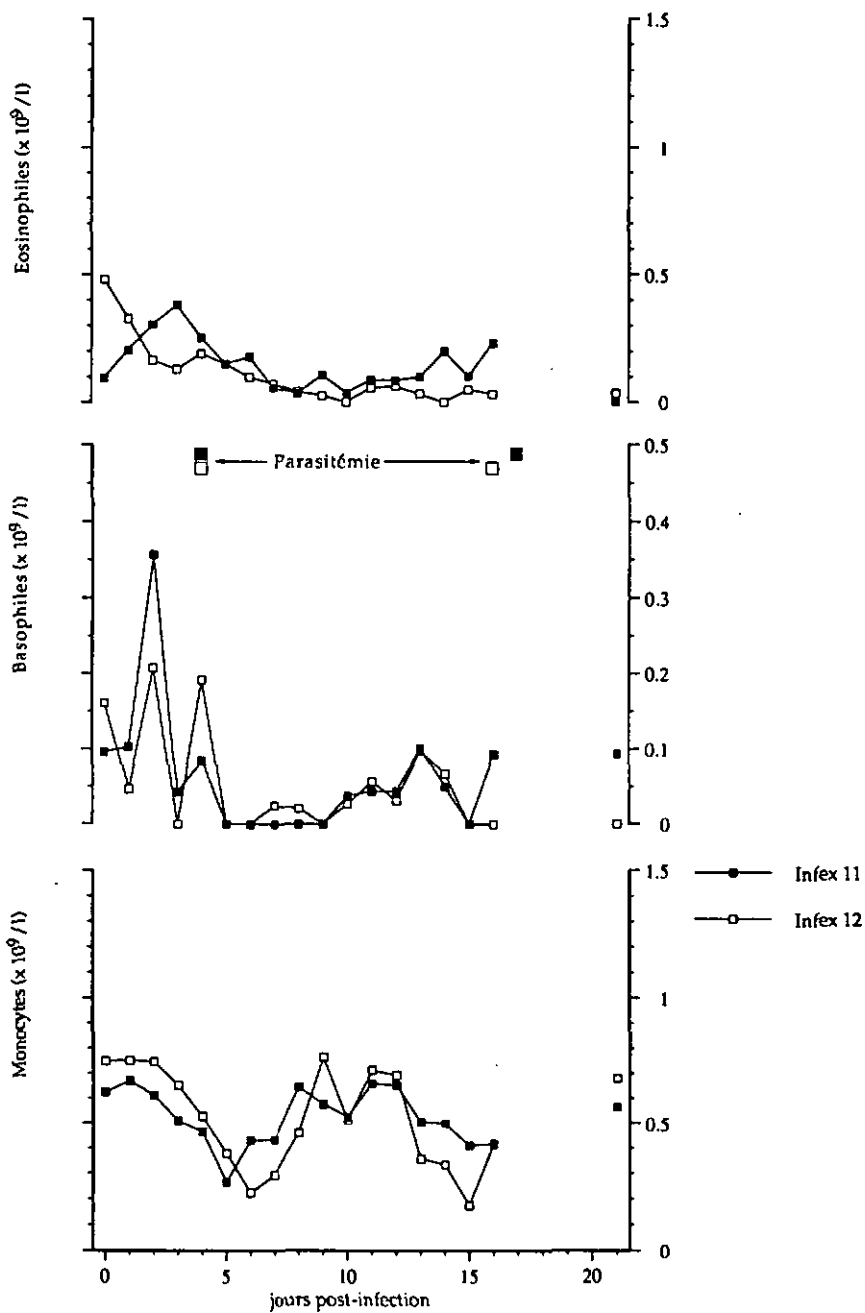


Fig. 30. Infex 11 et 12: Evolution des éosinophiles, des basophiles et des monocytes

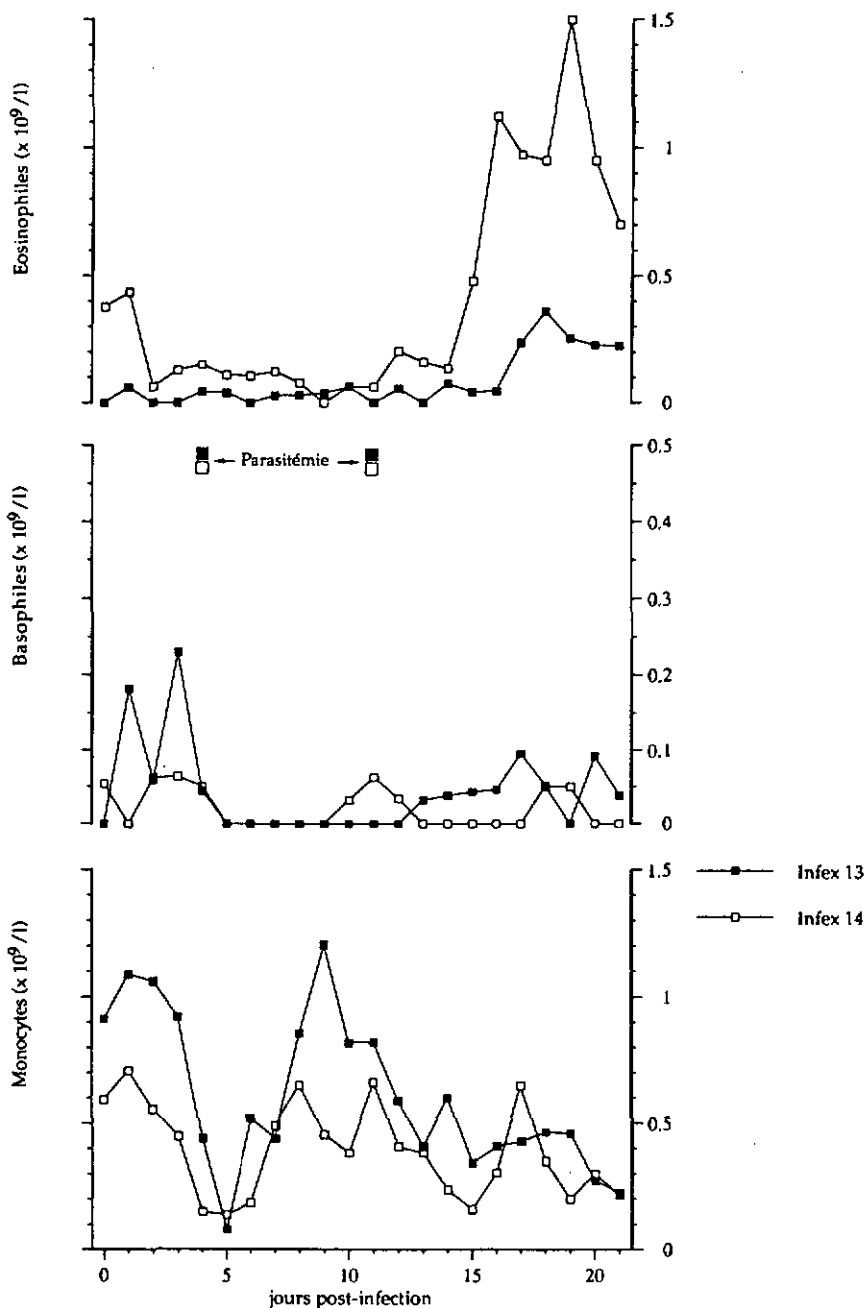


Fig. 31. Infex 13 et 14: Evolution des éosinophiles, des basophiles et des monocytes

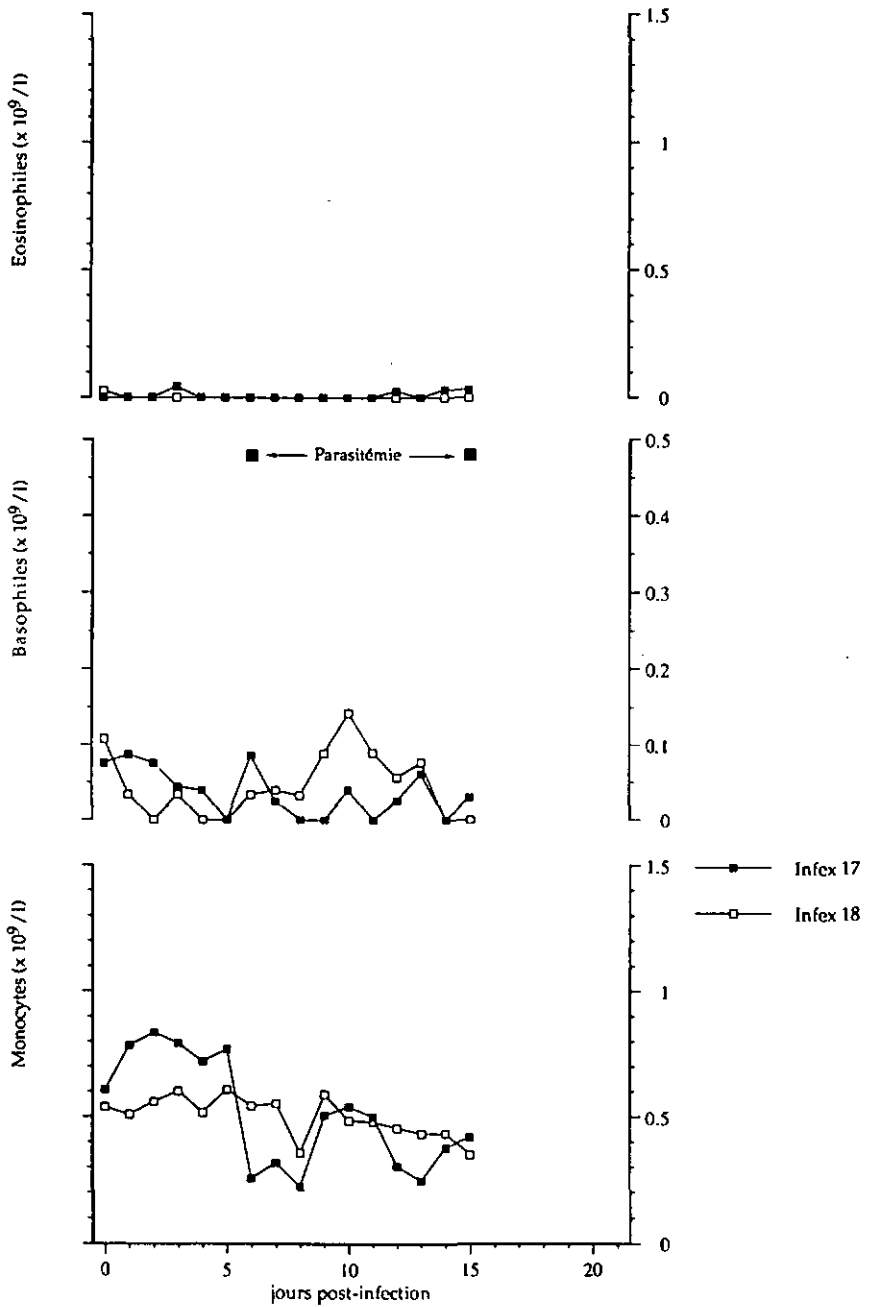


Fig. 32. Infx 17 et 18: Evolution des éosinophiles, des basophiles et des monocytes

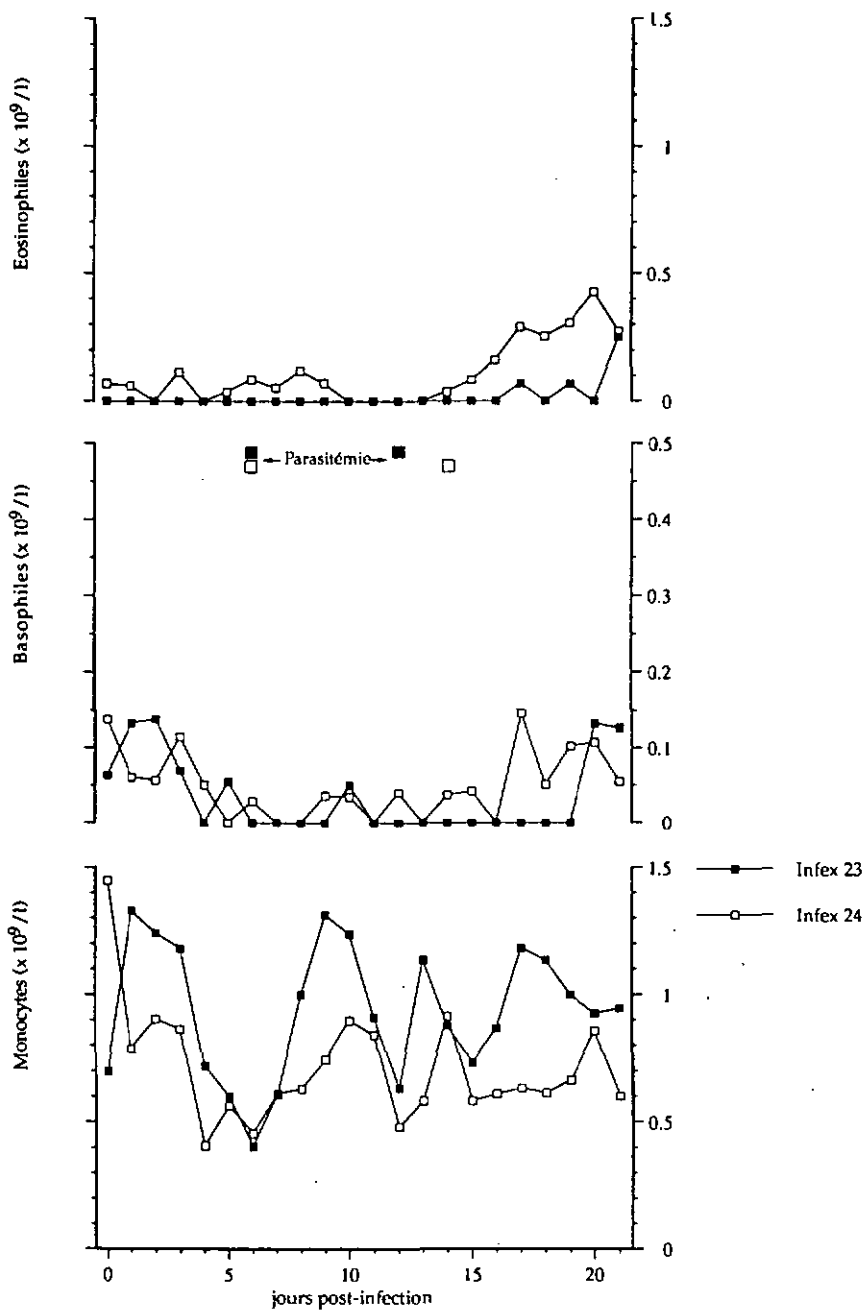


Fig. 33. Infix 23 et 24: Evolution des éosinophiles, des basophiles et des monocytes

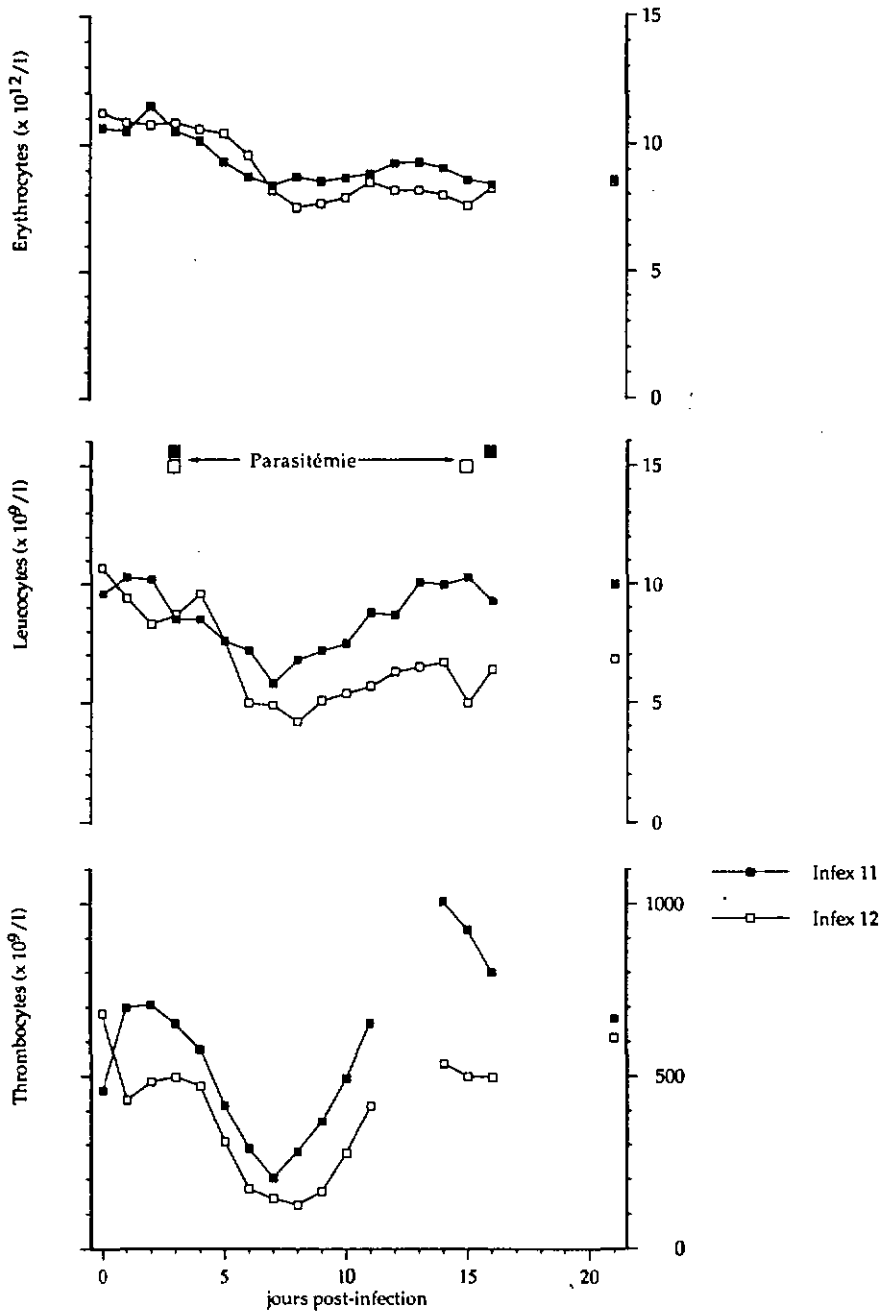


Fig. 34. Infx 11 et 12: Evolution des érythrocytes, des leucocytes et des thrombocytes

