

-SOMMAIRE-

Sommaire	1
Liste des abréviations	5
Liste des illustrations	6
Introduction	10

I. Bilan des connaissances actuelles

A. La néosporose, une maladie cosmopolite	12
1. Une répartition mondiale	12
1.1. <i>Chez les bovins</i>	12
1.2. <i>Chez le chien</i>	14
1.3. <i>Séroprévalence dans la faune sauvage</i>	14
2. Neospora, un agent pathogène pour de nombreuses espèces	17
2.1. <i>Le pouvoir pathogène de Neospora</i>	17
2.2. <i>Chez le chien</i>	18
2.3. <i>Chez les bovins</i>	19
2.4. <i>Chez les petits ruminants</i>	23
2.5. <i>Chez les chevaux</i>	23
2.6. <i>Chez les espèces de la faune sauvage</i>	25
2.7. <i>Un risque pour l'homme ?</i>	25
3. Les conséquences économiques	26
B. Le cycle de développement et ses conséquences pour l'épidémiologie et la lutte contre la néosporose	28
1. Le cycle de développement	28
1.1. <i>Les formes parasitaires</i>	28
1.2. <i>Un cycle coccidien dixène</i>	31

2. Les sources de parasite.	34
2.1. <i>Une grande variété d'hôtes intermédiaires sources de kystes tissulaires.</i>	34
2.2. <i>Le chien, un hôte définitif source d'oocystes.</i>	37
3. Les modalités de transmission.	39
3.1. <i>La transmission verticale.</i>	39
3.2. <i>La transmission horizontale.</i>	40
3.3. <i>Les facteurs favorisant l'infection.</i>	43
4. Les conséquences en terme de lutte contre la néosporose.	43
4.1. <i>Les mesures de lutte offensive.</i>	43
4.1.1. <i>Des moyens thérapeutiques encore limités.</i>	43
4.1.2. <i>Les mesures entreprises pour l'assainissement du troupeau.</i>	45
4.2. <i>Les mesures défensives.</i>	45
3.2.1. <i>La prévention de la transmission verticale.</i>	45
3.2.2. <i>La prévention de la transmission horizontale.</i>	46
C. Les méthodes de diagnostic	48
1. Les méthodes expérimentales de diagnostic.	48
1.1. <i>Les techniques sérologiques</i>	48
1.1.1. <i>L'IFI.</i>	48
1.1.2. <i>L'ELISA.</i>	49
1.1.3. <i>Le Western-blot.</i>	52
1.1.4. <i>La séro-agglutination.</i>	53
1.2. <i>Les méthodes directes.</i>	53
1.2.1. <i>L'examen nécropsique et histologique.</i>	53
1.2.2. <i>Immunohistochimie.</i>	55
1.2.3. <i>La culture cellulaire et l'inoculation.</i>	56
1.2.4. <i>L'examen coprologique.</i>	57
1.2.5. <i>L'amplification génique par PCR.</i>	57
2. Application au diagnostic de terrain.	60
2.1. <i>Valeur des techniques pour un diagnostic individuel.</i>	60
2.2. <i>Diagnostic de néosporose à l'échelle du troupeau.</i>	61

II. Etude expérimentale.	64
A. Matériel et méthode.	65
1. Etudes sérologiques chez des ruminants et renards sauvages.	65
1.1. Les groupes d'animaux testés.	65
1.2. Les tests utilisés.	65
2. Recherche de l'ADN de <i>Neospora caninum</i> dans les organes et fèces de renards sauvages.	67
2.1. Les groupes d'animaux étudiés.	67
2.2. Flotation et lyse des ookystes.	67
2.3. Préparation des encéphales.	67
2.4. Extraction de l'ADN.	67
2.5. Amplification et révélation de l'ADN.	68
2.6. Séquençage.	68
B. Résultats.	69
1. Caractéristiques des populations sauvages étudiées.	69
1.1. Origine des animaux.	69
1.2. Sexe des animaux.	69
1.3. Années de prélèvement.	69
1.4. Age des animaux.	70
2. Séroprévalence dans la faune sauvage.	71
2.1. Chez les ruminants sauvages.	71
2.2. Chez le renard roux.	71
2.3. Etude comparative des tests sérologiques.	72
2.4. Influence de l'âge, du sexe, et de l'année de prélèvement.	73
3. Résultats des PCR.	74
3.1. Sur les organes.	74
3.2. Sur les fèces.	76
4. Résultats du séquençage.	77
5. Résultats de l'observation microscopique.	77
C. Discussion.	78
1. A propos des techniques utilisées.	78
1.1. Comparaison des techniques sérologiques.	78