Rem.: certains jours, la numérotation des thrombocytes n'a pu être effectuée

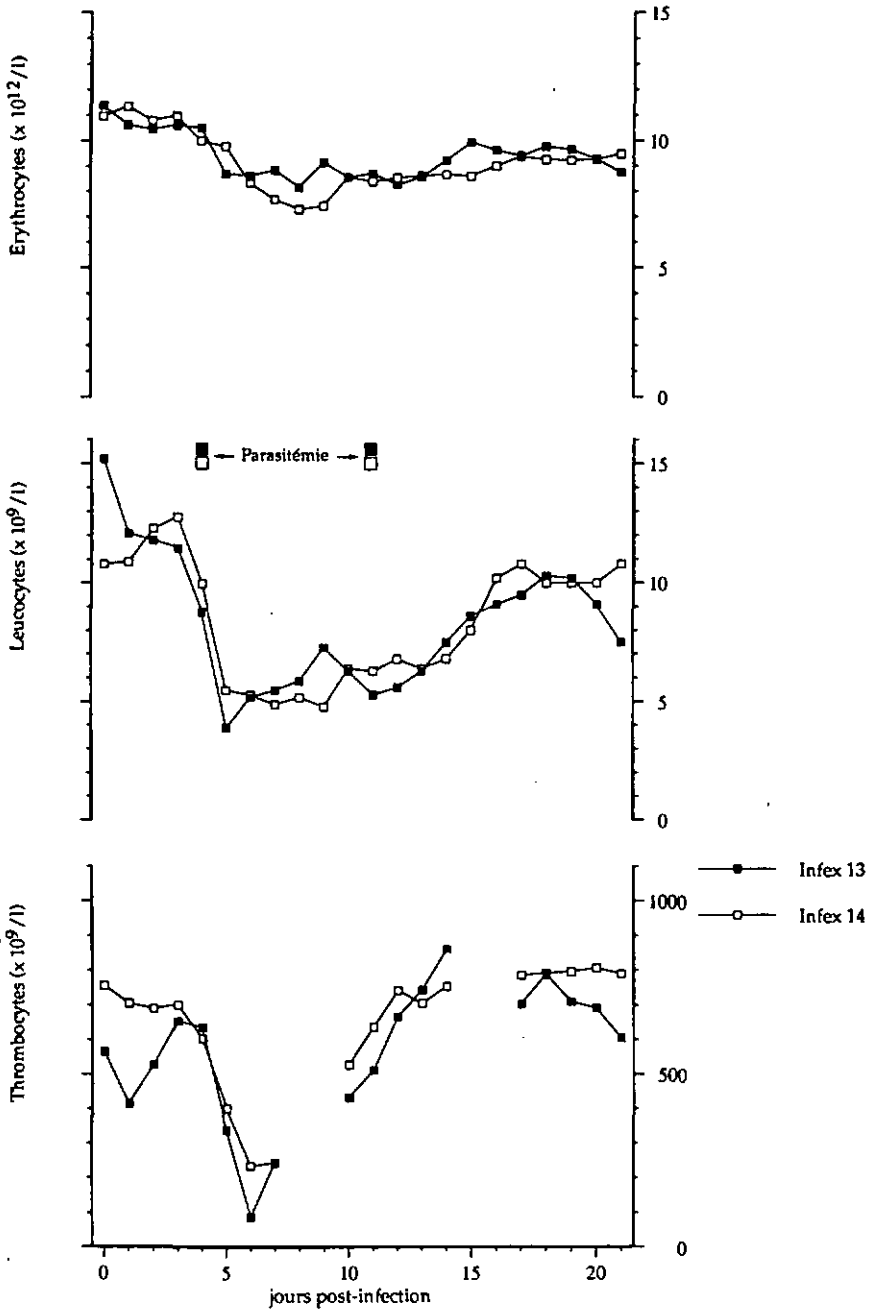


Fig. 35. Infx 13 et 14: Evolution des érythrocytes, des leucocytes et des thrombocytes

Rem.: certains jours, la numérotation des thrombocytes n'a pu être effectuée

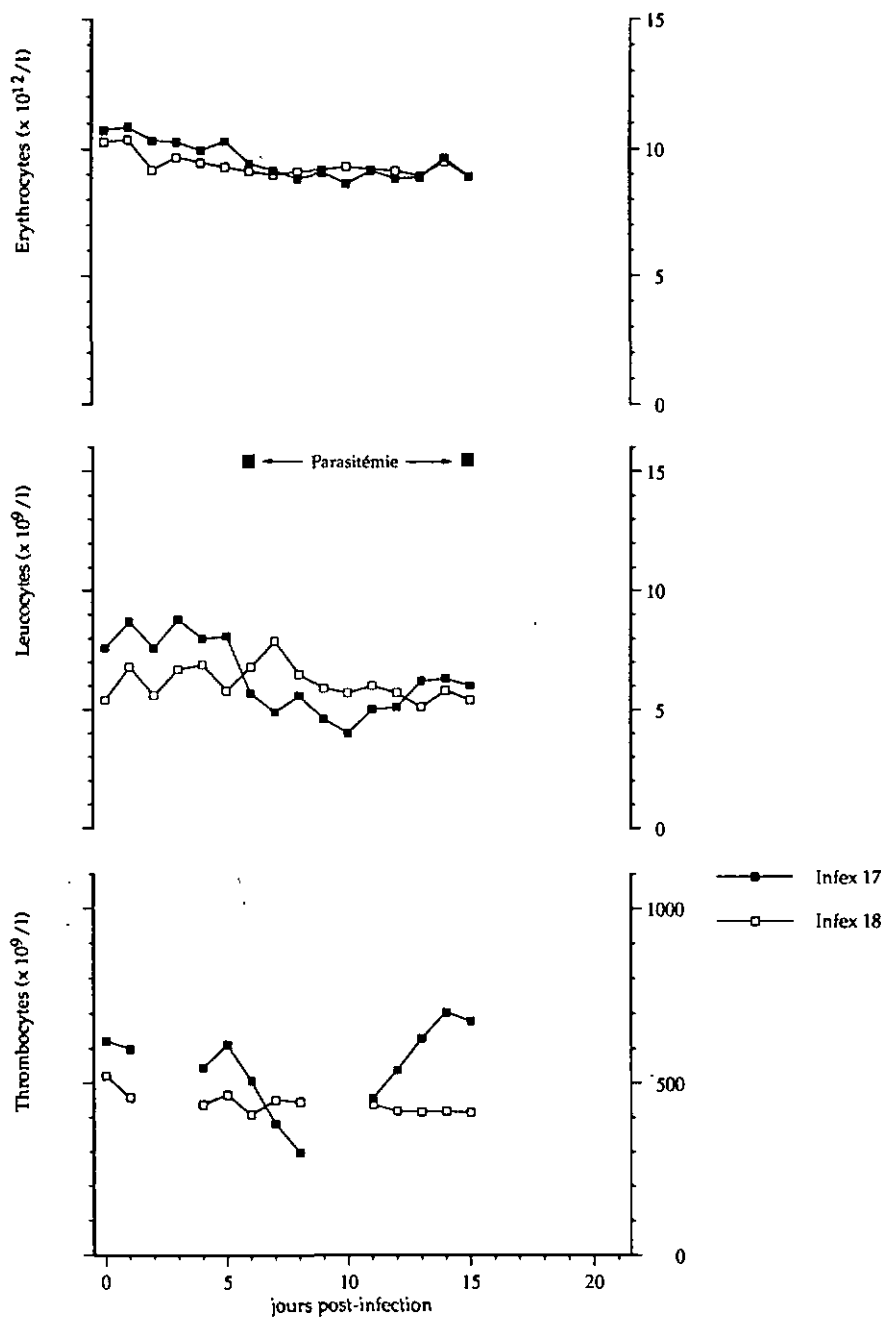


Fig. 36. Infex 17 et 18: Evolution des érythrocytes, des leucocytes et des thrombocytes

Rcm.: certains jours, la numérotation des thrombocytes n'a pu être effectuée

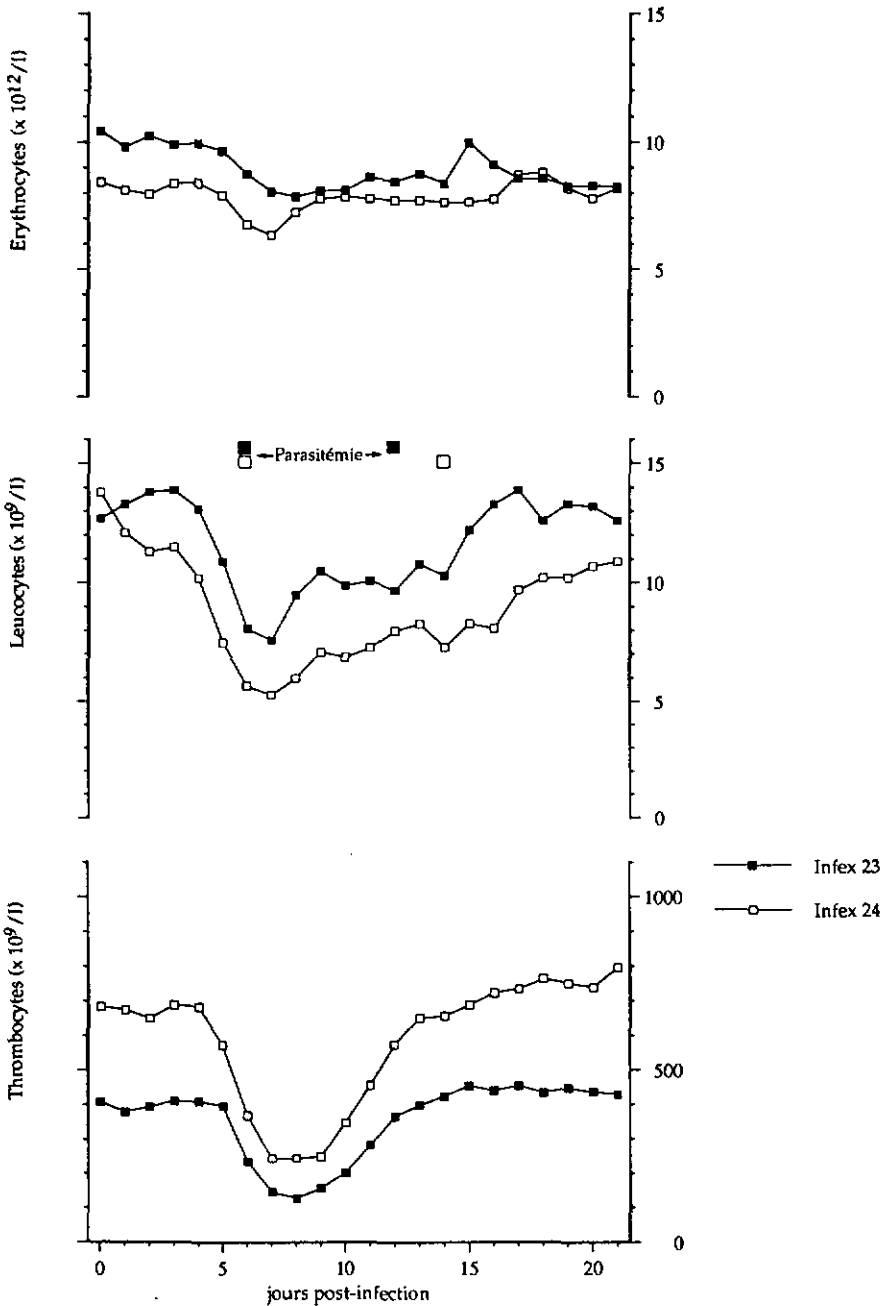


Fig. 37. Infix 23 et 24: Evolution des érythrocytes, des leucocytes et des thrombocytes

5. 5. 2. Discussion

Dans nos infections expérimentales, l'inoculation de souches suisses d' *E. phagocytophila* a provoqué chez sept veaux une fièvre de pâture. Chez ces animaux, la présence des agents responsables dans le sang, uniquement dans les neutrophiles, a été dévoilée par une brusque hyperthermie et des altérations hématologiques significatives. Ces changements affectent le nombre des cellules et touchent les leucocytes, les thrombocytes et les érythrocytes.

Au niveau hématologique, on remarque une diminution du nombre des leucocytes coïncidant avec le début de la phase fébrile ou parfois le précédant. Cette baisse des globules blancs totaux est d'abord provoquée par une réduction du nombre des lymphocytes, qui précède celle des neutrophiles. Lorsque la température redevient progressivement normale, le nombre des lymphocytes augmente, tandis que celui des neutrophiles continue à baisser. La diminution des lymphocytes est compensée par une augmentation relative des neutrophiles circulants, provoquant chez certains animaux, des neutrophilies. De la même façon, lorsque les neutrophiles atteignent leurs seuils les plus bas, le pourcentage des lymphocytes s'accroît, produisant des lymphocytoses relatives, sans entraîner néanmoins un accroissement du nombre absolu des lymphocytes. Des valeurs anormalement élevées de neutrophiles juvéniles apparaissent au cours de l'infection. Cet afflux de cellules, arrivant du compartiment marginal, survient lorsque les neutrophilies sont détectées, puis au retour des neutrophiles matures vers des valeurs normales. Des lymphocytopénies et des neutropénies sont décelées chez les animaux.

En règle générale, les résultats obtenus correspondent à ceux décrits auparavant chez des animaux, entiers ou splénectomisés, infectés naturellement ou expérimentalement: bovins (Hudson, 1950; Tuomi, 1967a; Foster et Cameron, 1968b; Collins *et al.*, 1970; Purnell *et al.*, 1976a, 1977; Purnell et Brocklesby, 1978; Taylor et Kenny, 1980; Cranwell et Gibbons, 1986), ovins (Taylor *et al.*, 1941; Foggie, 1956, 1957; Juste *et al.*, 1986) et caprins (van Miert *et al.*, 1984).

Les mécanismes par lesquels *E. phagocytophila* provoque ces leucopénies ne sont pas clairement démontrés. Les premières recherches proposèrent comme causes

responsables une aplasie médullaire (Taylor *et al.*, 1941; Greig *et al.*, 1977) ou simplement une destruction des cellules infectées (Hudson, 1950). Des études plus récentes ont montrés que des moutons atteints de fièvre de pâture, et traités par des corticostéroïdes, présentent une quantité importante de neutrophiles juvéniles, au moment même où la parasitémie diminue (Woldehiwet et Scott, 1982c). Cette dernière constatation, concordant avec nos propres résultats et ceux de Streit (1993), suggérerait que les cellules ne sont pas infectées avant leur arrivée dans le sang périphérique et qu'il n'y a donc pas d'aplasie médullaire.

La présence des agents infectieux pendant une phase fébrile et l'altération du nombre des leucocytes sont également des signes hématologiques fréquemment rencontrés chez d'autres infections provoquées par *E. canis* (Buhles *et al.*, 1974; Kuehn et Gaunt, 1984), *E. risticii* (Holland *et al.*, 1985b), *E. equi* (Gribble, 1969; Stannard *et al.*, 1969), *E. ondiri* (Danskin et Burin, 1963) et l'agent responsable de l'ehrlichiose humaine américaine (Eng *et al.*, 1988), ultérieurement appelé *E. chaffeensis* (Anderson *et al.*, 1991).

Dans nos expériences, aucun effet de l'infection n'a été observé sur le nombre des basophiles et des éosinophiles. Par contre, une baisse des monocytes semble coïncider avec l'apparition d' *E. phagocytophila* dans le sang.

Pour Tuomi (1967a), les éosinophiles semblent être autant affectés que les neutrophiles chez des bovins expérimentalement infectés. Hudson (1950) et Tuomi (1967a) observent une chute du nombre des monocytes; l'un, trois à quatre jours après l'apparition d' *E. phagocytophila*, l'autre, vers la fin de la réaction clinique et durant quatre jours. Comme nous, Tuomi (1967a) signale aussi des valeurs monocytaires très élevées chez d'autres bovins.

Purnell *et al.*, (1977) ont également observé, vers les 6ème ou 7ème jours, une baisse des monocytes chez des moutons inoculés.

Le nombre des thrombocytes varie également au cours des infections expérimentales. A la différences des neutrophiles et des lymphocytes, la baisse des

thrombocytes est passagère et les valeurs initiales sont atteintes avant la fin des expériences.

Des diminutions importantes des thrombocytes ont été décrites par Foster et Cameron (1968b) et sont partiellement associées à des entérites hémorragiques chez des moutons expérimentalement infectés (Foster *et al.*, 1968).

Si les leucopénies sont des signes hématologiques importants caractéristiques des ehrlichioses, les thrombocytopénies prédominent dans les infections à *E. equi* (Gribble, 1969; Stannard *et al.*, 1969), *E. platys* (Harvey *et al.*, 1978), *E. ondiri* (Danskin et Burin, 1963) et *E. canis* (Buhles *et al.*, 1974; Kuehn et Gaunt, 1984).

Malgré qu'il y ait une stimulation de la production des plaquettes sanguines, provoquée par la thrombocytopénie, au niveau de la moelle osseuse, une destruction précoce des nouvelles cellules formées, surtout au niveau de la rate, empêche l'accumulation des plaquettes sanguines dans la circulation (Smith *et al.*, 1975).

Chez les chiens atteints d'ehrlichiose, ces thrombocytopénies seraient dues à une destruction périphérique d'origine immunologique (Kakoma *et al.*, 1978, 1980). Lorsque les monocytes sont infectés par *E. canis*, les lymphocytes B activés se différencient en plasmocytes produisant des anticorps spécifiques et un facteur inhibant la migration plaquettaire (immunoglobuline G différente des anticorps spécifiques anti-*E. canis*). Ce facteur agit sur les thrombocytes en inhibant la formation des pseudopodes et en accélérant leur agrégation. Les lymphocytes T activés se différencient en cellules effectrices capables de détruire les monocytes infectés et les thrombocytes. Ces mécanismes visant à détruire *E. canis* contribuent à la pathogénie de la pancytopenie tropicale canine aiguë, mais par contre n'éliminent pas complètement l'agent étiologique. L'évolution se fait vers un état d'équilibre entre un hôte immunocompétent et l'agent virulent.

L'atteinte par *E. phagocytophila* de cellules jouant un rôle primordial dans la défense de l'animal prédispose celui-ci à d'autres infections secondaires, bactériennes ou virales.

En fait, le rôle immunosuppresseur d' *E. phagocytophila* est un fait admis depuis longtemps (Foggie, 1951). Ce n'est que plus tard que des études sur des infections mixtes et sur les fonctions leucocytaires, menées essentiellement sur des moutons, ont tenté d'expliquer les mécanismes responsables de cette immunosuppression.

L'inhibition de la réponse immunitaire humorale contre certains antigènes, comme le virus de la parainfluenza ou le vaccin clostridial (Batungbacal et Scott, 1982b, 1982c), est attribuée à la réduction du nombre des lymphocytes B circulants, lymphocytes les plus touchés lors des lymphocytopénies induites par *E. phagocytophila* (Batungbacal *et al.*, 1982a). Pour leur part, Brodie *et al.* (1982), vaccinèrent des moutons contre la louping-ill, pendant une infection à *E. phagocytophila*, pour mesurer les effets de l'ehrlichiose sur la capacité des moutons à développer une réponse humorale. La production d'anticorps, détectés par hémagglutination, démontra que la fièvre de pâture n'avait aucun effet inhibiteur sur la réponse immunitaire humorale.

D'après Foggie (1956, 1957), la prédisposition aux infections à staphylocoques chez les jeunes moutons serait due à la diminution de l'action bactériostatique, provoquée par la sévère réduction des granulocytes circulants. C'est pourquoi, il remarqua que la pyémie à tiques était plus sévère durant la période de neutropénie. Les travaux de Woldehiwet (1987a) renforcent ceux de Foggie (1956, 1957). Les granulocytes infectés avec *E. phagocytophila* ont une capacité réduite à phagocyter et à tuer les staphylocoques.

Les conclusions de Woldehiwet (1987a) sont en accord avec les travaux de Foster et Cameron (1970b) qui ont remarqué que l'intégrité fonctionnelle des neutrophiles est inhibée. La diapédèse des neutrophiles est significativement diminuée. De même, Woldehiwet et Scott (1982e) constatèrent que la migration *in vitro* des leucocytes infectés chez des ovins était sévèrement réduite. Des études similaires, menées avec des lymphocytes de moutons infectés, ont montré que la réponse à certains mitogènes (phytohémagglutinine et lipopolysaccharide d' *Escherichia coli*) est significativement diminuée (Woldehiwet, 1987b).

Chez les *Ehrlichiae*, mis à part *E. phagocytophila*, des immunosuppressions sont également associées aux infections provoquées par *E. risticii* chez les chevaux (Rikihisa, 1991).

Tuomi (1967a), Purnell *et al.* (1977), Taylor et Kenny (1980) décrivent, également chez des bovins, une légère baisse des érythrocytes, accompagnée simultanément d'une diminution de l'hématocrite et de l'hémoglobine. Des résultats similaires ont

été constatés chez des moutons (Taylor *et al.*, 1941) et des chèvres (van Miert *et al.*, 1984).

E. phagocytophila a une préférence certaine pour les neutrophiles, les fortes parasitémies relevées dans nos expériences l'attestent; Foggie (1951) mentionne 95 % de neutrophiles infectés chez un mouton et Tuomi (1965) 90 % chez un bovin. Hudson (1950), Tuomi (1967a) et Purnell *et al.* (1976a, 1978) indiquent également des invasions secondaires de monocytes succédant à celles des neutrophiles. Le fait de n'avoir pas rencontré d'éosinophiles ou de monocytes infectés par *E. phagocytophila* peut être simplement dû à la faible participation de ces cellules dans la formule leucocytaire. D'autre part, la circulation périphérique, comparée au compartiment tissulaire, renferme une petite partie des monocytes et une infime fraction des éosinophiles totaux.

D'après Purnell et Brocklesby (1978), certaines souches bovines d' *E. phagocytophila* sont très pathogènes et causent des infections mortelles aussi bien chez des animaux entiers que splénectomisés. Sur les quatre veaux infectés par Purnell et Brocklesby (1978), un animal splénectomisé ainsi qu'un animal entier, sont décédés aux 15^{ème} et 17^{ème} jours après l'inoculation. Ces souches virulentes se distinguent également des autres souches bovines par leur aptitude à envahir un nombre élevé de monocytes. Les auteurs relèvent des parasitémies de 10 à 24 % pour ces cellules.

Tuomi (1967a) a remarqué que les veaux splénectomisés infectés expérimentalement réagissaient plus fortement que les autres animaux entiers de même âge. Les splénectomies et des doses immunosuppressives de corticostéroïdes (Foggie, 1951; Foggie et Hood, 1961; Woldehiwet et Scott, 1982c) sont également responsables de récurrences d'infections à *E. phagocytophila*.

Foggie (1951) fut le premier à indiquer l'existence de souches ovines se différenciant par leur virulence. Des souches bovines, se distinguant par la sévérité de la réaction fébrile, la persistance d' *E. phagocytophila* dans le sang, la durée de la période d'incubation (Tuomi, 1967b), et des souches ovines, par leur degré de neutropénie (Foster et Cameron, 1970a), furent décrites par la suite. La virulence chez une infection parfois bénigne comme la fièvre de pâture, est difficilement quantifiable. Certains paramètres, telle que la durée de la période fébrile, peuvent

également être influencés par des infections secondaires opportunistes (Foster et Cameron, 1970a).

Si toutes les infections expérimentales, mise à part l'infex 18, ont provoqué chez les veaux des manifestations adhérent à un même schéma, on peut souligner, malgré tout, certaines variations d'un animal à l'autre.

L'origine des inoculums et la résistance naturelle des animaux ne semblent pas être responsables de ces variations; les symptômes hématologiques, la parasitémie et la courbe de température concordent pour les infex 11 et 12 (inoculums de provenances différentes), ainsi que pour les autres couples d'infex (13-14 et 23-24) (inoculums identiques).

Les constatations sur la variation de la température et de la parasitémie pourraient nous faire croire que les passages répétés ou une longue conservation, sans cryoprotecteur, pourraient atténuer la virulence d' *E. phagocytophila*. Il a été démontré chez *E. canis* (Huxsoll, 1976) et *E. ondiri* (Danskin et Burdin, 1963) que le maintien d'un isolat, par des passages répétés en laboratoire chez l'hôte naturel, peut altérer sa virulence.

Néanmoins, le nombre restreint de veaux infectés ne nous permet pas de savoir si ces altérations observées sont causées par l'animal, l'inoculum utilisé, ou sont le fait d'autres facteurs.

6. CONCLUSIONS

La fièvre de pâture a toujours été étroitement liée à la présence massive de tiques sur les bovins. Mais il faut attendre la fin des années 1980 pour qu' *E. phagocytophila* soit identifié comme l'agent responsable de l'infection en Suisse (Pfister *et al.*, 1987).

Au début de ces recherches, et d'après les informations que nous possédions, se limitant à l'expérience que les vétérinaires ou les éleveurs de bétail avaient du tableau clinique de l'infection, la fièvre de pâture était uniquement connue chez les bovins de l'ouest de l'Oberland bernois.

La présente étude a d'abord montré que la répartition géographique ne se confinait pas uniquement à l'Oberland bernois, mais que d'autres régions dans les cantons de Berne, Vaud, Valais, Neuchâtel et Soleure, étaient également touchées par la maladie (Liz et Pfister, 1989; Liz *et al.*, 1991). Plus tard, de nouvelles infections ont été confirmées, par la détection de l'agent responsable dans le sang d'animaux provenant du Tessin, de Saint-Gall et de Vaud (Pfister 1993, comm. pers.). Ces cas récents font fortement penser que cette distribution n'est pas exhaustive et que de nouveaux foyers apparaîtront dans le futur, aussi bien chez les bovins que chez les petits ruminants.

Cependant, les cas diagnostiqués les plus nombreux proviennent de la zone endémique historiquement la plus ancienne. Dans l'ouest de l'Oberland bernois, la distribution annuelle des cas d'infection révèle sans conteste la relation qui unit *E. phagocytophila* à *I. ricinus*. La dynamique de l'apparition de la fièvre de pâture chez les bovins durant l'année correspond en tout point à l'activité saisonnière des tiques. En outre, les régions où sévit la fièvre de pâture sont réputées pour être des zones où *I. ricinus* parasite fréquemment le bétail bovin, suggérant ainsi le rôle de vecteur potentiel joué par cette tique.

L'enquête sérologique au sein du cheptel bovin autochtone, mené entre septembre 1988 et décembre 1989, a démontré certains aspects que l'on peut souligner.

En octobre, lorsque les animaux rentrent dans les étables pour passer l'hiver, 48.6 % d'entre-eux possèdent des anticorps IgG contre *E. phagocytophila*. Cette séroprévalence est due aux contacts répétés, durant l'année, des animaux avec les tiques. Suivant la classe d'âge, 38.5 à 73.7 % des bovins ont des anticorps. Durant

l'hivernage, la séroprévalence chute et atteint, au printemps lorsque les troupeaux sortent, 8.1 %. A ce moment de l'année, et quelle que soit la classe d'âge considérée, les séroprévalences ne sont pas significativement différentes (3 à 10.2 %). La diminution des titres d'anticorps IgG spécifiques, entre le début et la fin de l'hivernage, est certainement due à la dégradation naturelle des anticorps, pendant ces six à sept mois où les bovins ne subissent pas de stimulation antigénique par les tiques. L'évolution des anticorps chez sept bovins infectés par *E. phagocytophila* a montré une cinétique typique d'anticorps IgG spécifiques. Les anticorps ne persistent pas longtemps. Le titre moyen maximum est atteint le deuxième mois, diminue dès le mois suivant et devient négatif le quatrième mois après la déclaration de l'infection.

Les bovins les plus âgés (> 2 ans), malgré des contacts répétés depuis plusieurs années avec l'agent pathogène, ne présentent pas des titres d'anticorps mensuels plus élevés que les jeunes animaux; en octobre, les titres sont même significativement inférieurs. Il est possible que des phénomènes d'immunosuppression induit par *E. phagocytophila* soient responsables de cette faible production d'anticorps chez des animaux qui sont chroniquement stimulés.

La transmission par le colostrum d'anticorps IgG anti-*E. phagocytophila* entre la mère et son veau a été démontrée. En suivant l'évolution des anticorps colostraux, nous avons constaté qu'ils sont rapidement catabolisés et qu'ils sont absents lorsque les jeunes animaux, nés en automne ou en hiver, sont mis en contact avec les tiques infectées. A ce moment, les faibles titres d'anticorps détectés confirment qu'il n'y a pas de restimulation chez les veaux. On peut conclure que ces anticorps ne peuvent donc pas participer à la protection de l'animal contre l'infection.

Même s'il n'était pas possible de mettre en évidence *E. phagocytophila* chez les *I. ricinus* récoltées dans la nature, certains indices s'associent pour impliquer indirectement cette tique dans la transmission de l'infection en Suisse. *I. ricinus* est la tique la plus abondante dans notre pays et parasite très fréquemment les bovins (Aeschlimann, 1972). En plus des similitudes dans les distributions géographique et saisonnière mentionnées auparavant, l'isolation par des tests IFI d'*E. phagocytophila* dans des tiques, qui se sont nourries sur des veaux expérimentalement infectés, démontre bien que la transmission entre l'hôte et le vecteur est possible. Le taux d'infection des tiques dans la nature est peut être très faible; la détection

d' *E. phagocytophila* par des tests IFI est alors difficile. Une explication plausible pour un tel phénomène serait qu'un gorgement partiel est nécessaire pour déclencher la multiplication des rickettsies dans les tissus des tiques; comme les expériences de Smith *et al.* (1976) l'ont démontré avec *E. canis* et son vecteur, *R. sanguineus*.

A la suite de nos observations, les ruminants sauvages, et plus particulièrement les chevreuils, sont des réservoirs potentiels pour *E. phagocytophila*. Dans les infections véhiculées par des tiques, une population d'hôte est considérée comme réservoir lorsqu'elle remplit certaines conditions (Mather *et al.*, 1989): être relativement abondante, servir d'hôte à un grand nombre de vecteurs, héberger, puis transmettre l'agent pathogène aux vecteurs. Si le chevreuil, et à un moindre degré le chamois en raison de son domaine vital, satisfont aux deux premières exigences, nos résultats ne confirment pas les deux dernières. Le fait de détecter des titres élevés d'anticorps IgG spécifiques chez ces animaux ne permet pas de conclure qu'ils hébergent habituellement l'agent pathogène. Vu le nombre restreint d'animaux abattus (n=172), la probabilité de rencontrer un chevreuil ou un chamois au moment de la phase aiguë de l'infection, période où *E. phagocytophila* s'observe dans le sang, est minime. Il faut néanmoins relever que dans le sud de l'Angleterre, le sang de chevreuil a été décrit, après transfusion sanguine, comme infectieux chez des moutons (McDiarmid, 1965). Les résultats sérologiques obtenus chez les rongeurs, par contre, ne permettent pas de tirer des conclusions significatives sur le rôle des micromammifères dans le cycle épidémiologique de l'infection.

Nous avons pu reproduire expérimentalement des fièvres de pâture à partir d'échantillons sanguins de bovins naturellement infectés. Ces expériences ont été, une source d'antigène, d'immun-sérums et de sang infectieux pour les tests sérologiques. Elles ont permis également d'isoler l'agent infectieux et de mettre en évidence les altérations hématologiques provoqués par *E. phagocytophila*. Ces changements, accompagnés de fièvre, affectent principalement le nombre des leucocytes, en particulier des neutrophiles et des lymphocytes, et des thrombocytes.

7. RESUME

L'objectif principal de ce travail était d'apporter des éléments nouveaux d'ordre épidémiologique, sérologique et hématologique sur *E. phagocytophila*, responsable de la fièvre de pâture chez les bovins en Suisse.

- Entre 1988 et 1990, 269 prélèvements sanguins provenant de bovins originaires de cinq cantons (Berne, Neuchâtel, Soleure, Valais et Vaud), et qui présentaient des signes cliniques de l'infection, ont été analysés afin de mettre directement en évidence *E. phagocytophila*. L'examen des frottis a permis de diagnostiquer 143 cas de fièvre de pâture.

- L'ouest de l'Oberland bernois est la région en Suisse qui possède le nombre le plus élevé de cas diagnostiqués (73.4 %). Les infections à *E. phagocytophila* apparaissent en deux vagues annuelles, une au printemps, dès le mois de mai, et une autre, de moindre importance, en automne. Cette répartition particulière correspond à l'activité saisonnière d'*I. ricinus*. Dans cette région, comme dans les autres régions où sévit l'infection, le mois de juin est la période de l'année où les cas de fièvre de pâture sont les plus nombreux.

Entre septembre 1988 et décembre 1989, nous avons mené une enquête sérologique (IFI) au sein du cheptel bovin autochtone. Plus de 2500 prises de sang ont été effectuées dans 24 exploitations. En octobre, lors de la rentrée des animaux dans les étables, la séroprévalence est de 48.6 % (titres $\geq 1:40$). Pendant les mois d'hivernage, les titres d'anticorps IgG spécifiques chutent et en d'avril, juste avant la sortie vers les pâturages, 8.1 % des animaux sont séropositifs. Un mois plus tard, la séroprévalence augmente (25.1 %) et atteint son maximum annuel en septembre (47.9 %).

Pour étudier l'influence de l'âge sur les titres d'anticorps, nous avons réparti les bovins en trois classe d'âge. A la fin de l'hivernage les trois classes se trouvent avec des séroprévalences ne se différenciant pas significativement les unes des autres. En mai, l'arrivée des animaux sur les pâturages se répercute sur les titres d'anticorps. C'est parmi les animaux débutant leur deuxième année de pâturage, que la stimulation antigénique provoque la plus forte réaction sérologique. Ensuite, si aux mois d'août et septembre, les trois classes ne se différencient pas significativement

entre elles, aux mois d'octobre et de décembre par contre, la séroprévalence et les titres d'anticorps sont inférieurs chez les bovins les plus âgés.

Pendant les mois d'hivernage 1988/89, 14.2 % des veaux qui n'ont jamais eu de contact avec l'extérieur montrent des anticorps IgG spécifiques; les titres varient de 1:160 à 1:320. On retrouve un pourcentage similaire (14,3 %) entre septembre et décembre 1989, pour des animaux nés pendant cette période. L'acquisition de ces anticorps est passive et due à l'ingestion du colostrum maternel.

Nous avons surveillé mensuellement les titres d'anticorps de sept bovins malades durant les sept mois d'hivernage suivant la déclaration de l'infection. A la première analyse, six animaux sur sept présentaient des titres d'anticorps inférieurs à 1:20. Le titre moyen maximum est atteint le 2ème mois et redevient inférieur à 1:40 dès le 4ème mois.

- les sérums de 39 chamois et de 133 chevreuils ont été analysés en IFI. Les titres d'anticorps IgG contre *E. phagocytophila* se répartissent entre < 1:5 et 1:1280 pour les chamois et jusqu'à 1:2560 pour les chevreuils; 59 % des chamois et 78.2 % des chevreuils possèdent des titres d'anticorps \geq 1:5. Lorsqu'on établit arbitrairement un seuil à un titre de 1:80, leur séroprévalence est respectivement de 36.7 % et de 60.9 %. Chez le chamois et le chevreuil, nous avons remarqué une diminution des anticorps avec l'altitude. Cette baisse est vraisemblablement en relation avec la fréquence et la densité d' *I. ricinus* dans la nature. En fixant une limite à 1000 m, 88.7 % des animaux abattus au-dessous de cette limite possèdent des titres \geq 1:5, contre 54,7 %, abattus au-dessus de 1000 m. Les titres sont également plus élevés chez les chevreuils que chez les chamois, mammifères que l'on rencontre de préférence à des altitudes supérieures.

- Les sérums de 267 rongeurs (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis* et *Clethrionomys glareolus*) capturés dans l'ouest de l'Oberland bernois ont été analysés en IFI. Les titres d'anticorps IgG anti-*E. phagocytophila* détectés, variant de < 1:5 à 1:10, ne semblent pas être significatifs.

- L'inoculation de souches suisses d' *E. phagocytophila* a provoqué chez sept veaux des altérations hématologiques. La présence des agents responsables dans le sang, uniquement dans les neutrophiles, a été dévoilée par une brusque hyperthermie et

des altérations hématologiques significatives. Ces changements affectent le nombre des cellules et touchent les leucocytes, les thrombocytes et les érythrocytes. Une diminution du nombre des leucocytes coïncide avec le début de la phase fébrile ou parfois la précède. Cette baisse des globules blancs totaux est d'abord provoquée par une réduction du nombre des lymphocytes, anticipant une diminution du nombre des neutrophiles. Des lymphocytopenies et des neutropénies sont décelées chez les animaux. Des valeurs anormalement élevées de neutrophiles immatures apparaissent au cours des infections. Le nombre des thrombocytes varie également au cours des infections, mais leur baisse est passagère. Les valeurs érythrocytaires, accompagnée simultanément par celles de l'hématocrite et de l'hémoglobine, diminuent légèrement.

- Des larves, des nymphes et des adultes d' *I. ricinus* ont pris des repas sanguins sur des veaux expérimentalement infectés. Après la mue ou l'éclosion des oeufs, *E. phagocytophila* a pu alors être détecté en IFI chez des mâles et des femelles. Aucune des larves examinées était positive. La même technique a été appliquée à 1655 *I. ricinus* non gorgées (différents stades). Les tiques proviennent de lieux connus pour être des foyers à infection pour les bovins. *E. phagocytophila* n'a jamais pu être isolé dans ces tiques. Des infections expérimentales chez deux veaux avec des injections d'organes broyés d' *I. ricinus*, provenant soit de récoltes dans la nature, soit de tiques dont les stades antérieurs ont pris un repas infectieux, ont également échoué.

8. ANNEXES**ANNEXE I** Questionnaire sur la "fièvre de pâture" chez les bovins, ovins et chèvres en Suisse

(Ce questionnaire, exemplaires en français et en allemand, est accompagné d'un texte présentant le but des recherches entreprises et un résumé sur la fièvre de pâture)

Nom du vétérinaire:
Lieu:
Téléphone:
Date:

Avez-vous déjà remarqué des cas suspects de "fièvre de pâture" (forte fièvre et/ou rétention de lait inexplicables) dans la région ?:

oui non je ne sais pas

Si oui, chez quel animal ?: bovin ovin caprin
je ne sais pas

Commune/Village:

(Ferme ou propriétaire du bétail):

Avez-vous déjà observé des tiques sur le bétail ?:

oui non je ne sais pas

Si oui: rarement souvent je ne sais pas

A quelle époque: Déc. - Mars Avril - Juin

Juillet - Sept. Oct. - Nov.

je ne sais pas

ANNEXE II Questionnaire envoyé aux chasseurs

(Ce questionnaire, exemplaires en français et en allemand, est accompagné d'un texte présentant le but des recherches entreprises et un résumé sur la fièvre de pâture en Suisse)

**ANALYSES SANGUINES
DANS LE CADRE D'UNE ETUDE
SUR LA FIEVRE DE PATURE EN SUISSE**

Rôle des ruminants sauvages dans le cycle de la maladie

QUESTIONNAIRE

Date:

Nom :

Adresse :

Téléphone :

Animal tué: chevreuil chamois cerf

Lieu:

Sexe: femelle mâle

Age: faon de l'année passée plus de 2 ans

L'animal a-t-il des tiques?: oui non

si oui, combien?:

moins de 10 entre 10 et 20 plus de 20

ANNEXE III Milieu de culture et tampons

a) Milieu de culture RPMI 1640

RPMI 1640 Medium (Gibco n° 041-02400)	90	ml
avec 25 mM Hepes Buffer et L-Glutamine		
Fecal Calf Serum (Gibco n° 011-06290)	10	ml
L-Glutamine (Gibco n° 043-05030)	1	ml
Fungizone (Gibco n° 043-05290)	0.5	ml
Penicilline/Streptomycine (Gibco n° 043-05070)	2	ml

b) Tampon SPG (saccharose-phosphate-glutamate) (pH 7.1)

saccharose	74.62	g
KH ₂ PO ₄	0.517	g
K ₂ HPO ₄	1.643	g
K-Glutamate	0.907	g

Compléter à 1 l avec H₂O dist. et ajuster le pH.

c) Tampon Glycine (pH 2.8)

Glycine	15.014	ml
NaCl	12.60	ml
HCl 2M	24	ml

Compléter à 2 l avec H₂O dist. et ajuster le pH.

d) Tampon PBS (pH 7.2)

NaCl	8.0	g
KCl	0.2	g
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	1.45	g
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0.2	g

compléter à 1 l avec H₂O dist. et ajuster le pH.

e) Tampon PBS (pH 7.4)

NaCl	8.0	g
KCl	0.2	g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1.45	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g

compléter à 1 l avec H₂O dist. et ajuster le pH.

f) Tampon PBS - lait 3 % (pH 7.4)

ajouter du lait (Rapidlait, Migros) jusqu'à une concentration finale de 3 %, à du tampon PBS pH 7.4

g) Tampon PBS - Tween Standard 0.1 % (pH 7.4)

ajouter du Tween Standard 20[®] (n° 93773 Fluka), jusqu'à une concentration finale de 0.1 %, à du tampon PBS pH 7.4

ANNEXE IV Analyse sérologique (IFI) de sérums de bovins sur des antigènes rickettsiens autres que *E. phagocytophila*

Des sérums de bovins avec des titres d'anticorps IgG contre *E. phagocytophila* allant de 1:320 à 1:5120 ont été testés en IFI sur d'autres antigènes rickettsiens: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *C. burnetti* et *R. helvetica*. A part un sérum (n° 2351) douteux au titre de 1:50 sur de l'antigène de *C. burnetti*, tous les autres sérums présentent des titres d'anticorps faibles, inférieurs à 1:25.