1.2. Valeur de la technique d'amplification génique.....	79
2. Les ruminants sauvages : un réservoir pour <i>Neospora caninum</i>.....	81
3. Le rôle du renard dans le cycle de <i>Neospora caninum</i>.	82
3.1. Un rôle d'hôte intermédiaire confirmé.	82
3.2. Un rôle d'hôte définitif encore hypothétique.	84
Conclusion.	87
Annexes.	89
Bibliographie.	107

-LISTE DES ABREVIATIONS-

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
BoHV-1	Bovin HerpesVirus type 1 (Herpesvirus bovin de type 1)
BVD	Bovin Viral Diarrhoea (Diarrhée virale bovine)
dNTP	diNucléotides Tri-Phosphates
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
DAT	Direct Agglutination Test (Séroagglutination)
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test (Immunofluorescence indirecte)
IgG	Immunoglobuline G
ITS-1	Internal Transcribed Spacer-1 (Transcrit interne – 1)
LDV-14	Laboratoire Départemental Vétérinaire du Calvados (14)
Nc	<i>Neospora caninum</i>
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PM	Poids Moléculaire

-LISTE DES ILLUSTRATIONS-

✓ **Tableaux :**

Tableau 1 : Séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* dans les cheptels bovins laitiers de différents pays Européens. (D'après Hemphill et al., 2000)

Tableau 2 : Séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* chez le chien (IFI ou ELISA) dans différents pays.

Tableau 3 : Résultats des études de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* chez les ruminants sauvages.

Tableau 4 : Séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* chez les carnivores sauvages dans le monde.

Tableau 5 : Facteurs de risques associées aux avortements à *Neospora caninum*.

Tableau 6 : Récapitulatif des cas de néosporose équine (d'après Pronost et al., 2000)

Tableau 7 : Séroprévalence chez les chevaux de l'infection à *Neospora* sp. en France, en Argentine, au Brésil et aux États-Unis. (D'après Pronost et al., 2000)

Tableau 8 : Résultats de l'infestation des espèces hôtes intermédiaires expérimentales.

Tableau 9 : Circonstances de la découverte des espèces hôtes intermédiaires naturelles.

Tableaux 10 : Etudes de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* réalisées chez le buffle d'eau (*Bubalus bubalis*)

Tableau 11 : Principe et performance des principales méthodes ELISA développées pour le diagnostic sérologique de la néosporose. (D'après Björkman et Uggla 1999)

Tableau 12: Prélèvements et conditions d'envoi des échantillons pour les différentes techniques de diagnostic de la néosporose. (D'après Pittel et al, 2001c.)

Tableau 13 : Tests sérologiques utilisés pour l'étude de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* dans la faune sauvage.

Tableau 14 : Paramètres utilisés pour la réalisation de l'amplification de l'ADN de *Neospora caninum* dans l'étude expérimentale.

Tableau 15 : Résultats des amplifications spécifiques de l'ADN de *Neospora caninum* réalisées sur les fèces, les utérus gravides et les cerveaux de renards sauvages.

✓ **Figures :**

Fig. 1 : Carte de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* dans les avortements bovins en France. (D'après F. Payot thèse Alfort 2002)

Fig. 2 : Physiopathogénie de l'infection par *Neospora caninum* chez les bovins et conséquences pour le fœtus (d'après Dubey et Lindsay, 1996).