ANNEXE V Statistiques

a) La moyenne géométrique des titres d'anticorps (Ambroise-Thomas, 1969)

En sérologie, pour obtenir le titre moyen des anticorps mensuels, nous avons utilisé la moyenne géométrique des titres d'anticorps (G.M.R.T., " Geometrical Mean Reciprocal Titer ").

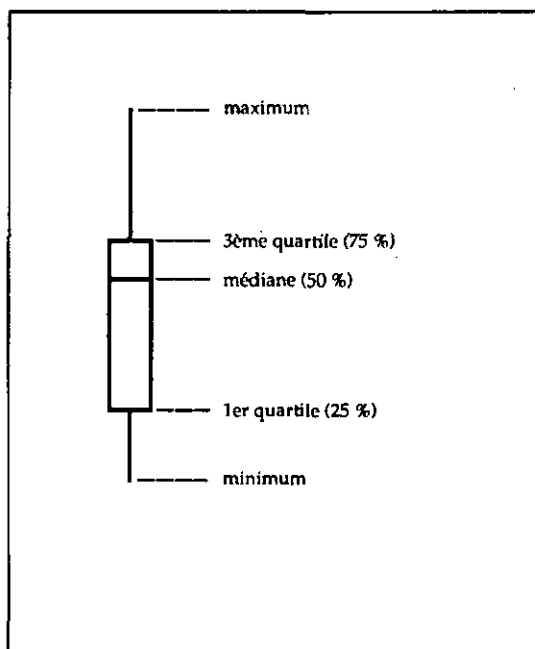


Fig. A. Exemple de "box plot"

La formule est la suivante:
$$\text{G.M.R.T.} = \text{antilog} \sum_{i=1}^N \log x_i / N$$

où x_i représente l'inverse des différents titres d'anticorps et N le nombre total d'examens.

Par convention, les titres d'anticorps qui ne sont pas définis, par exemple < 1:20, prennent la valeur de la moitié du premier titre d'anticorps défini, dans ce cas précis 1:20 et deviennent alors 1:10.

La G.M.R.T. permet de faire un rapprochement rapide entre plusieurs séries de résultats. Néanmoins, pour des questions de non normalité, il est impossible statistiquement de les comparer entre elles en utilisant un test de Student. Pour effectuer ces comparaisons, nous avons donc utilisé le test de χ^2 sur le détail de la distribution des titres d'anticorps. Dans certains cas, lorsque l'échantillon est trop petit, le test a été appliqué après regroupement des résultats.

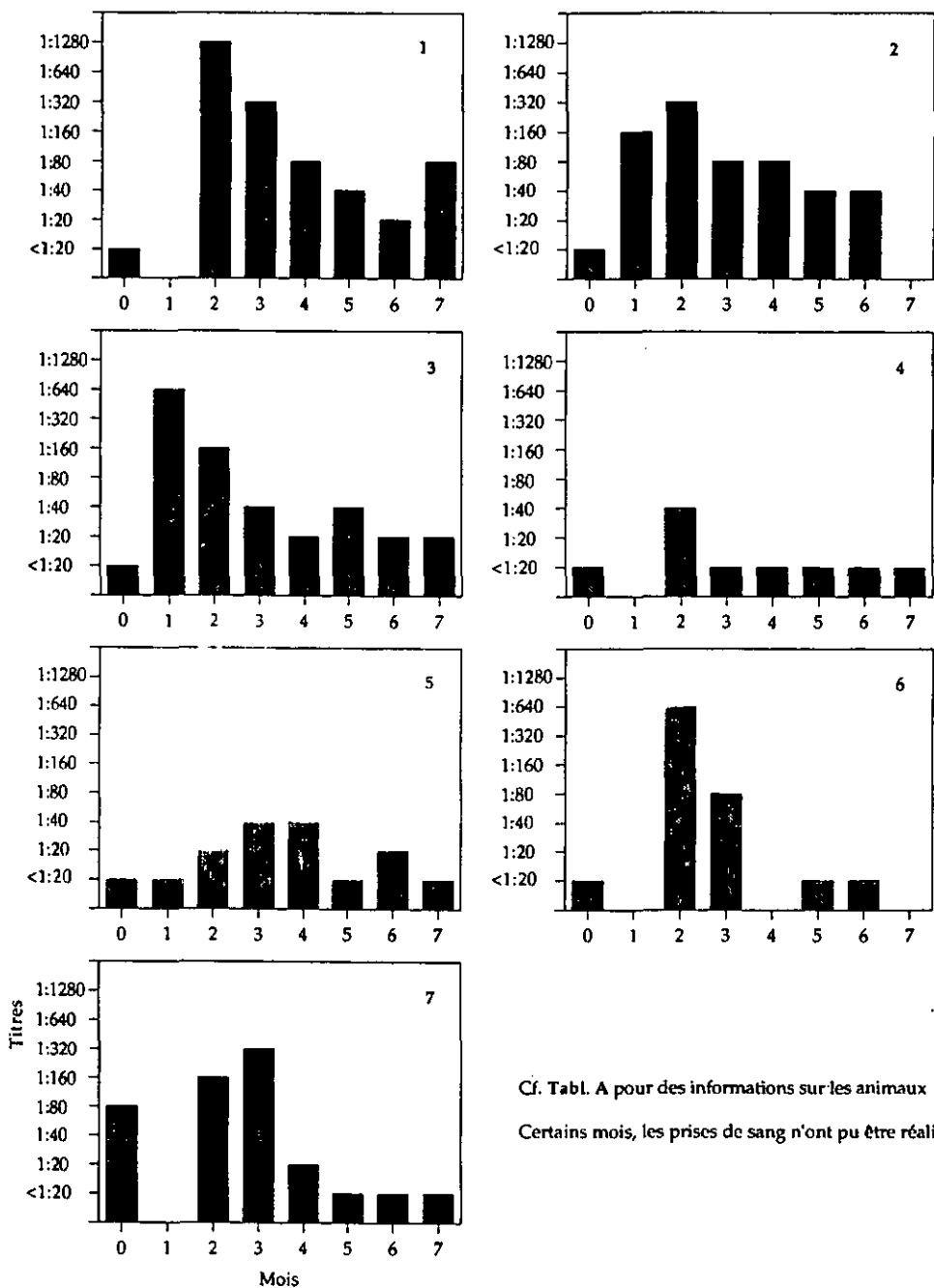
b) Les "box plots" ("box graphs") (Tukey, 1977; Chambers et al., 1983)

Certains résultats sérologiques montrant la répartition mensuelle des titres d'anticorps chez les bovins sont exposés en "box plots". Il nous semblait, d'une part, inutile d'exposer tout le détail des résultats, et d'autre part, ce type de figure est une excellente manière de visualiser rapidement la distribution des données.

Dans un "box plot" (Fig. A), les quartiles inférieur (25 % des données) et supérieur (75 %) des données sont représentés par la partie inférieure et supérieure d'un rectangle et la médiane, par un trait horizontal à l'intérieur du rectangle. Les lignes placées au-dessus et au-dessous du rectangle, expriment les valeurs extrêmes observées.

Les "box plots" donnent un résumé des particularités marquantes d'une distribution. La médiane désigne le centre de la distribution. La répartition de la majeure partie des données (50 %) est symbolisée par la longueur du rectangle (interquartile). La longueur relative des lignes, en-dessous et en-dessus de l'interquartile, montre l'étendue de la distribution.

Si la distribution des données est symétriques, la figure l'est également.



Cf. Tabl. A pour des informations sur les animaux
 Certains mois, les prises de sang n'ont pu être réalisées

Fig. B. Evolution des titres d'anticorps IgG anti-*E. phagocytophila* chez des bovins malades de septembre (0) 1988 à avril (7) 1989

ANNEXE VI Evolution des titres d'anticorps chez des bovins malades

La Fig. B présente l'évolution des titres d'anticorps IgG anti-*E. phagocytophila* chez sept bovins malades, d'âge et d'origine différents (Tabl. B), provenant de l'ouest de l'Oberland bernois. Les signes cliniques de fièvre de pâture se sont déclarés, et *E. phagocytophila* détecté, en septembre 1988. Les prises de sang ont été effectuées durant l'hivernage, de septembre (0) 1988 à avril (7) 1989.

	N° de l'animal	Année de naissance	Code racique	Provenance et date de l'achat
1	2753	nov. 85	73	Erlenbach (BE), 85
2	7881	fév. 81	60	né à la ferme
3	4672	fév. 85	60	Dientigtal (BE), oct. 87
4	9672	mars 87	72	Le Cachot (NE), printemps 88
5	9442	fév. 84	60	né à la ferme
6	2718	sept. 82	60	Grandson (VD), sept. 88
7	1096	sept. 87	60	Le Cachot (NE), sept. 88

Tabl. A. Liste et origine des bovins malades

ANNEXE VII Captures de micromammifères

Espèces	1. Hözli			2. Stierenweid			3. Rösselstein			4. Im Zil			5. Gattenfeld			Total
	M	J	S	M	J	S	M	J	S	M	J	S	M	J	S	
<i>Apodemus sylvaticus</i>	6	15	15	7	5	15	5	9	9	2	10	17	2	6	2	125
<i>Apodemus flavicollis</i>	3	3	13	4	1	14	2	6	4	0	4	8	0	1	3	66
<i>Apodemus sp.</i>	1	0	1	2	0	0	3	1	2	0	1	3	1	0	0	15
<i>Chironomys glareolus</i>	3	6	9	1	5	15	2	1	7	0	5	2	2	8	7	73
Total	13	24	38	14	11	44	12	17	22	2	20	30	5	15	12	279

Tabl. C. Bilan des captures de micromammifères pendant les mois de mai (M), juillet (J) et septembre (S) 1990 dans cinq lieux de l'Oberland bernois

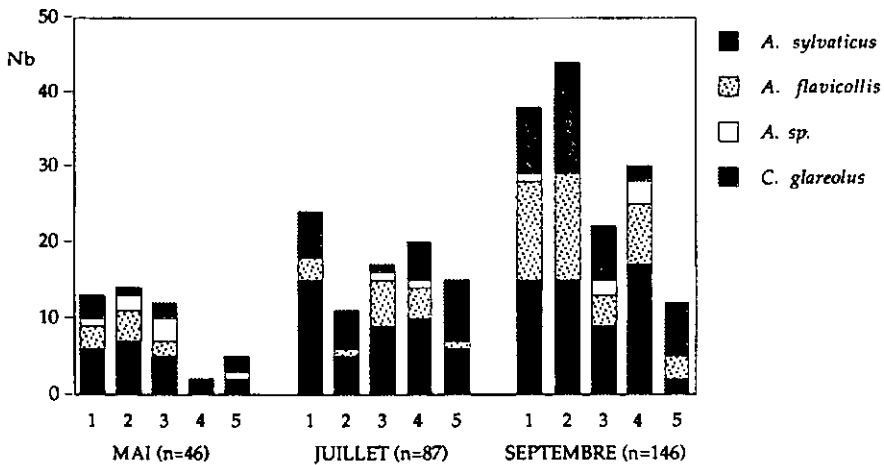


Fig. C. Distribution des micromammifères par espèces, par lieu et période de piégeage

ANNEXE VIII Récolte de tiques *I. ricinus*

	1. Hözli				2. Stierenweid				3. Rösselstein			
	L	N	M	F	L	N	M	F	L	N	M	F
Mai	40	43	10	23	0	65	17	16	0	82	11	40
Juillet	0	19	17	20	0	47	3	8	41	53	0	45
Septembre	34	39	10	47	36	51	7	12	17	103	20	33

4. Im Zil				5. Gattenfeld				Total			
L	N	M	F	L	N	M	F	L	N	M	F
0	62	27	26	0	78	15	45	40	330	80	150
23	36	11	10	14	60	17	43	78	215	48	126
0	41	12	20	0	40	31	35	87	274	80	147
205		819		208		423					

Tabl. C. Liste des tiques *I. ricinus* récoltées dans cinq lieux de l'ouest de l'Oberland bernois (1990)

L = larves
 N = nymphes
 M = mâles
 F = femelles

ANNEXE DX Valeurs hématologiques de référence chez les veaux (2-4 mois)
(Tabl. D) et les bovins adultes (Tabl. E) sains
 (D'après Tschudi, 1985)
 (en moyenne \pm déviation standard)

Tabl. D.

	$\bar{x} - 2s$	\bar{x}	$\bar{x} + 2s$			
Hématocrite (l/l)	0.23	0.31	0.39			
Hémoglobine (g/dl)	4.59	6.52	8.44			
Erythrocytes ($10^{12}/l$)	6.5	8.4	10.3			
Thrombocytes ($10^9/l$)	200	à	1080			
Leucocytes ($10^9/l$)	4	7	12			
	Valeurs absolues ($10^9/l$)			%		
				$\bar{x} - 2s$	\bar{x}	$\bar{x} + 2s$
Neutrophiles	1.0	2.45	5.4	25	35	45
Neutr. immatures (stab)	0	à	0.24	0	à	2
Eosinophiles	0	0.05	0.184	1	5	10
Basophiles	0	0.05	0.17	0	0.5	1
Monocytes	0	0.16	0.45	2	5	8
Lymphocytes	3.1	5.8	8.5	45	55	65

Tabl. E.

	$\bar{x} - 2s$	\bar{x}	$\bar{x} + 2s$			
Hématocrite (l/l)	0.28	0.35	0.38			
Hémoglobine (g/dl)	5.59	6.83	8.69			
Erythrocytes ($10^{12}/l$)	5	6.5	8			
Thrombocytes ($10^9/l$)	200	à	800			
Leucocytes ($10^9/l$)	4	7	10			
	Valeurs absolues ($10^9/l$)			%		
				$\bar{x} - 2s$	\bar{x}	$\bar{x} + 2s$
Neutrophiles	1.0	2.2	3.5	20	35	50
Neutr. immatures (stab)	0	à	0.2	0	à	2
Eosinophiles	0.3	0.6	1.5	1	5	10
Basophiles	0	à	0.1	0	0.5	2
Monocytes	0	à	0.33	2	5	6
Lymphocytes	2.5	4.0	5.5	45	55	65

ANNEXE X Valeurs hématologiques, températures rectales
et parasitémie chez des veaux infectés expérimentalement
par *E. phagocytophila*

Légende des Tabl. F à Tabl. M

T	:	jours post-infection
Temp	:	température
N inf	:	neutrophiles infectés
Leu	:	leucocytes
Eryt	:	érythrocytes
Hgb	:	hémoglobine
Hct	:	hématocrite
Thr	:	thrombocytes
Neu	:	neutrophiles
Neu S	:	neutrophiles immatures (stab)
Eos	:	éosinophiles
Bas	:	basophiles
Mon	:	monocytes
Lym	:	lymphocytes

Tabl. F. Infex 11

T jours	Temp °C	N Inf %	Leu $\times 10^9/l$	Eryt $\times 10^{12}/l$	Hgb g/dl	Hct %	Thr $\times 10^9/l$	Neu $\times 10^9/l$	Neu S $\times 10^9/l$	Fos $\times 10^9/l$	Bas $\times 10^9/l$	Mon $\times 10^9/l$	Lym $\times 10^9/l$						
0	38,8	0	9,6	10,63	10,9	32,9	459	3,024	31,5	0,000	0,0	0,096	1,0	0,096	1,0	0,624	6,5	5,664	59,0
1	38,7	0	10,3	10,48	10,8	31,8	698	2,472	24,0	0,000	0,0	0,206	2,0	0,103	1,0	0,670	6,5	6,798	66,0
2	38,8	0	10,2	11,47	11,8	35,2	707	2,142	21,0	0,000	0,0	0,306	3,0	0,357	3,5	0,612	6,0	6,732	66,0
3	38,6	0	8,5	10,48	10,9	31,8	652	2,338	27,5	0,000	0,0	0,383	4,5	0,043	0,5	0,510	6,0	5,228	61,5
4	38,9	5	8,5	10,13	10,6	31,0	578	2,040	24,0	0,000	0,0	0,255	3,0	0,085	1,0	0,468	5,5	5,610	66,0
5	39,6	43	7,6	9,33	9,7	29,0	415	3,344	44,0	0,038	0,5	0,152	2,0	0,000	0,0	0,266	3,5	3,800	50,0
6	40,3	60	7,2	8,73	9,4	27,4	290	3,276	45,5	0,072	1,0	0,180	2,5	0,000	0,0	0,432	6,0	3,204	44,5
7	39,3	53	5,8	8,37	8,8	26,2	204	1,363	23,5	0,058	1,0	0,058	1,0	0,000	0,0	0,435	7,5	3,886	67,0
8	39,0	40	6,8	8,71	9,6	27,6	281	1,836	27,0	0,034	0,5	0,034	0,5	0,000	0,0	0,646	9,5	4,148	61,0
9	38,6	37	7,2	8,53	9,0	27,4	369	0,684	9,5	0,000	0,0	0,108	1,5	0,000	0,0	0,576	8,0	5,832	81,0
10	38,8	15	7,5	8,68	9,1	28,2	495	0,825	11,0	0,000	0,0	0,038	0,5	0,038	0,5	0,525	7,0	6,075	81,0
11	38,8	6	8,8	8,84	9,8	28,8	654	0,924	10,5	0,000	0,0	0,088	1,0	0,044	0,5	0,660	7,5	7,040	80,0
12	38,7	0	8,7	9,27	10,1	30,4	-	1,566	18,0	0,000	0,0	0,087	1,0	0,044	0,5	0,653	7,5	6,308	72,5
13	38,9	1	10,1	9,30	10,2	30,4	-	1,869	18,5	0,051	0,5	0,101	1,0	0,101	1,0	0,505	5,0	7,424	73,5
14	38,6	1	10,0	9,07	9,8	30,1	1007	1,300	13,0	0,000	0,0	0,200	2,0	0,050	0,5	0,500	5,0	7,950	79,5
15	38,8	15	10,3	8,59	9,7	29,0	926	2,112	20,5	0,000	0,0	0,103	1,0	0,000	0,0	0,412	4,0	7,674	74,5
16	38,9	11	9,3	8,41	9,6	28,5	802	2,744	29,5	0,000	0,0	0,233	2,5	0,093	1,0	0,419	4,5	5,813	62,5
17	38,3	9	-	-	-	-	-	25,5	-	1,0	-	1,0	-	0,5	-	0,5	-	-	65,5
18	38,2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	38,3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	38,4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	39,1	0	9,4	8,58	10,4	29,9	666	1,880	20,0	0,047	0,5	0,000	0,0	0,000	0,0	0,564	6,0	6,909	73,5
29	-	0	11,8	9,57	11,8	34,6	641	2,242	19,0	0,177	1,5	0,354	3,0	0,177	1,5	1,003	8,5	7,788	66,0

Tabl. G. Infex 12

T	Temp	N Inf	Leu	Eryt	Hgb	Hct	Thr	Neu	Neu S	Eos	Bas	Mon	Lym						
jours	°C	%	$\times 10^9 / l$	$\times 10^{12} / l$	g/dl	%	$\times 10^9 / l$	$\times 10^9 / l$	%	$\times 10^9 / l$	%	$\times 10^9 / l$	%						
0	38.7	0	10.7	11.23	11.6	34.1	682	2.033	19.0	0.000	0.0	0.482	4.5	0.161	1.5	0.749	7.0	7.276	68.0
1	38.6	0	9.4	10.83	11.4	33.2	431	3.431	36.5	0.000	0.0	0.329	3.5	0.047	0.5	0.752	8.0	4.841	51.5
2	38.7	0	8.3	10.73	11.2	33.2	484	2.407	29.0	0.000	0.0	0.166	2.0	0.208	2.5	0.747	9.0	4.731	57.0
3	38.8	0	8.7	10.81	11.1	33.2	498	2.088	24.0	0.000	0.0	0.131	1.5	0.000	0.0	0.653	7.5	5.829	67.0
4	39.0	1	9.6	10.56	11.8	32.7	472	3.888	40.5	0.048	0.5	0.192	2.0	0.192	2.0	0.528	5.5	4.752	49.5
5	39.8	11	7.6	10.40	10.6	34.1	310	3.344	44.0	0.076	1.0	0.152	2.0	0.000	0.0	0.380	5.0	3.648	48.0
6	40.6	52	5.0	9.58	9.8	30.7	173	2.125	42.5	0.000	0.0	0.100	2.0	0.000	0.0	0.225	4.5	2.550	51.0
7	40.1	55	4.9	8.17	8.8	25.7	145	2.328	47.5	0.123	2.5	0.074	1.5	0.025	0.5	0.294	6.0	2.034	41.5
8	39.5	51	4.2	7.52	7.9	23.7	127	0.430	10.0	0.000	0.0	0.042	1.0	0.021	0.5	0.462	11.0	3.255	77.5
9	39.0	45	5.1	7.66	8.0	24.3	166	0.332	6.5	0.026	0.5	0.026	0.5	0.000	0.0	0.765	15.0	3.902	76.5
10	39.0	5	5.4	7.89	8.4	25.4	277	0.648	12.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.027	0.5	0.513	9.5	4.185	77.5
11	38.9	1	5.7	8.50	9.2	27.6	415	0.656	11.5	0.057	1.0	0.057	1.0	0.057	1.0	0.713	12.5	4.104	72.0
12	38.6	1	6.3	8.17	8.6	27.9	-	0.599	9.5	0.000	0.0	0.063	1.0	0.032	0.5	0.693	11.0	4.914	78.0
13	38.8	9	6.5	8.17	8.5	27.1	-	1.463	22.5	0.000	0.0	0.033	0.5	0.098	1.5	0.358	5.5	4.518	69.5
14	38.8	10	6.7	7.98	8.6	26.2	537	1.642	24.5	0.034	0.5	0.000	0.0	0.067	1.0	0.335	5.0	4.623	69.0
15	38.9	5	5.0	7.58	8.6	25.4	500	1.075	21.5	0.100	2.0	0.050	1.0	0.000	0.0	0.175	3.5	3.600	72.0
16	38.7	2	6.4	8.25	9.1	27.9	498	0.608	9.5	0.032	0.5	0.032	0.5	0.000	0.0	0.416	6.5	5.248	82.0
17	38.7	0	-	-	-	-	-	-	35.5	-	0.5	-	-	-	-	-	1.0	-	63.5
18	38.5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	38.4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	38.5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	38.7	0	6.8	8.50	9.8	29.3	611.0	1.564	23.0	0.000	0.0	0.034	0.5	0.170	2.5	0.680	10.0	4.318	63.5
29	-	0	8.0	8.61	10.1	30.4	475.0	2.240	28.0	0.080	1.0	0.120	1.5	0.040	0.5	0.480	6.0	5.040	63.0

Tabl. H. Index 13

T jours	Temp °C	N inf %	Leu $\times 10^9 / l$	Eryt $\times 10^{12} / l$	Hgb g/dl	Hct %	Thr $\times 10^9 / l$	Neo $\times 10^9 / l$	Neu S $\times 10^9 / l$	Eos $\times 10^9 / l$	Bas $\times 10^9 / l$	Mon $\times 10^9 / l$	Lym $\times 10^9 / l$						
0	39.4	0	15.2	11.38	10.9	34.1	565	8.284	54.5	0.076	0.5	0.000	0.0	0.912	6.0	5.776	38.0		
1	39.0	0	12.1	10.62	10.4	31.5	415	6.292	52.0	0.000	0.0	0.061	0.5	0.182	1.5	1.089	9.0	4.477	37.0
2	39.0	0	11.8	10.45	9.9	30.7	528	6.077	51.5	0.118	1.0	0.000	0.0	0.059	0.5	1.062	9.0	4.425	37.5
3	39.0	0	11.5	10.62	10.5	31.3	654	5.405	47.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.230	2.0	0.920	8.0	4.888	42.5
4	40.2	19	8.8	10.53	10.3	30.7	636	4.400	50.0	0.132	1.5	0.044	0.5	0.044	0.5	0.440	5.0	3.740	42.5
5	40.7	47	3.9	8.72	8.8	25.4	338	2.106	54.0	0.429	11.0	0.039	1.0	0.000	0.0	0.078	2.0	1.248	32.0
6	40.2	46	5.2	8.64	8.6	25.4	86	2.496	48.0	0.104	2.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.520	10.0	2.054	39.5
7	40.4	31	5.5	8.86	8.8	26.2	245	2.310	42.0	0.000	0.0	0.028	0.5	0.000	0.0	0.440	8.0	2.723	49.5
8	39.6	25	5.9	8.19	8.0	24.6	-	1.239	21.0	0.090	0.5	0.090	0.5	0.000	0.0	0.856	14.5	3.717	63.0
9	39.3	18	7.3	9.17	9.0	27.6	-	0.949	13.0	0.037	0.5	0.037	0.5	0.000	0.0	1.205	16.5	5.037	69.0
10	39.1	14	6.3	8.58	8.6	25.7	433	0.473	7.5	0.000	0.0	0.063	1.0	0.000	0.0	0.819	13.0	4.914	78.0
11	39.0	3	5.3	8.72	8.7	26.2	512	0.265	5.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.822	15.5	4.134	78.0
12	38.9	0	5.6	8.27	8.4	25.1	666	0.448	8.0	0.056	1.0	0.056	1.0	0.000	0.0	0.588	10.5	4.452	79.5
13	38.9	0	6.3	8.58	8.6	26.2	744	0.693	11.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.032	0.5	0.410	6.5	5.135	81.5
14	38.8	0	7.5	9.23	9.3	27.6	860	1.575	21.0	0.000	0.0	0.075	1.0	0.038	0.5	0.600	8.0	5.213	69.5
15	38.9	0	8.6	9.94	9.8	30.7	-	2.709	31.5	0.043	0.5	0.043	0.5	0.043	0.5	0.344	4.0	5.418	63.0
16	38.7	0	9.1	9.63	9.5	29.6	-	2.321	25.5	0.273	3.0	0.046	0.5	0.046	0.5	0.410	4.5	6.006	66.0
17	38.5	0	9.5	9.40	9.6	28.8	703	2.233	23.5	0.048	0.5	0.238	2.5	0.095	1.0	0.428	4.5	6.413	67.5
18	38.5	0	10.3	9.77	9.9	30.1	788	2.936	28.5	0.052	0.5	0.361	3.5	0.052	0.5	0.464	4.5	6.386	62.0
19	38.1	0	10.2	9.65	9.6	29.9	710	3.162	31.0	0.000	0.0	0.255	2.5	0.000	0.0	0.459	4.5	6.324	62.0
20	38.4	0	9.1	9.29	9.2	28.8	691	2.275	25.0	0.182	2.0	0.228	2.5	0.091	1.0	0.273	3.0	6.006	66.0
21	38.6	0	7.5	8.75	8.8	27.4	604	1.500	20.0	0.113	1.5	0.225	3.0	0.038	0.5	0.225	3.0	5.400	72.0

Tabl. I. Infex 14

T jours	Temp °C	N Inf %	Leu $\times 10^9/l$	Eryt $\times 10^{12}/l$	Hgb g/dl	Hct %	Thr $\times 10^9/l$	Neu $\times 10^9/l$	Neu S $\times 10^9/l$	Eos $\times 10^9/l$	Bas $\times 10^9/l$	Mon $\times 10^9/l$	Lym $\times 10^9/l$	%					
															1062	1062	1062	1062	1062
0	38.6	0	10.8	10.96	11.6	35.2	756	3.348	31.0	0.162	1.5	0.378	3.5	0.054	0.5	0.594	5.5	6.264	58.0
1	38.7	0	10.9	11.35	11.9	35.5	705	4.306	39.5	0.055	0.5	0.436	4.0	0.000	0.0	0.709	6.5	5.341	49.0
2	38.7	0	12.3	10.79	11.6	33.8	690	5.166	42.0	0.000	0.0	0.062	0.5	0.062	0.5	0.554	4.5	6.458	52.5
3	38.7	0	12.8	10.99	11.9	34.6	701	4.992	39.0	0.256	2.0	0.128	1.0	0.064	0.5	0.448	3.5	6.912	54.0
4	39.7	32	10.0	10.02	10.9	31.5	604	4.700	47.0	0.150	1.5	0.150	1.5	0.050	0.5	0.150	1.5	4.800	48.0
5	40.8	58	5.5	9.80	10.5	30.1	401	2.970	54.0	0.578	10.5	0.110	2.0	0.000	0.0	0.138	2.5	1.705	31.0
6	40.5	57	5.3	8.36	9.2	25.7	235	2.650	50.0	0.265	5.0	0.106	2.0	0.000	0.0	0.186	3.5	2.067	39.0
7	39.4	37	4.9	7.71	8.4	24.3	244	1.201	24.5	0.074	1.5	0.123	2.5	0.000	0.0	0.490	10.0	3.014	61.5
8	39.2	19	5.2	7.32	7.9	23.4	-	1.092	21.0	0.052	1.0	0.078	1.5	0.000	0.0	0.650	12.5	3.328	64.0
9	38.9	16	4.8	7.46	8.0	23.7	-	0.528	11.0	0.024	0.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.456	9.5	3.744	78.0
10	38.5	15	6.4	8.58	9.6	27.9	528	0.256	4.0	0.000	0.0	0.064	1.0	0.032	0.5	0.384	6.0	5.536	86.5
11	38.6	4	6.3	8.41	9.3	27.6	636	0.630	10.0	0.000	0.0	0.063	1.0	0.063	1.0	0.662	10.5	4.820	76.5
12	38.6	0	6.8	8.55	9.8	29.0	742	0.612	9.0	0.034	0.5	0.204	3.0	0.034	0.5	0.408	6.0	5.440	80.0
13	38.9	0	6.4	8.64	9.8	29.9	705	0.608	9.5	0.064	1.0	0.160	2.5	0.000	0.0	0.384	6.0	5.120	80.0
14	38.8	0	6.8	8.67	10.0	29.6	754	0.748	11.0	0.034	0.5	0.136	2.0	0.000	0.0	0.238	3.5	5.644	83.0
15	38.8	0	8.0	8.61	10.0	29.9	-	1.280	16.0	0.360	4.5	0.480	6.0	0.000	0.0	0.160	2.0	5.680	71.0
16	39.0	0	10.2	9.01	10.4	31.3	-	2.244	22.0	0.102	1.0	1.122	11.0	0.000	0.0	0.306	3.0	6.426	63.0
17	38.8	0	10.8	9.37	11.0	32.4	786	2.646	24.5	0.108	1.0	0.972	9.0	0.000	0.0	0.648	6.0	6.426	59.5
18	38.6	0	10.0	9.26	11.0	31.8	793	2.500	25.0	0.150	1.5	0.950	9.5	0.050	0.5	0.350	3.5	6.000	60.0
19	38.0	0	10.0	9.23	10.8	32.4	796	2.300	23.0	0.000	0.0	1.500	15.0	0.050	0.5	0.200	2.0	5.950	59.5
20	38.6	0	10.0	9.26	10.9	32.4	807	2.650	26.5	0.100	1.0	0.950	9.5	0.000	0.0	0.300	3.0	5.950	59.5
21	38.6	0	10.8	9.48	11.1	33.2	790	3.186	29.5	0.108	1.0	0.702	6.5	0.000	0.0	0.216	2.0	6.534	60.5

Tabl. J. Infex 17

T jours	Temp °C	N lmf %	Leu $\times 10^9/l$	Eryt $\times 10^{12}/l$	Hgb g/dl	Hct %	Thr $\times 10^9/l$	Neu $\times 10^9/l$	Neu S $\times 10^9/l$	Eos $\times 10^9/l$	Bas $\times 10^9/l$	Mon $\times 10^9/l$	Lym $\times 10^9/l$	%					
0	39.2	0	7.6	10.73	11.0	31.8	622	2.964	39.0	0.0	0.0	0.0	0.076	1.0	0.608	8.0	3.952	52.0	
1	38.9	0	8.7	10.85	11.2	32.7	599	3.263	37.5	0.0	0.0	0.0	0.087	1.0	0.783	9.0	4.524	52.0	
2	39.0	0	7.6	10.33	10.8	31.0	-	2.318	30.5	0.038	0.5	0.000	0.0	0.076	1.0	0.836	11.0	4.332	57.0
3	39.2	0	8.8	10.27	10.5	30.1	-	3.520	40.0	0.000	0.0	0.044	0.5	0.044	0.5	0.792	9.0	4.356	49.5
4	39.0	0	8.0	9.96	10.4	39.6	544	3.200	40.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.040	0.5	0.720	9.0	4.000	30.0
5	39.1	0	8.1	10.30	10.7	30.7	611	3.200	39.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.770	9.5	4.131	51.0
6	39.2	13	5.7	9.43	9.8	27.9	507	2.081	36.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.086	1.5	0.257	4.5	3.164	55.5
7	40.4	43	4.9	9.15	9.7	27.1	383	2.279	46.5	0.196	4.0	0.000	0.0	0.025	0.5	0.319	6.5	2.058	42.0
8	40.1	63	5.6	8.84	9.2	26.2	300	3.080	55.0	0.140	2.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.224	4.0	2.156	38.5
9	39.9	64	4.6	9.06	9.5	27.4	-	2.001	43.5	0.115	2.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.506	11.0	1.978	43.0
10	39.7	34	4.0	8.62	9.1	26.0	-	0.700	17.5	0.040	1.0	0.000	0.0	0.040	1.0	0.540	13.5	2.680	67.0
11	39.4	18	5.0	9.12	9.6	27.9	456	0.475	9.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.500	10.0	4.000	80.0
12	39.1	8	5.1	8.81	9.4	26.8	537	0.663	13.0	0.000	0.0	0.026	0.5	0.026	0.5	0.306	6.0	4.055	79.5
13	39.5	1	6.2	8.86	9.2	27.1	629	1.426	23.0	0.186	3.0	0.000	0.0	0.062	1.0	0.248	4.0	4.247	68.5
14	38.8	0	6.3	9.63	9.9	29.3	703	1.071	17.0	0.063	1.0	0.032	0.5	0.000	0.0	0.378	6.0	4.725	75.0
15	38.3	4	6.0	8.89	9.5	27.1	678	1.380	23.0	0.030	0.5	0.030	0.5	0.030	0.5	0.420	7.0	4.080	68.0

Tabl. K. Infex 18

T	Temp	N inf	Leu	Eryt	Hgb	Hct	Thr	Neu	Neu S	Eos	Bas	Mon	Lym						
jours	°C	%	$\times 10^9 / l$	$\times 10^{12} / l$	g/dl	%	$\times 10^9 / l$	$\times 10^9 / l$	%	$\times 10^9 / l$	%	$\times 10^9 / l$	%						
0	39.0	0	5.4	10.28	12.2	35.5	521	2.403	44.5	0.000	0.0	0.027	0.5	0.108	2.0	0.540	10.0	2.295	42.5
1	38.8	0	6.8	10.36	12.4	36.3	459	3.434	50.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.034	0.5	0.510	7.5	2.822	41.5
2	38.6	0	5.6	9.17	11.1	32.1	271	2.016	36.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.560	10.0	3.024	54.0
3	39.2	0	6.7	9.68	11.8	33.5	348	2.714	40.5	0.034	0.5	0.000	0.0	0.034	0.5	0.603	9.0	3.283	49.0
4	38.8	0	6.9	9.46	11.5	32.4	438	3.036	44.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.518	7.5	3.278	47.5
5	39.1	0	5.8	9.29	11.2	31.8	466	2.117	36.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.609	10.5	3.074	53.0
6	38.7	0	6.8	9.12	11.0	31.3	410	3.298	48.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.034	0.5	0.544	8.0	2.890	42.5
7	39.2	0	7.9	8.98	11.0	31.0	452	3.200	40.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.040	0.5	0.553	7.0	4.108	52.0
8	39.1	0	6.5	9.12	11.1	31.5	447	2.405	37.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.033	0.5	0.358	5.5	3.673	56.5
9	39.2	0	5.9	9.15	11.0	31.8	198	2.272	38.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.089	1.5	0.590	10.0	2.950	50.0
10	39.3	0	5.7	9.29	11.3	32.1	277	1.938	34.0	0.029	0.5	0.000	0.0	0.143	2.5	0.485	8.5	3.107	54.5
11	39.2	0	6.0	9.17	11.1	31.8	438	2.520	42.0	0.030	0.5	0.000	0.0	0.090	1.5	0.480	8.0	2.880	48.0
12	39.3	0	5.7	9.12	10.9	31.5	419	1.767	31.0	0.029	0.5	0.000	0.0	0.057	1.0	0.456	8.0	3.392	59.5
13	39.2	0	5.1	8.92	10.8	31.0	417	1.862	36.5	0.026	0.5	0.000	0.0	0.077	1.5	0.434	8.5	2.703	53.0
14	39.0	0	5.8	9.48	11.4	32.9	419	2.117	36.5	0.029	0.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.435	7.5	3.161	54.5
15	39.2	0	5.4	8.89	10.9	30.7	415	2.025	37.5	0.027	0.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.351	6.5	2.970	55.0

Tabl. L. Infex 23

T	Temp °C	N inf %	Leu x10 ⁹ /l	Eryt x10 ¹² /l	Hgb g/dl	Hct %	Thr x10 ⁹ /l	Neu x10 ⁹ /l	Neu S x10 ⁹ /l	Eos x10 ⁹ /l	Bas x10 ⁹ /l	Mion x10 ⁹ /l	Lym x10 ⁹ /l	%	
0	38.8	0	12.7	10.45	12.2	34.9	408	3.937	31.0	0.000	0.0	0.064	0.5	8.001	63.0
1	38.8	0	13.3	9.82	11.7	32.7	378	3.724	28.0	0.000	0.0	0.133	1.0	8.047	60.5
2	38.5	0	13.8	10.25	12.2	34.1	393	3.450	25.0	0.138	1.0	0.138	1.0	8.763	63.5
3	38.6	0	13.9	9.91	11.9	32.9	410	3.128	22.5	0.000	0.0	0.070	0.5	9.522	68.5
4	38.5	0	13.1	9.96	11.9	33.2	410	4.258	32.5	0.000	0.0	0.000	0.0	8.122	62.0
5	38.8	0	10.9	9.68	11.4	32.1	396	2.943	27.0	0.218	2.0	0.055	0.5	7.085	65.0
6	39.8	52	8.1	8.78	10.6	28.8	235	3.686	45.5	0.243	3.0	0.000	0.0	3.767	46.5
7	39.3	40	7.6	8.08	9.8	26.8	146	2.280	30.0	0.418	5.5	0.000	0.0	4.294	56.5
8	38.9	39	9.5	7.88	9.5	26.5	128	1.425	15.0	0.238	2.5	0.000	0.0	6.840	72.0
9	38.7	16	10.5	8.11	9.8	27.6	157	1.103	10.5	0.053	0.5	0.000	0.0	7.980	76.0
10	38.7	14	9.9	8.13	10.1	27.9	203	1.188	12.0	0.099	1.0	0.000	0.0	7.227	73.0
11	38.5	6	10.1	8.64	10.3	29.9	283	1.061	10.5	0.000	0.0	0.000	0.0	8.030	79.5
12	38.8	2	9.7	8.47	10.4	29.3	366	0.970	10.0	0.243	2.5	0.000	0.0	7.760	80.0
13	39.2	0	10.8	8.78	10.9	30.7	399	1.350	12.5	0.000	0.0	0.000	0.0	8.208	76.0
14	38.7	0	10.3	8.39	10.3	29.0	424	0.876	8.5	0.000	0.0	0.000	0.0	8.343	81.0
15	38.6	0	12.2	9.99	12.5	34.9	454	1.708	14.0	0.122	1.0	0.000	0.0	9.455	77.5
16	38.9	0	13.3	9.12	11.3	31.8	440	2.860	21.5	0.067	0.5	0.000	0.0	9.510	71.5
17	38.7	0	13.9	8.58	10.6	30.1	454	2.919	21.0	0.000	0.0	0.070	0.5	9.591	69.0
18	38.7	0	12.6	8.58	10.6	29.9	434	2.835	22.5	0.063	0.5	0.000	0.0	8.568	68.0
19	38.7	0	13.3	8.27	10.3	28.8	447	2.594	19.5	0.000	0.0	0.067	0.5	9.643	72.5
20	38.4	0	13.2	8.30	10.4	28.8	436	2.310	17.5	0.066	0.5	0.000	0.0	9.702	73.5
21	38.6	0	12.6	8.25	10.1	28.8	429	2.835	22.5	0.063	0.5	0.232	2.0	8.316	66.0