Fig. 3 : Conséquences économiques engendrées par *Neospora caninum* dans les élevages. (D'après Trees et al., 1999)

Fig. 4 : Photographies de kystes tissulaires.

Fig. 5-5' : Photographies de tachyzoïtes.

Fig. 6 : Photographies d'oocystes sporulés.

Fig. 7 : Cycle de développement de *Neospora caninum*.

Fig. 8 : Principales voies de contamination par *Neospora caninum* dans les élevages bovins. (D'après McAllister).

Fig. 9 : Principe de la technique de détection des anticorps anti-*Neospora caninum* par immunofluorescence indirecte (Dubey et al., 1988b)

Fig. 10 : Principe de la technique de détection des anticorps anti-*Neospora caninum* par ELISA indirecte.

Fig. 11 : Fréquence des lésions observées au cours d'une étude portant sur 82 fœtus bovins (D'après Barr et al., 1990).

Fig. 12 : Principe de la recherche de *Neospora caninum* par immunohistochimie.

Fig. 13 : Mécanisme de la méthode d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Fig. 14 : Protocole de diagnostic en vue d'une lutte raisonnée contre la néosporose en élevage bovin.

Fig. 15 : Histogramme de répartition des années de prélèvements des animaux testés en sérologie pour l'étude de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum*.

Fig. 16 : Histogramme de répartition des âges des ruminants sauvages testés en sérologie.

Fig. 17 : Histogramme de répartition des titres en anticorps anti-*Neospora* dans les sérums de ruminants et de renards sauvages testés en séro-agglutination.

Fig. 18 : Histogramme de répartition des résultats de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* chez les chevreuils par classe d'âge.

Fig. 19-22 : Photographies de gels de migration des produits de PCR réalisés sur les encéphales et fèces de renards sauvages.

Fig. 23 : Séquence de l'ADN de *Neospora caninum* amplifié à partir d'encéphale de renards sauvages.

✓ **Annexes :**

Annexe 1: Tableau illustrant l'impact de la néosporose bovine dans différents pays hormis l'Europe.

Annexe 2 : Tableau illustrant l'impact de la néosporose bovine dans différents pays européens.

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des lésions et manifestations cliniques observées chez les chiens atteints de néosporose.

Annexe 4 : Classification simplifiée de l'embranchement des Sporozoaires d'intérêt vétérinaire.(D'après Bussiéras et Chermette.)

Annexe 5 : Tableau récapitulatif des caractéristiques morphologiques et biologiques des principales coccidies Eimeriidae pathogènes.

Annexe 6 : Tableau récapitulatif des caractéristiques phénotypiques des espèces courantes des genres *Neospora*, *Hammondia* et *Toxoplasma*. (Mugdridge et al. 1999)

Annexe 7 : Relation phylogénique des coccidies Eimeriidae obtenue à partir de l'analyse de la séquence du gène 28S rRNA (Mugridge, 2002). (D'après Tenter et al. 2002)

Annexe 8 : Avantages et limite des techniques de diagnostic de la néosporose.
(D'après Pittel et al., 2001c)

Annexe 9 : Protocole d'extraction de l'ADN utilisé pour la présente étude expérimentale (Kit Quiagen).

Annexe 10 : Origine géographique des prélèvements sanguins d'animaux sauvages testé en sérologie anti-Nc et des sérums (en rouge) ayant des anticorps en agglutination (titre supérieur ou égal au 1/40).

Annexe 11 : Nombre d'animaux testés séropositifs en néosporose dans les différentes espèces en fonction de l'années de prélèvement.

Annexe 12 : Nombre d'animaux testés séropositifs dans les différentes espèces en fonction de leur âge.

Annexe 13 : Nombre d'animaux testés (en noir) et d'animaux séropositifs en néosporose dans les différentes espèces en fonction de l'âge des animaux

Annexe 14 : Résultats de la recherche d'anticorps par les techniques ELISA indirecte et ELISA compétitive, chez les ruminants sauvages et sangliers.

Annexe 15 : Statut sérologique des ruminants, à l'égard de *Neospora caninum* en agglutination. Analyses réalisées par l'Institut de puériculture-Paris.