Tabl. M. Infex 24

T jours	Temp °C	N laf %	Leu $\times 10^9 / l$	Eryt $\times 10^{12} / l$	Hgb g/dl	Hct %	Thr $\times 10^9 / l$	Neu $\times 10^9 / l$	Neu S $\times 10^9 / l$	Eos $\times 10^9 / l$	Bas $\times 10^9 / l$	Mon $\times 10^9 / l$	Lym $\times 10^9 / l$	%					
0	38.5	0	13.8	8.44	10.3	29.0	684	6.141	44.5	0.000	0.0	0.069	0.5	0.138	1.0	1.449	10.5	6.003	43.5
1	38.7	0	12.1	8.13	9.5	28.2	675	4.840	40.0	0.000	0.0	0.061	0.5	0.061	0.5	0.787	6.5	6.353	52.5
2	38.5	0	11.3	7.97	9.8	27.6	650	4.577	40.5	0.057	0.5	0.000	0.0	0.057	0.5	0.904	8.0	5.650	50.0
3	38.8	0	11.5	8.39	10.3	29.0	689	4.025	35.0	0.000	0.0	0.115	1.0	0.115	1.0	0.863	7.5	6.325	55.0
4	38.7	0	10.2	8.41	10.2	29.3	684	3.876	38.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.051	0.5	0.408	4.0	5.865	57.5
5	40.7	0	7.5	7.94	10.0	27.6	572	3.863	51.5	0.150	2.0	0.038	0.5	0.000	0.0	0.563	7.5	2.888	38.5
6	40.8	13	5.7	6.79	8.3	23.7	369	3.420	60.0	0.257	4.5	0.086	1.5	0.029	0.5	0.456	8.0	1.454	25.5
7	40.6	36	5.3	6.37	8.0	22.3	244	2.544	48.0	0.239	4.5	0.053	1.0	0.000	0.0	0.610	11.5	1.829	34.5
8	39.3	46	6.0	7.27	9.1	26.0	244	1.020	17.0	0.090	1.5	0.120	2.0	0.000	0.0	0.630	10.5	4.080	68.0
9	39.2	38	7.1	7.80	9.8	27.9	249	0.817	11.5	0.107	1.5	0.071	1.0	0.036	0.5	0.746	10.5	5.219	73.5
10	39.2	18	6.9	7.88	9.9	28.5	348	1.242	18.0	0.104	1.5	0.000	0.0	0.035	0.5	0.897	13.0	4.520	65.5
11	39.0	7	7.3	7.80	9.8	27.9	456	0.949	13.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.040	0.5	0.480	11.5	5.439	74.5
12	38.7	2	8.0	7.74	9.8	27.9	574	1.360	17.0	0.040	0.5	0.000	0.0	0.000	0.0	0.581	7.0	5.935	71.5
13	38.8	2	8.3	7.74	9.7	28.2	652	1.702	20.5	0.042	0.5	0.000	0.0	0.037	0.5	0.913	12.5	5.183	71.0
14	38.8	1	7.3	7.66	9.8	27.9	657	1.095	15.0	0.000	0.0	0.037	0.5	0.037	0.5	0.581	7.0	5.561	67.0
15	38.8	0	8.3	7.66	9.7	27.9	689	1.992	24.0	0.000	0.0	0.083	1.0	0.042	0.5	0.608	7.5	5.144	63.5
16	38.9	0	8.1	7.77	9.8	28.2	724	2.147	26.5	0.000	0.0	0.162	2.0	0.000	0.0	0.608	7.5	5.144	63.5
17	38.9	0	9.7	8.72	11.1	31.5	735	3.444	35.5	0.000	0.0	0.291	3.0	0.146	1.5	0.631	6.5	5.141	53.0
18	38.2	0	10.2	8.81	11.1	32.1	765	3.519	34.5	0.000	0.0	0.255	2.5	0.051	0.5	0.612	6.0	5.763	56.5
19	38.8	0	10.2	8.19	10.4	29.9	751	3.723	36.5	0.000	0.0	0.306	3.0	0.107	1.0	0.663	6.5	5.406	53.0
20	38.7	0	10.7	7.80	10.0	28.2	740	3.424	32.0	0.000	0.0	0.428	4.0	0.107	1.0	0.856	8.0	5.885	55.0
21	38.7	0	10.9	8.19	10.4	29.9	797	3.706	34.0	0.000	0.0	0.273	2.5	0.055	0.5	0.600	5.5	6.268	57.5

ANNEXE XI Photos

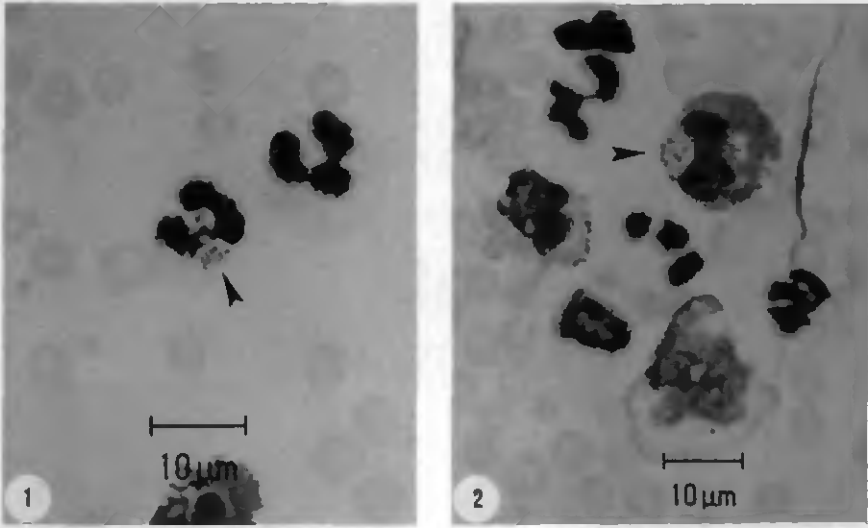


Fig. D. Formes caractéristiques (morulas) d'*E. phagocytophila* dans un neutrophile (1) et un éosinophile (2)

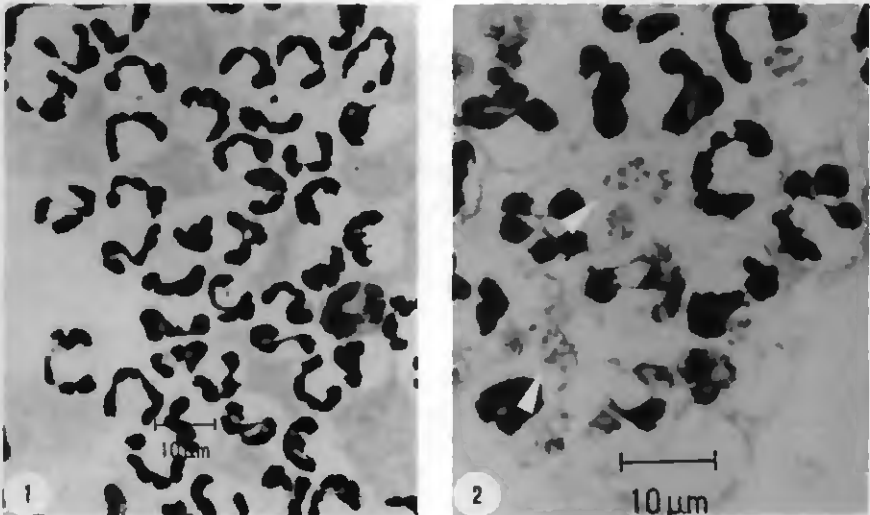


Fig. E. Culture d'*E. phagocytophila* dans des neutrophiles bovins Avant incubation (1) et 24 heures après (2)

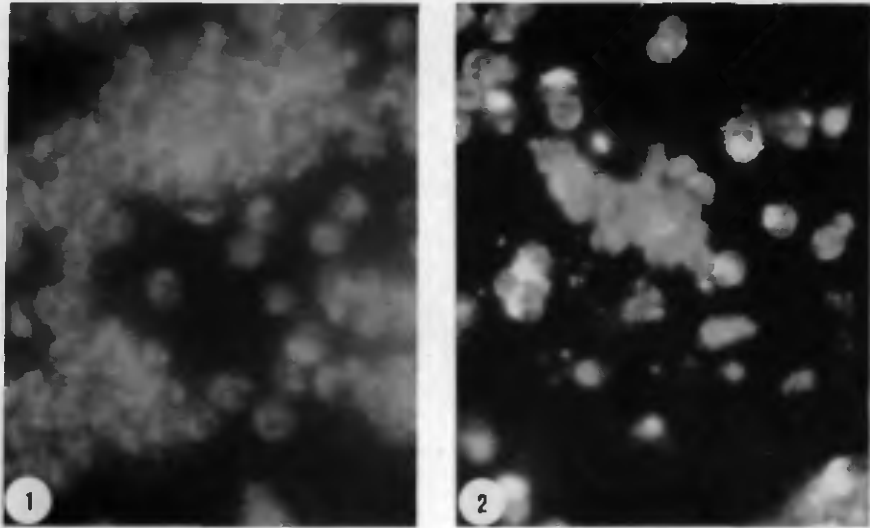


Fig. F. Réaction sérologique (IFI) contre *E. phagocytophila* (500 x)
Sérum négatif (titre 1:160) (1) et sérum positif (titre 1:160) (2)

9. REMERCIEMENTS

Ma reconnaissance toute particulière va au Prof. Kurt Pfister, directeur de thèse. Je tiens ici à lui exprimer ma plus profonde gratitude pour le soutien, les conseils et les encouragements qu'il a su me prodiguer tout au long de ce travail.

Je suis très sincèrement reconnaissant au Prof. André Aeschlimann, co-directeur de thèse, pour m'avoir donné le goût de la parasitologie, pour le soutien qu'il m'a apporté et la confiance qu'il m'a accordée durant toutes mes années passées à l'Institut de Zoologie.

Ma gratitude s'adresse également à la direction et au personnel du Centre de Recherche Agricole de Ciba-Geigy à St-Aubin (FR), et plus particulièrement au Dr. Jean-François Graf, membre du jury, au Dr. Markus Graf et ses techniciennes, Margrit Kunz et Martine Hubleur, à Marcel Rohrer (merci beaucoup Marcel), au Dr. Jan Jonczy, à Claude Rudaz et Armand Genoud, ainsi qu'aux Drs. Eliane Humbert-Droz, Marcio Folly et Rolf Holtz, pour toute l'aide inestimable qu'ils m'ont apportée lors des infections expérimentales indispensables à mes recherches.

Je remercie le Prof. Gerrit Uilenberg, membre du jury, qui m'a si gentiment accueilli dans son laboratoire à Utrecht (Pays-Bas), ainsi que le Dr. Frans Jongejan qui m'a appris les techniques de culture cellulaire.

Je suis également très reconnaissant au Prof. Michel Brossard, membre du jury, pour tous ses précieux conseils.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont aidé, encouragé, conseillé et entouré au cours de ce travail et qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation, en particulier:

- Le Prof. Didier Raoult, les Drs. Lorenza Beati et Philippe Brouqui de l'Unités des Rickettsies du CHU La Timone de Marseille (France)
- Jacqueline Moret pour son aide dans le traitement statistique des résultats

-
- Le Dr. Patrick Guerin, pour les conseils et toutes les discussions fructueuses que nous avons partagées
 - Josiane Pont, pour elle-même
 - Albin Collaud et Olivier Rais, pour leurs nombreux coups de mains
 - Le Dr. Lise Gern, pour ces remarques judicieuses et son soutien
 - Le personnel du Diagnostic parasitaire pour leur gentillesse et leur disponibilité
 - Tous les amis et collègues de l'Institut
 - Le Dr. Dirk Dobbelaere, pour sa disponibilité et toute l'aide précieuse qu'il m'a apportée
 - Les Inspectorats de la Chasse des cantons de Neuchâtel, Berne et Vaud, ainsi que les présidents des différentes sociétés de chasse qui ont participé aux prises de sang
 - Les vétérinaires et les propriétaires de l'ouest de l'Oberland bernois.
 - Je remercie de tout coeur les Drs. Bettina Schwalbach-Gassler, Heidi Holden, Jean-Luc Charbon, Pascal Marti et Pascal Wicki pour l'immense aide qu'il m'ont apportée.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents pour leur encouragement, leur soutien et leur présence tout au long de mes études.

Je suis très reconnaissant à Francelina et à André.

Enfin, toute mon affection va pour Anani et Francine qui m'ont aidé, encouragé et supporté.

Les fragments des cartes nationales de la Suisse (1:100'000), n° 31, 36, 37 et 41, ont été reproduits avec l'autorisation de l'office fédéral de topographie du 24.6.1994.

10. BIBLIOGRAPHIE

A

AESCHLIMANN, A. 1972. *Ixodes ricinus*, Linné, 1758 (*Ixodoidea; Ixodidae*). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. Acta Trop. 29: 321-340.

AESCHLIMANN, A., BROSSARD, M. et QUENET, G. 1975. Contribution à la connaissance des piroplasmes de Suisse. Acta Trop. 32: 281-283.

AESCHLIMANN, A., BURGDORFER, W., MATILE, H., PETER, O. et WYLER, R. 1979. Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. Acta Trop. 36 : 181-191.

ALANI, A. J., KONRAD, J. et HERBERT, I. V. 1987. Serodiagnosis of *Babesia motasi* (Wales), *Theileria recondita* (Wales) and *Cytoecetes phagocytophila* infection in sheep. Res. Vet. Sci. 43: 104-108.

AMBROISE-THOMAS, P. 1969. Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. Thèse, Faculté de Médecine, Université de Lyon.

ANDERSON, B. E., DAWSON, J. E., JONES, D. C. et WILSON, K. H. 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 29: 2838-2842.

ANDERSON, B. E., GREENE, C. E., JONES, D. C. et DAWSON, J. E. 1992b. *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. Int. J. Systematic Bacteriol. 42: 299-302.

ANDERSON, B. E., SIMS, K. G., OLSON, J. G., CHILDS, J. E., PIESMAN, F., HAPP, C. M., MAUPIN, G. O. et JOHNSON, B. J. B. 1993. *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49: 239-244.

ANDERSON, B. E., SUMNER, J. W., DAWSON, J. E., TZIANABOS, T., GREENE, C. R., OLSON, J. G., FISHBEIN, D. B., OLSEN-RASMUSSEN, M., HOLLOWAY, B. P., GEORGE, E. H. et AZAD, A. F. 1992a. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30: 775-780.

ANDERSON, D. R., HOPPS, H. E., BARILE, M. F. et BERNHEIM, B. C. 1965. Comparison of the ultrastructure of several Rickettsiae, Ornithosis virus, and *Mycoplasma* in tissue culture. J. Bacteriol. 90: 1387-1404.

ANZIANI, O. S., EWING, S. A. et BARKER, R. W. 1990. Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. Am. J. Vet. Res. 51: 929-931.

ARMSTRONG, J. A. 1968. Relation of PLT organisms to the Rickettsiae, with special reference to structure and multiplication. Acta Virol. Engl. 12: 15-17.

B

- BAKER, D. C., GAUNT, S. D. et BABIN, S. S. 1988. Anemia of inflammation in acute *Ehrlichia platys* infection. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1014-1016.
- BAKER, D. C., SIMPSON, M. et GAUNT, S. D. 1987. Acute *Ehrlichia platys* infection in dog. *Vet. Pathol.* 24: 449-453.
- BATUNGBACAL, M. D. R. et SCOTT, G. R. 1982a. The lymphocytopenia in tick-borne fever. *J. Comp. Pathol.* 92: 403-407.
- BATUNGBACAL, M. D. R. et SCOTT, G. R. 1982b. Suppression of the immune response to clostridial vaccine by tick-borne fever. *J. Comp. Pathol.* 92: 409-413.
- BATUNGBACAL, M. D. R. et SCOTT, G. R. 1982c. Tick-borne fever and concurrent parainfluenza-3 virus infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 92: 415-428.
- BEATI, L., PETER, O., BURGDORFER, W., AESCHLIMANN, A. et RAOULT, D. 1993. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of *Rickettsiae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 : 521-526.
- BEDSON, S. P. et BLAND, T. O. W. 1932. A morphological study of psittacosis virus with description of a developmental cycle. *Brit. J. Exp. Pathol.* 13: 461-466.
- BELLAH, J. R., SHULL, R. M. et SHULL SELCER, E. V. 1986. *Ehrlichia canis*-related polyarthritis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189: 922-923.
- BISWAS, B., DUTTA, S. K. et MATTINGLY-NAPIER, B. 1990. Gene amplification by polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* DNA in Potomac horse fever. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590: 582-583.
- BJÖERSDORFF, A., CHRISTENSSON, D., JOHNSON, A. et MADIGAN, J. E. 1990. Granulocytic ehrlichiosis in the horse, the first verified cases in Sweden, abstr. P35, p. 69. In Program and Abstracts of the 14th International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Piestany Spa, Czechoslovakia
- BOOL, P. H. et REINDERS, J. S. 1964. Tick-borne fever in bovines in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 89: 1519-1527.
- BOVARNICK, M. R., MILLER, J. C. et SNYDER, J. C. 1950. The influence of certain salts, amino, sugars, and proteins in the stability of rickettsiae. *J. Bacteriol.* 59: 509-522.
- BRETSCHER, R. 1990. Serologische Untersuchungen zur Häufigkeit und Verbreitung der equinen Ehrlichiose in der Schweiz. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich.
- BRODIE, T. A., HOLMES, P. H. et URQUHART, G. M. 1986. Some aspects of the tick-borne diseases of the british sheep. *Vet. Rec.* 118: 415-418.
- BRODIE, T. A., HOLMES, P. H. et URQUARDT, G. M. 1988. Prophylactic use of long-acting tetracycline against tick-borne fever (*Cytoecetes phagocytophila*) in sheep. *Vet. Rec.* 122: 43-44.

- BRODIE, T., LEGGETT, E., HOLMES, P. H., URQUHART, G. M., REID, H. W., BUXTON, D. et GILMOUR, N. J. L. 1982. The influence of tick-borne fever on the susceptibility of sheep to secondary infections. Ectoparasites of veterinary and medical importance in temperate areas, Royal Army Medical College, Millbank.
- BROSSARD, M. 1976. *Ixodes ricinus*, vecteur expérimental de trois espèces de Babésies (*B. bovis*, *B. berbera* et *B. argentina*). Rev. Suisse Zool. 83: 443-462.
- BROSSARD, M. et AESCHLIMANN, A. 1975. Piroplasmoses bovines en Suisse italienne. Schweiz. Arch. Tierheilk. 117: 287-292.
- BUHLES, W. C., HUXSOLL, D. L. et RISTIC, M. 1974. Tropical canine pancytopenia: clinical, haematologic and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infections, tetracycline therapy and challenge inoculations. J. Infect. Dis. 130: 357-367.
- BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G., HAYES, S. F., PETER, O. et AESCHLIMANN, A. 1983. Erythema chronicum migrans: a tickborne spirochetosis. Acta Trop. 40: 79-83.
- BÜSCHER, G., GANDRAS, R., APEL, G. et FRIEDHOFF, K. T. 1984. Der erste Fall von ehrlichiosis beim Pferd in Deutschland. Dt. Tierärztl. Wschr. 91: 408-409.

C

- CAMUS, E. Contribution à l'étude épidémiologique de la cowdriose (*Cowdria ruminantium*) en Guadeloupe. Ph.D. Thesis, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay.
- CARILLO, J. M. et GREENE, R. A. 1978. A case report of canine ehrlichiosis: neutrophilic strain. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 14: 100-104.
- CARLSON, G. P. et KANEKO, J. J. 1973. Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood. Proc. Exp. Biol. Med. 142: 853-856.
- CHAMBERS, J. M., CLEVELAND, W. S., KLEINER, B. et TUKEY, P. A. 1983. Graphical methods for data analysis. Wadsworth Statistics/Probability series, Wadsworth International Group, Belmont. Duxbury Press, Boston.
- COLLINS, J. D., HANNAN, J., FERGUSON, A. R. et WILSON, J. O. 1970. Tick-borne fever in Ireland. Irish Vet. J. 24: 162-166.
- COWELL, R. L., TYLER, R. D., CLINKENBEARD, K. D. et MEINKOTH, J. H. 1988. Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs. J. Am. Vet. Assoc. 192: 1093-1095.
- CRANWELL, M. P. 1990. Efficacy of long-acting oxytetracycline for the prevention of tick-borne fever in calves. Vet. Rec. 126: 334-336.
- CRANWELL, M. P. et GIBBONS, J. A. 1986. Tick-borne fever in a dairy herd. Vet. Rec. 119: 531-532.
- CUTLIP, R. C. 1970. Electron microscopy of cell cultures infected with a chlamydial agent causing polyarthritis in lambs. Infect. Immun. 1: 499-502.

D

- DANSKIN, D. et BURDIN, M. L. 1963. Bovine petechial fever. Vet. Rec. 75: 391-394.
- DAVOUST, B. 1993. L'ehrlichiose canine. Le Point Vétérinaire. 24: 43-51.
- DAVOUST, B., PARZY, D., VIDOR, E., HASSELOT, N. et MARTET, G. 1991. Ehrlichiose canine expérimentale. Etude clinique et thérapeutique. Rec. Méd. Vét. 167: 33-40.
- DAWSON, J. E., ANDERSON, B. E., FISHBEIN, D. B., SANCHEZ, J. L., GOLDSMITH, C. S., WILSON, K. H. et DUNTLEY, C. W. 1991. Isolation and characterization of an *Ehrlichia sp.* from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 29 : 2741-2745.
- DONATIEN, A. et LESTOQUARD, F. 1935. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. Bull. Soc. Pathol. Exot. 28: 418-419.
- DONATIEN, A. et LESTOQUARD, F. 1936. *Rickettsia bovis*, nouvelle espèce pathogène pour le boeuf. Bull. Soc. Pathol. Exot. 29: 1057-1061.
- DONATIEN, A. et LESTOQUARD, F. 1940. Rickettsiose bovine algérienne à *R. bovis*. Bull. Soc. Pathol. Exot. 31: 245-248.
- DUMLER, J. S., DAWSON, J. E. et WALKER, D. H. 1993. Human ehrlichiosis: hematopathology and immunohistologic detection of *Ehrlichia chaffeensis*. Hum. Pathol. 24 : 391-396.
- DUNN, B. E., MONSON, T. P., DUMLER, J. S., MORRIS, C. C., WESTBROOK, A. B., DUNCAN, J. L., DAWSON, J. E., SIMS, K. G. et ANDERSON, B. E. 1992. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* morulae in cerebrospinal fluid mononuclear cells. J. Clin. Microbiol. 30: 2207-2210.
- DU PLESSIS, J. L., CAMUS, E., OBEREM, P. T. et MALAN, L. 1987. Heartwater serology: some problems with the interpretation of results. Onderstepoort J. Vet. Res. 54: 327-329.

E

- ENG, T. R., HARKESS, J. R., FISHBEIN, D. B., DAWSON, J. E., GREENE, C. R., REDUS, M. A. et SATALOWICH, F. T. 1988. Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 1988. J. Am. Med. Assoc. 264: 2251-2258.
- EWING, S. A., ROBERSON, W. R., BUCKENER, R. G. et HAYAT, C. S. 1971. A new strain of *Ehrlichia canis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 159: 1771-1774.

F

- FISHBEIN, D. B., SAWYER, L. A., HOLLAND, C. J., HAYES, E. B., OKOROANYANWU, W., WILLIAMS, D., SIKES, K., RISTIC, M. et MCDADE, J. E. 1987. Unexplained febrile illness after exposure to ticks. Infection with an *Ehrlichia*. J. Am. Med. Assoc. 257: 3100-3104.

- FOGGIE, A. 1951. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* 63: 1-15.
- FOGGIE, A. 1956. The effects of tick-borne fever infection on the susceptibility of lambs to staphylococci. *J. Comp. Pathol.* 66: 278-285.
- FOGGIE, A. 1957. Further experiments on the effects of tick-borne fever infection on the susceptibility of lambs to staphylococci. *J. Comp. Pathol.* 67: 369-377.
- FOGGIE, A. 1962. Studies on the pyaemia and tick-borne fever. In *Aspects of disease transmission by ticks*. Symp. Zool. Soc. Lond. The Zoological Society of London, 6: 51-58.
- FOGGIE, A. et ALLISON, C. J. 1960. A note on the occurrence of tick-borne fever in cattle in Scotland with comparative studies of bovine and ovine strains of the organism. *Vet. Rec.* 72: 767-770.
- FOGGIE, A. et HOOD, C. S. 1961. Adaptation of the infectious agent of tick-borne fever to guinea-pigs and mice. *J. Comp. Pathol.* 71: 414-427.
- FOSTER, W. N. M. et CAMERON, A. E. 1968b. Thrombocytopaenia in sheep associated with experimental tick-borne fever infection. *J. Comp. Pathol.* 78: 251-254.
- FOSTER, W. N. M. et CAMERON, A. E. 1968a. Aetiology of enzootic staphylococcal infection (tick pyaemia) in lambs. *J. Comp. Pathol.* 78: 243-250.
- FOSTER, W. N. M. et CAMERON, A. E. 1970a. Observations on ovine strains of tick-borne fever. *J. Comp. Pathol.* 80: 429-436.
- FOSTER, W. N. M. et CAMERON, A. E. 1970b. Observations on the functional integrity of neutrophil leucocytes infected with tick-borne fever. *J. Comp. Pathol.* 80: 487-491.
- FOSTER, W. N. M., FOGGIE, A. et NISBET, D. I. 1968. Haemorrhagic enteritis in sheep experimentally infected with tick-borne fever. *J. Comp. Pathol.* 78: 255-259.
- FOSTER, W. N. M. et GREIG, J. C. 1969. Isolation of tick-borne fever from feral goats in New Galloway. *Vet. Rec.* 85: 585-586.
- FRENCH, T. W. et HARVEY, J. W. 1983. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Vet. Res.* 44: 2408-2411.
- FRIEDHOFF, K. T. 1981. Rickettsieninfektionen (*Ehrlichia*, *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*) bei Haustieren in Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 84: 204-209.
- FUKUDA, T., KITAO, T. et KEIDA, Y. 1954. Studies on the causative agent of Hyuganetsu disease. I. Isolation of the agent and its inoculation trial in human beings. *Med. Biol.* 32: 200-209.

G

- GAUNT, S. D., BAKER, D. C. et BABIN, S. S. 1990. Platelet aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia platys* infection. *Am. J. Vet. Res.* 51: 290-293.

- GERN, L. 1984. Contribution à la connaissance de l'épidémiologie des babésioses de micromammifères et de bovins en Suisse. Thèse ès Sciences, Université de Neuchâtel.
- GERN, L., BROSSARD, M., AESCHLIMANN, A., BROQUET, C. A., QUENET, G., STUCKI, J. P. et ACKERMANN, J. 1982. Piroplasmose bovine dans le Clos-du-Doubs (Jura, Suisse): observations préliminaires. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 124: 549-556.
- GERN, L., KINDLER, A. et BROSSARD, M. 1988. Annual evolution of cattle immunity against *Babesia divergens* in Northern Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 6: 9-16.
- GILMOUR, N. J. L., BRODIE, T. A. et HOLMES, P. H. 1982. Tick-borne fever and pasteurellosis in sheep. *Vet. Rec.* 3: 512.
- GILOT, B., BONNEFILLE, M., DEGEILH, B., BEAUJOURNU, J.-C., PICHOT, J. et GUIGUEN, C. 1994. La colonisation des massifs forestiers par *Ixodes ricinus* (Linné, 1758) en France: utilisation du chevreuil, *Capreolus capreolus* (L. 1758) comme marqueur biologique. *Parasite* 1: 81-86.
- GLAZE, M. B. et GAUNT, S. D. 1986. Uveitis associated with *Ehrlichia platys* infection in a dog. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 188: 916-917.
- GORDON, J. C., BECH-NIELSEN, S., KOHN, C., FARRAR, W., PARSONS, M. et FOSTER, W. 1988. An epidemiological investigation of farms with Potomac horse fever (Equine monocytic ehrlichiosis). *Acta Vet. Scand.* 84: 319-322.
- GORDON, W. S., BROWNLEE, A., WILSON, D. R. et MACLEOD, J. 1932a. Studies in louping-ill. I. *J. Comp. Pathol.* 42: 106-140.
- GORDON, W. S., BROWNLEE, A., WILSON, D. R. et MACLEOD, J. 1932b. "Tick-borne fever" (A hitherto undescribed disease of sheep). *J. Comp. Pathol.* 42: 301-307.
- GORDON, W. S., BROWNLEE, A., WILSON, D. R. et MACLEOD, J. 1940. Studies in louping-ill. tick-borne fever and scrapie. *Proc. of the 3rd Int. Congr. of Microbiol., N.Y.* : 362-363.
- GORDON, W. S., BROWNLEE, A., WILSON, D. R. et MACLEOD, J. 1962. The epizootiology of louping ill and tick-borne fever with observation on the control of these sheep diseases. *In Aspects of disease transmission by ticks. Symp. Zool. Soc. Lond. The Zoological Society of London*, 6: 1-27.
- GREIG, A., MACLEOD, N. S. et ALLISON, J. 1977. Tick-borne fever in association with mucosal disease and cobalt deficiency in calves. *Vet. Rec.* 100: 562-564.
- GRETTILLAT, S., MATTEI, X. et MARCHAND, B. 1981. Une rickettsiale nouvelle (*Ehrlichia*?) des leucocytes du sang du rat de Gambie (*Cricetomys gambianus*) au Sénégal: *Cytoecetes kamtchoulii* n. sp. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 34: 391-396.
- GRIBBLE, D. H. 1969. Equine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 155: 462-469.
- GROVES, M. G., DENIS, G. L., AMYX, H. L. et HUXSOLL, D. L. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.* 36: 937-940.
- GUERRERO, A., FISHBEIN, D. B., MESA, E. et ESCUDERO, R. 1991. Human infection by *Ehrlichia canis* in Spain. *Med. Clin.* 96: 236-237.

H

- HAIG, D. A. et DANSKIN, D. 1962. The aetiology of Bovine petechial fever (Ondiri disease). Res. Vet. Sci. 2: 129-138.
- HARVEY, J. W., SIMPSON, C. F. et GASKIN, J. M. 1978. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dog. J. Infect. Dis. 137: 182-188.
- HERMANN, M., BAUMANN, D., LUTE, H. et WILD, P. 1985. Erster diagnostizierter Fall von equiner Ehrlichiose in der Schweiz. Pferdeheilkunde 1: 247-250.
- HILDEBRANDT, P. K., CONROY, J. D., MCKEE, M. B., NYINDO, A. et HUXSOLL, D. L. 1973a. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. Infect. Immun. 7: 265-271.
- HILDEBRANDT, P. K., HUXSOLL, D. L., WALKER, J. S., NIMS, R. M., TAYLOR, R. et ANDREWS, M. 1973b. Pathology of canine ehrlichiosis (Tropical canine pancytopenia). Am. J. Vet. Res. 34: 1309-1320.
- HINAIDY, H. K. 1973. Zwei neue infektiöse Blutkrankheiten des Rindes in Österreich. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 60: 364-366.
- HOLLAND, C. J., LOGAN, L. R., MEBUS, C. A. et RISTIC, M. 1987. The serological relationship between *Cowdria ruminantium* and certain members of the genus *Ehrlichia*. Onderstepoort J. Vet. Res. 54: 331.
- HOLLAND, C. J. et RISTIC, M. 1991. Development of a cell line for continuous in vitro propagation of *Ehrlichia canis*. In J. Kazar and D. Raoult (ed.), Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Proceedings of the 14th International Symposium, October 1-6, 1990. Slovak Academy of Science, Bratislava, Czechoslovakia, 1991, p. 771-775.
- HOLLAND, C. J., RISTIC, M., COLE, A. I., JOHNSON, P., BAKER, G. et GOETZ, T. 1985a. Isolation, experimental transmission, and characterization of causative agent of Potomac horse fever. Science 227: 522-524.
- HOLLAND, C. J., WEISS, E., BURGDORFER, W., COLE, A. I. et KAKOMA, I. 1985b. *Ehrlichia risticii* sp. nov.: etiological agent of equine monocytic ehrlichiosis (synonym, Potomac horse fever). Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 524-526.
- HOSKINS, J. D., BREITSCHWERDT, E. B., GAUNT, S. D., FENCH, T. W. et BURGDORFER, W. 1988. Antibodies to *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys* and spotted fever group rickettsiae in Louisiana dogs. J. Vet. Int. Med. 2: 55-59.
- HUDSON, J. R. 1950. The recognition of tick-borne fever as a disease of cattle. Brit. Vet. J. 106: 3-17.
- HUXSOLL, D. L. 1976. Canine ehrlichiosis (Tropical canine pancytopenia): a review. Vet. Parasitol. 2: 49-60.
- HUXSOLL, D. L., AMYX, H. L., HEMELT, I. E., HILDEBRANDT, P. K., NIMS, R. M. et COCHENOUR, W. S. 1972. Laboratory studies of tropical canine pancytopenia. Vet. Parasitol. 31: 53-59.

HUXSOLL, D. L., HILDEBRANDT, P. K., NIMS, R. M. et WALKER, J. S. 1970. Tropical canine pancytopenia. J. Am. Vet. Med. Assoc. 157: 1627-1632.

J

JAENSON, T. G. T. et TÄLLEKLINT, L. 1992. Incompetence of roe deer as reservoir of the Lyme borreliosis spirochete. J. Med. Entomol. 29 : 813-817.

JAMIESON, S. 1947. Some aspects of immunity to tick-borne fever in hogs. Vet. Rec. 59: 201-202.

JAMIESON, S. 1950. Tick-borne fever as a cause of abortion in sheep. Part II. Vet. Rec. 62: 468-470.

JONGEJAN, F. et WASSINK, L. A. 1991. Lack of cross-protection between *Cowdria ruminantium* and *Ehrlichia phagocytophila*. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 44: 425-428.

JONGEJAN, F., WASSINK, L. A., THIELEMANS, M. J. C., PERIE, N. M. et UILENBERG, G. 1989. Serotypes in *Cowdria ruminantium* and their relationship with *Ehrlichia phagocytophila*. Vet. Microbiol. 21: 31-40.

JUSTE, R. A., SCOTT, G. R., FAXTON, E. A., GELABERT, J. L. et JIMENEZ, S. 1989. Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. Vet. Rec. 124: 636.

JUSTE JORDAN, R. A., GARCIA PEREZ, A. et POVEDANO FERNANDEZ, I. 1986. Estudio experimental de algunos agentes patógenos transmitidos por garrapatas (*Babesia*, *Theileria*, *Cytoecetes* y *Anaplasma*) en ovejas del País Vasco. Medicina Veterinaria 3: 431-439.

K

KAKOMA, I., CARSON, C. A. et RISTIC, M. 1980. Direct and indirect lymphocyte participation in the immunity and immunopathology of tropical canine pancytopenia. A review. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 3: 291-298.

KAKOMA, I., CARSON, C. A., RISTIC, M., STEPHENSON, E. M., HILDEBRANDT, P. K. et HUXSOLL, D. L. 1978. Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. Infect. Immun. 20: 242-247.

KAWAHARA, M., SUTO C., RIKIHISA, Y., YAMAMOTO, S. et TSUBOI, Y. 1993. Characterization of ehrlichial organisms isolated from a wild mouse. J. Clin. Microbiol. 31: 89-96.

KRAUSS, H., DAVIES, F. G., ØDEGAARD, Ø. A. et COOPER, J. E. 1972. The morphology of the causal agent of bovine petechial fever (Ondiri disease). J. Comp. Pathol. 82: 241-246.

KUEHN, N. F. et GAUNT, S. D. 1985. Clinical and haematologic findings in canine ehrlichiosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 186: 355-358.

KUIL, H., MOLENKAMP, G. J., MEYER, J. C. et MEYER, P. 1972. Tick-borne-fever in cattle in the Netherlands. Neth. J. Vet. Sci. 5: 61-63.

L

- LEWIS, D. 1977. Localization of the Tick-borne fever agent in the tick, *Ixodes ricinus*. *Parasitology* 75: XXXIV-XXXVIII.
- LEWIS, D. 1979. The detection of rickettsia-like micro-organisms within the ovaries of female *Ixodes ricinus* ticks. *Z. Parasitenk.* 59: 299-301.
- LEWIS, D. 1980. The sheep tick and tick-borne fever. PhD Thesis, University of Leeds.
- LEWIS, G. E. Jr. 1976. Equine ehrlichiosis: a comparison between *Ehrlichia equi* and other pathogenic species of *Ehrlichia*. *Vet. Parasitol.* 2: 61-74.
- LEWIS, G. E. Jr., HILL, S. L. et RISTIC, M. 1978. Effect of canine immune serum on the growth of *Ehrlichia canis* within non-immune canine macrophages. *Am. J. Vet. Res.* 39: 71-76.
- LEWIS, G. E. Jr., HUXSOLL, D. L., RISTIC, M. et JOHNSON, A. J. 1975. Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.* 36: 85-88.
- LEWIS, G. E. Jr. et RISTIC, M. 1978. Effect of canine immune macrophages and canine immune serum on the growth of *E. canis*. *Am. J. Vet. Res.* 39: 77-82.
- LEWIS, G. E. Jr., RISTIC, M., SMITH, R. D., LINCOLN, T. et STEPHENSON, E. H. 1977. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.* 38: 1953-1955.
- LITTLEJOHN, A. J. 1950. Tick-borne fever as a cause of abortion in sheep. *Vet. Rec.* 62: 577-579.
- LIZ, J. et PFISTER, K. 1989. Enquête sur l'ehrlichiose bovine ("fièvre de pâture") en Suisse. *Swiss Vet* 5: 7-8.
- LIZ, J., AESCHLIMANN, A. et PFISTER, K. 1990. Tick-borne fever (*Ehrlichia phagocytophila*) as a significant disease of cattle in Switzerland. In J. Kazar and D. Raoult (ed.), *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*. Proceedings of the IVth International Symposium, October 1-6, 1990. Slovak Academy of Science, Bratislava, Czechoslovakia, 1991, p. 740-750.
- LOGAN, L. L., WHYARD, T. C., QUINTERO, J. C. et MEBUS, C. A. 1987. The development of *Cowdria ruminantium* in neutrophils. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54: 197-204.

M

- MACKELLAR, J. C. et DONNELLY, J. 1968. Tick-borne diseases of cattle. *Vet. Rec.* 83: 609.
- MACLEOD, J. 1932. Preliminary studies in the tick transmission of louping-ill. II. A study of the reaction of the sheep to tick infestation. *Vet. Rec.* 88: 276-284.
- MACLEOD, J. 1936. Studies in tick-borne fever of sheep. II. Experiments on transmission and distribution of the disease. *Parasitology* 28: 320-329.