Annexe 16 : Résultats sérologiques anti-Nc des renards testés par ELISA direct (Biovet) et ELISA par compétition (VMRD)

Annexe 17 : Résultats de l'agglutination réalisée sur les sérums de renards sauvages.

Annexes 18-26 : Tableaux de corrélation des résultats obtenus avec les différents tests sérologiques utilisés pour la recherche d'anticorps anti-Nc chez les ruminants et les renards sauvages.

- Introduction -

Neospora caninum, décrit pour la première fois dans l'espèce canine (Bjerkas *et al.*, 1984), est un protozoaire reconnu depuis une dizaine d'années comme une cause d'avortements en élevage bovin (Shivasprasad *et al.*, 1989 ; Thilsted et Dubey, 1989). Ce parasite Apicomplexa longtemps confondu avec *Toxoplasma gondii* a été isolé et identifié en 1988. Cette année fut un véritable tournant dans l'histoire de cette coccidie car la maladie a pu être reproduite expérimentalement et des tests de diagnostic ont été mis au point (Dubey, 1999a).

Le cycle biologique de *Neospora caninum* demeure imparfaitement connu. Les données actuelles montrent qu'il s'apparente à celui des coccidies hétéroxènes représentées entre autre par les genres *Toxoplasma* et *Hammondia*. Dans ces espèces, le parasite circule entre un hôte définitif carnivore qui excrète des oocystes après l'ingestion de produits carnés contenant des kystes tissulaires à bradyzoïtes et un hôte intermédiaire qui se contamine en ingérant ces oocystes et produit à son tour des kystes tissulaires (Dubey, 1999b). L'infection par *Neospora* a été décrite dans différentes espèces de mammifères, entre autre chez les bovins, les ovins, le cheval, le chien mais aussi chez certains ruminants sauvages. Le chien est un hôte intermédiaire dans lequel *Neospora* est capable de s'enkyster dans le système nerveux et d'infecter le fœtus chez la femelle gestante. Il joue aussi le rôle d'hôte définitif en excréant des oocystes dans ses matières fécales (McAllister *et al.*, 1998b, Lindsay *et al.*, 1999a ; Basso *et al.*, 2001a). Dans l'espèce bovine des cas de transmission post-natale ont été rapportés et le chien pourrait être une source d'oocystes. Certaines études s'accordent à dire que la faune sauvage pourrait aussi être à l'origine de cas de néosporose bovine (Ould Amrouch *et al.*, 1999 ; Barling *et al.*, 2000 ; Barling *et al.*, 2001). Des anticorps spécifiques de *Neospora* ont été détectés chez des ruminants sauvages (Dubey *et al.*, 1999b ; Ferroglio *et al.*, 2001 ; Lindsay *et al.*, 2002) et diverses espèces de carnivores sauvages (Lindsay *et al.*, 1996b ; Buxton *et al.*, 1997a, 1997b ; Lindsay *et al.*, 2001) ; et l'ADN du parasite a pu être amplifié à partir de matière fécale de renards sauvages en Espagne (Almeria *et al.*, 2002). Actuellement, aucune étude n'a encore exploré la situation de l'infection de la faune sauvage, en France.

Au cours du travail exposé dans ce document, nous avons essayé de préciser le rôle joué par les ruminants sauvages et le renard roux dans le cycle de *Neospora caninum* en France. Après avoir dressé le bilan des connaissances actuelles, nécessaires à la compréhension de la maladie et de la biologie du parasite, je présenterai cette étude menée au laboratoire Franck Duncombe (LDV-14) et à laquelle j'ai participé.

L'objet des recherches, auxquels nous nous sommes consacrés, consiste à évaluer la prévalence de l'infection par *Neospora caninum* chez des espèces de la faune sauvage en France. Pour accomplir ce travail, nous avons tenté d'évaluer la séroprévalence de l'infection par le parasite dans des populations sauvages de ruminants et de renards roux. Nous avons aussi recherché l'ADN de *Neospora caninum* dans des échantillons de tissus et de matières fécales de renards sauvages, avec une technique d'amplification génique (PCR) développée au laboratoire. Dans le cadre de ce travail, le laboratoire m'a attribué les tâches d'extraction des prélèvements, de réalisation de l'électrophorèse des produits de PCR et de l'exploitation des résultats sérologiques.