- MACLEOD, J. et GORDON, W. S. 1933. Studies in tick-borne fever of the sheep. I. Transmission by the tick *Ixodes ricinus* with a description of the disease produced. *Parasitology* 25: 273-283.
- MAEDA, K., MARKOWITZ, N., HAWLEY, R. C., RISTIC, M., COX, D. et MCDADE, J. E. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N. Engl. J. Med.* 316 : 853-856.
- MATHER, T. N., WILSON, M. L., MOORE, S. I., RIBEIRO, J. M. C. et SPIELMAN, A. 1989. Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Am. J. Epidemiol.* 130: 143-150.
- MATILE, H. 1982. Etudes virologiques et épidémiologiques sur l'encéphalite à tiques en Suisse. Thèse ès Sciences, Université de Neuchâtel.
- MATUSCHKA, F. R., FISCHER, P., MUSGRAVE, K., RICHTER, D. et SPIELMAN, A. 1991. Hosts on which nymphal *Ixodes ricinus* most abundantly feed. *Am. J. Med. Hyg.* 44: 100-107.
- MATUSCHKA, F. R., HEILER, M., EIFFERT, H., FISCHER, P., LOTTER, H. et SPIELMAN, A. 1993. Diversionary role of hoofed game in the transmission of the Lyme disease spirochetes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48 : 693-699.
- MCDADE, J. E. 1990. Ehrlichiosis - a disease of animals and humans. *J. Infect. Dis.* 161 : 609-617.
- MCDIARMID, A. 1965. Modern trends in animal health and husbandry. Some infectious diseases of free-living wildlife. *Brit. Vet. J.* 121: 245-257.
- MCEWEN, A. D. 1947. Tick-borne fever in young lambs. *Vet. Rec.* 59: 198-201.
- MERMOD, C., AESCHLIMANN, A. et GRAF, J. F. 1973. Ecologie et éthologie d'*Ixodes ricinus* L. 1758, en Suisse (*Acarina, Ixodoidea*). 1ère note: Fluctuations numériques. *Acarologia* 15: 197-205
- MISAO, T. et KOBAYASHI, Y. 1955. Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). I. Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow, and lymph node of a patient with infectious mononucleosis by using mice. *Kyushu J. Med. Sci.* 115: 145-152.
- MITSUI, Y. M., FUJIMOTO, M. et KAJIMA, M. 1964. Development and morphology of thracoma agent in yolk sac cell as revealed by electron microscopy. *Virology* 23: 30-45.
- MONTENEGRO-JAMES, S., JAMES, M. A. et RISTIC, M. 1985. Modified indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infections in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 46: 2401-2403.
- MORAIS, J., DAWSON, J. E., GREENE, C., FILIPE, A. R., GALHARDAS, L. C. et BACELLAR, F. 1991. First European case of ehrlichiosis. *Lancet.* 338 : 633-634.
- MORISOD, A., BROSSARD, M., LAMBERT, C., SUTER, H. et AESCHLIMANN, A. 1972. *Babesia bovis*: transmission par *Ixodes ricinus* (*Ixodoidea*) dans la plaine du Rhône. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 114: 387-394.
- MOSHKOSVSKI, C. 1937. Sur l'existence chez le cobaye d'une rickettsiose chronique déterminée par *Ehrlichia kurlowski* (*Rickettsia kurlowi* subgen, sp. nov. C.R. Séanc. Soc. Biol. 126: 379-382.

MUNRO, R., HUNTER, A. R., MCKENZIE, G. et MCMARTIN, D. A. 1982. Pulmonary lesions in sheep following experimental infection by *Ehrlichia phagocytophila* and *Chlamydia psittaci*. J. Comp. Path. 92: 117-132.

N

NAYLOR, P. F. et LITTLE, T. W. A. 1975. A simple method for isolating leucocytes from bovine blood and their separation into lymphocyte and granulocyte fractions. Res. Vet. Sc. 18: 336-337.

NIMS, R. M., FERGUSON, J. A., WALKER, J. L., HILDEBRAND, P. K., HUXSOLL, D. L., REARDON, M. J., VARLEY, J. E., KOLAJA, G. J., WATSON, W. T., SHROJER, E. L., ELWELL, P. A. et VACURA, G. W. 1971. Epizootiology of tropical canine pancytopenia in Southeast Asia. J. Am. Vet. Med. Assoc. 158: 53-63.

NYINDO, M., HUXSOLL, D. L. et RISTIC, M. 1980. Cell-mediated and humoral immune response of german shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. Am. J. Vet. Res. 41: 250-254.

NYINDO, M. B. A., RISTIC, M., HUXSOLL, D. L. et STEPHENSON, E. H. 1978. Immune responses of ponies to experimental infection with *Ehrlichia equi*. Am. J. Vet. Res. 39: 15-18.

O

OHTAKI, S. et SHISHIDO, A. 1965. Studies on infectious mononucleosis induced in the monkey by experimental infection with *Rickettsia sennetsu*. [I. Pathological findings. Jpn J. Med. Sci. Biol. 18: 85-99.

ÖVERÅS, J. 1959. Tick-borne fever (Sjodogg) as the cause of abortion in ewe. Nord. Vet.-Med. 11: 475-482.

ÖVERÅS, J. et HUNSHAMAR, P. 1962. Tick-borne fever ("sjodogg") hos storfe. Nord. Vet. Med. 14: 631-641.

P

PAXTON, E. A. et SCOTT, G. R. 1989. Detection of antibodies to the agent of tick-borne fever by indirect immunofluorescence. Vet. Microbiol. 21: 133-138.

PETER, O. 1985. Présence d'anticorps contre la "rickettsie suisse" chez les mammifères sauvages et domestiques du canton de Neuchâtel. Schweiz. Arch. Tierheilk. 127: 461-468.

PFISTER, K., ROESTI, A., BOSS, P. H. et BALSIGER, B. 1987. *Ehrlichia phagocytophila* als Erreger des "Weidefiebers" in Berner Oberland. Schweiz. Arch. Tierheilk. 129: 343-347.

- PIERCY, S. E. 1953. Bovine infectious petechial fever. *East Afr. Agr. J.* 19: 65-68.
- PRETZMAN, C. I., RIKIHISA, Y., RALPH, D., GORDON, J. C. et BECH-NIELSON, S. 1987. Enzyme-linked immunosorbent assay for Potomac horse fever disease. *J. Clin. Microbiol.* 25: 31-36.
- PURNELL, R. E. et BROCKLESBY, D. W. 1978. Isolation of a virulent strain of *Ehrlichia phagocytophila* from the blood of cattle in the Isle of Man. *Vet. Rec.* 102: 552-553.
- PURNELL, R. E., BROCKLESBY, D. W., HENDRY, D. J. et YOUNG, E. R. 1976a. Separation and recombination of *Babesia divergens* and *Ehrlichia phagocytophila* from a field case of redwater from Eire. *Vet. Rec.* 99: 415-417.
- PURNELL, R. E., YOUNG, E. R., BROCKLESBY, D. W. et HENDRY, D. J. 1977. The haematology of experimentally-induced *B. divergens* and *E. phagocytophila* infections in splenectomised calves. *Vet. Rec.* 100: 4-6.

Q

- QUENET, G. 1978. Quelques observations sur la piroplasmose bovine dans le Jura. Thèse de Médecine Vétérinaire, Berne.

R

- REARDON, M. J. et PIERCE, K. R. 1981. Acute experimental canine ehrlichiosis: I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Vet. Pathol.* 18: 48-61.
- REID, H. W., BUXTON, D., BRODIE, T. A., PDW, P. H. et URQUART, G. H. 1986. Response of sheep to experimental concurrent infection with tick-borne fever (*Cyloecetes phagocytophila*) and louping-ill virus. *Res. Vet. Sci.* 41: 56-62.
- RETIEF, G. P., NEITZ, W. O. et MCFARLANE, I. S. 1971. Observations on the effect of tick-borne fever (*Cyloecetes phagocytophila* Foggie, 1949) on the spermatogenesis of bulls. *J. South Afr. Med. Assoc.* : 321-325.
- RIKIHISA, Y. 1991. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 286-308.
- RIKIHISA, Y., EWING, S. A., FOX, J. C., SIREGAR, A. G., PASARIBU, F. H. et MALOLE, M. B. 1992. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* Infection. *J. Clin. Microbiol.* 30: 143-148.
- RIKIHISA, Y., JOHNSON, G. C. et BURGER, C. J. 1987. Reduced immune responsiveness and lymphoid depletion in mice infected with *Ehrlichia risticii*. *Infect. Immun.* 55: 2215-2222.
- RIKIHISA, Y. et PERRY, B. D. 1985. Causative ehrlichial organisms in Potomac horse fever. *Infect. Immun.* 49 : 513-517.

- RISTIC, M. 1986. Pertinent characteristics of leukocytic rickettsiae of humans and animals, p. 182-187. *In* L. Leive (ed.), Microbiology 1986. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
- RISTIC, M., HOLLAND, C. J., DAWSON, J. E., SESSIONS, J. et PALMER, J. 1986. Diagnosis of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever) by indirect immunofluorescence. J. Am. Vet. Med. Assoc. 189: 39-46.
- RISTIC, M., HUXSOLL, D. L., WEISIGER, R. M., HILDEBRANDT, P. K. et NYINDO, B. A. 1972. Serological diagnosis of Tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. Infect. Immun. 6: 226-231.
- RISTIC, M. et HUXSOLL, D. L. 1984. Tribe II: *Ehrlichieae*, p. 704-709. *In* N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's Manual of the Systematic Bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore
- RYLEY, V. 1960. Adaptation of orbital bleeding technic to rapid serial blood studies. Proc. Soc. Exp. Biol. 104: 751-754.

S

- SELLS, D. M., HILDEBRANDT, P. K., LEWIS, G. E. Jr., NYINDO, M. B. A. et RISTIC, M. 1976. Ultrastructural observations on *Ehrlichia equi* organisms in equine granulocytes. Infect. Immun. 13: 273-280.
- SIMPSON, C. F. 1972. Structure of *Ehrlichia canis* in blood monocytes of dog. Am. J. Vet. Res. 33: 2451-2454.
- SIMPSON, C. F. 1974. Relationship of *Ehrlichia canis*-infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. Infect. Immun. 10: 590-596.
- SIMPSON, R. M., GAUNT, S. D., HAIR, J. A., KOCAN, K. M., HENK, W. G. et CASEY, H. W. 1991. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. Am. J. Vet. Res. 52: 1537-1541.
- SMITH, R. D. et RISTIC, M. 1977. Ehrlichiae, p. 295-328. *In* Parasitic Protozoa, vol. 4, J. P. Krier, Academic Press Inc., New York.
- SMITH, R. D., RISTIC, M., HUXSOLL, D. L. et BAYLOR, R. A. 1975. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. Infect. Immun. 11: 1216-1221.
- SMITH, R. D., SELLS, D. M., STEPHENSON, E. H., RISTIC, M. et HUXSOLL, D. L. 1976. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. Am. J. Vet. Res. 37: 119-126.
- SNODGRAS, D. R. et RAMACHANDRAN, S. 1971. A complement fixation test for tick-borne fever in sheep. Brit. Vet. J. 127: 44-46.
- STAMP, J. T. 1950. Abortion of sheep. Vet. Rec. 62: 778-785.

- STAMP, J. T. et WATT, J. A. 1950. Tick-borne fever as a cause of abortion in sheep. Part I and II. *Vet. Rec.* 62: 465-470.
- STANNARD, A. A., GRIBBLE, D. M. et SMITH, R. S. 1969. Equine ehrlichiosis: a disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. *Vet. Rec.* 84: 149-150.
- STEWARD, W. L. 1936. A statement in connection with a discussion of abortion in ewes. *Vet. Rec.* 48: 1225-1232.
- STOCKHAM, S. L., SCHMIDT, D. A. et TYLER, J. W. 1985. Canine granulocytic ehrlichiosis in dogs from central Missouri: a possible cause of polyarthritis. *Vet. Med. Rev.* 6: 3-5.
- STREIT, M. 1993. Zur Klinik, Hämatologie und Epidemiologie des Ehrlichiose (Weidefieber) beim Rind. Thèse de Médecine Vétérinaire, Université de Berne.

T

- TAYLOR, A. W., HOLMAN, H. H. et GORDON, W. S. 1941. Attempts to reproduce the pyaemia associated with tick-bite. *Vet. Rec.* 53: 339-344.
- TAYLOR, S. M. et KENNY, J. 1980. The effects of tick-borne fever (*Ehrlichia phagocytophila*) on the growth rate of fattening cattle. *Brit. Vet. J.* 136: 364-370.
- TAYLOR, S. M., KENNY, J., PURNELL, R. E. et LEWIS, D. 1980. Exposure of cattle immunised against redwater to tick challenge in the field: challenge by a heterologous strain of *B. divergens*. *Vet. Rec.* 106: 385-387.
- THORSHAUG, K. 1940. "Sjødorgy" tick-borne fever haus sau i Norge. *Beretu.* 5. nord. *Vet.-mde. Kbh* 139: 324-330.
- THRUSFIELD, M. V., SYNGE, B. A. et SCOTT, G. R. 1978. Attempts to cultivate *Ehrlichia phagocytophila* in vitro. *Vet. Microbiol.* 2: 257-260.
- TIZARD, I. 1987. *Veterinary Immunology: an introduction*. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- TROY, G. C., VULGAMOTT, J. C. et TURNWALD, G. H. 1980. Canine ehrlichiosis: a retrospective survey of 30 naturally occurring cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 16: 181-187.
- TSCHUDI, P. 1985. *Haematologie, klinisch-chemische Referenzwerte von Pferd, Rind, Schwein, Hund, Katze und Geflügel*. Skript der Vet. med. Fakultät der Universität Bern.
- TUKEY, J. W. 1977. *Exploratory data analysis*. Addison-Wesley, Reading, Massachusetts.
- TUOMI, J. 1965. Bovine tick-borne fever in Finland. *Suom. Eläinlääk. L.* 71: 1-31 (translation from Finnish).
- TUOMI, J. 1966. Studies in epidemiology of bovine tick-borne fever in Finland and a clinical description of field cases. *Ann. Med. Exp. Fenn.* 44: 1-62.

TUOMI, J. 1967a. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 1. Clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 70: 429-445.

TUOMI, J. 1967b. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 2. Differences in virulence of strains in bovine and sheep. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 70: 577-589.

TUOMI, J. 1967c. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 3. Immunological strain difference. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 71: 89-100.

TUOMI, J. 1967d. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 4. Immunofluorescent staining of antigenic relationship between strains. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 71: 101-108.

TUOMI, J. 1967e. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 5. Sensitivity of the causative agent to some antibiotics and to sulphamethazine. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 71: 109-113.

TUOMI, J. et VON BONSDORFF, C. H. 1966. Electron microscopy of tick-borne fever agent in bovine and ovine phagocytizing leukocytes. *J. Bacteriol.* 92: 1478-1492.

TUTT, J. B. et LOVING, C. 1955. Tick-borne fever in dairy cattle. *Vet. Rec.* 67: 866.

TYZZER, E. E. 1938. *Cytoecetes microti*, N.G., n. sp., a parasitic developing in granulocytes and infective for small rodents. *Parasitology* 30: 242-257.

U

UHAA, I. J., MACLEAN, J. D., GREENE, C. R. et FISHBEIN, D. B. 1992. A case of human ehrlichiosis acquired in Mali: clinical and laboratory findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 161-164.

V

VAN MIERT, A. S. J. P. A. M., VAN DUIN, C. T. M., SCHOTMAN, A. J. H. et FRANSEN, F. F. 1984. Clinical, haematological and blood biochemical changes in goats after experimental infection with tick-borne fever. *Vet. Parasitol.* 16: 225-233.

VAN VLIET, A. H. M., JONGEJAN, F. et VAN DER ZEIJST, B. A. M. 1992. Phylogenetic position of *Cowdria ruminantium* (*Rickettsiales*) determined by analysis of amplified 16S ribosomal DNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 494-498.

VENN, J. A. J. et WOODFORD, M. H. 1956. An outbreak of tick-borne fever in bovines. *Vet. Rec.* 68: 132-133.

W

WADDLE, J. R. et LITTMAN, M. P. 1988. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 24: 615-620.

WALKER, J. S., RUNDQUIST, J., TAYLOR, R., WILSON, B. L., ANDREWS, M. R., BARCK, J., HOGGE, A. J., HUXSOLL, D. L., HILDEBRANDT, P. K. et NIMS, R. M. 1970. Clinical and clinicopathologic findings in Tropical canine pancytopenia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 157: 43-55.

WATSON, W. A. 1964. Infertility in the ram associated with tick-borne fever infection. *Vet. Rec.* 76: 1131-1136.

WEBSTER, K. A. et MITCHELL, G. B. B. 1988. Use of counter immunoelectrophoresis in detection of antibodies to tick-borne fever. *Res. Vet. Sci.* 45: 28-30.

WEBSTER, K. A. et MITCHELL, G. B. B. 1989. An electron microscopic study of *Cytoecetes phagocytophila* infection in *Ixodes ricinus*. *Res. Vet. Sci.* 47: 30-33.

WEISIGER, R. M., RISTIC, M. et HUXSOLL, D. L. 1975. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. *Am. J. Vet. Res.* 36: 689-694.

WEISS, E. et DASCH, G. A. 1992. The genera *Rickettsia*, *Rochalimaea*, *Ehrlichia*, *Cowdria* and *Neorickettsia*, p. 2407-2470. In: *The Prokaryotes*, 2nd Edit. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

WEISS, E. et MOULDER, J. M. 1984. Order I: *Rickettsiales*, p. 687-704. In: N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of the Systematic Bacteriology*, vol. I. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

WILLIAMS, J. C. et VODKIN, M. H. 1987. Metabolism and genetics of chlamydias and rickettsias. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54: 2111-221.

WILSON, J. C., FOGGIE, A. et CARMICHAEL, M. A. 1964. Tick-borne fever as a cause of abortion and still-birth in cattle. *Vet. Rec.* 76: 1081-1084.

WINKLER, G. C., ARNOLD, P., DEPLAZES, P., GLARDON, O. et LUTZ, H. 1988. Klinische und serologische Diagnose von Ehrlichiose bei Hunden in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 130: 357-367.

WOLDEHIWET, Z. 1981. Observations on the immune responses of sheep infected with *Cytoecetes phagocytophila*. PhD. Thesis, University of Edinburgh.

WOLOEHIWET, Z. 1987a. The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. *J. Comp. Pathol.* 97: 481-485.

WOLDEHIWET, Z. 1987b. Depression of lymphocyte response to mitogens in sheep infected with tick-borne fever. *J. Comp. Path.* 97: 637-643.

WOLDEHIWET, Z. et SCOTT, G. R. 1982a. In vitro propagation of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever. *Vet. Microbiol.* 7: 127-133.

-
- WOLDEHIWET, Z. et SCOTT, G. R. 1982b. Stages of development of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever. *J. Comp. Pathol.* 92: 469-474.
- WOLDEHIWET, Z. et SCOTT, G. R. 1982c. Corticosteroid therapy of tick-borne fever. *Vet. Rec.* 110: 151-152.
- WOLDEHIWET, Z. et SCOTT, G. R. 1982d. Immunological studies on tick-borne fever. *J. Comp. Pathol.* 92: 457-467.
- WOLDEHIWET, Z. et SCOTT, G. R. 1982e. Tick-borne fever: leucocytes migration inhibition. *Vet. Microbiol.* 7: 437-445.
- WOODY, B. J. et HOSKINS, J. D. 1991. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet. Clin. North America Small Anim. Pract.* 21: 75-98.
- WYLER, R., SCHMIDTKE, W., KUNZ, A., RADDA, A., HENN, V. et MEYER, R. 1973. Zeckenzephalitis in der Region Schaffhausen: Isolierung des Virus aus Zecken und serologische Untersuchungen. *Schweiz. med. Wschr.* 103: 1487-1492.
- WYSSMAN, E. 1922. Anfrage betreffend Rinderpiroplasmose. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 64: 352-353.