Pour accomplir cette étude expérimentale, j'ai bénéficié de l'aide du Conseil Général du Calvados et du Laboratoire Franck Duncombe qui m'ont accueilli et m'ont fourni le matériel nécessaire aux expérimentations, et de l'attribution par les représentants du corps enseignant de l'ENVA d'une bourse de fin d'étude délivrée par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.

I. Bilan des connaissances actuelles.

A. La néosporose, une maladie cosmopolite.

1. Une répartition mondiale.

1.1. Chez les bovins.

Depuis l'identification de Neospora caninum en 1988 et l'élaboration de tests de dépistage, de nombreuses publications ont fait état de néosporose bovine en Europe, en Amérique du Sud et du Nord, en Océanie, en Afrique et en Asie (Dubey, 1999b). Cet agent abortif est largement réparti mais l'incidence de la maladie est variable selon les publications (annexes 1 et 2). Elle est une cause parfois importante d'avortements dans certains pays. Ce parasite est considéré comme responsable de 20 à 43 % des avortements en Californie, de 17 à 30 % en Nouvelle-Zélande et 21% en Australie (Anderson et al., 1991, 1995 ; Thornton et al., 1991).

Le bœuf domestique (Bos taurus), n'est pas la seule espèce de bovins exposée ; des anticorps ont aussi été retrouvés chez les buffles d'eau (Bubalus bubalis), en Italie au Brésil, au Vietnam et en Egypte (Guarino et al., 2000 ; Fujii et al., 2001 ; Huong et al., 1998 ; Dubey et al., 1998).

L'exposition des ruminants domestiques est variable entre les pays et les troupeaux d'une même région (Sanderson et al., 2000). En Europe, les séroprévalences individuelles sont comprises entre 3 et 36 % selon les études. Le contact entre Neospora et les bovidés semble plus marqué dans certains pays, en particulier en Espagne (30-36%), aux Pays-Bas (14%) et en Suisse (11,5%). En outre, il ressort de ces travaux que plus de 50 % des troupeaux sont entrés en contact avec le parasite (tableau 1). En France, sa circulation est manifeste dans les élevages bovins. Une étude prospective menée sur 1924 bovins dans l'Orne a montré que 5,6% des animaux (soit 64% des troupeaux) étaient séropositifs vis-à-vis de Neospora caninum (Ould-Amrouche et al., 1999). Une autre enquête normande, portant sur 1373 animaux ayant avorté a révélé que 13 % des animaux issus d'élevages ayant connu plus de huit avortements avaient des anticorps anti-Nc contre 6,5 % des bovins issus d'élevages ayant connus moins de huit avortements (Pitel et al., 2000 ; Pitel et al., 2001a). D'après Payot (2001), la séroprévalence parmi les vaches ayant avortées s'échelonne dans différents

départements français entre 3% (Saône et Loire) et 52% (Mayenne), l'exposition au parasite étant particulièrement marquée dans le bassin laitier armoricain (fig. 1).

Tableau 1 : Séroprévalence de l'infection à <i>Neospora caninum</i> dans les cheptels laitiers de différents pays Européens. (D'après Hemphill et al., 2000)				
Pays			individuelle	troupeaux
	Animaux	Troupeaux	(%)	séropositifs (%)
Irlande du Nord	165	Non indiqué	3	Non indiqué
Angleterre et pays de Galle	418	Non indiqué	6	Non indiqué
Danemark	718	16	9	50
Pays-Bas	2574	100	14	78
Suisse	1689	113	11,5	Non indiqué
France (Normandie)	1924	42	5,6	64
Suède	780	Non indiqué	2	Non indiqué
Espagne	889	43	30	94
	1121	143	36	83

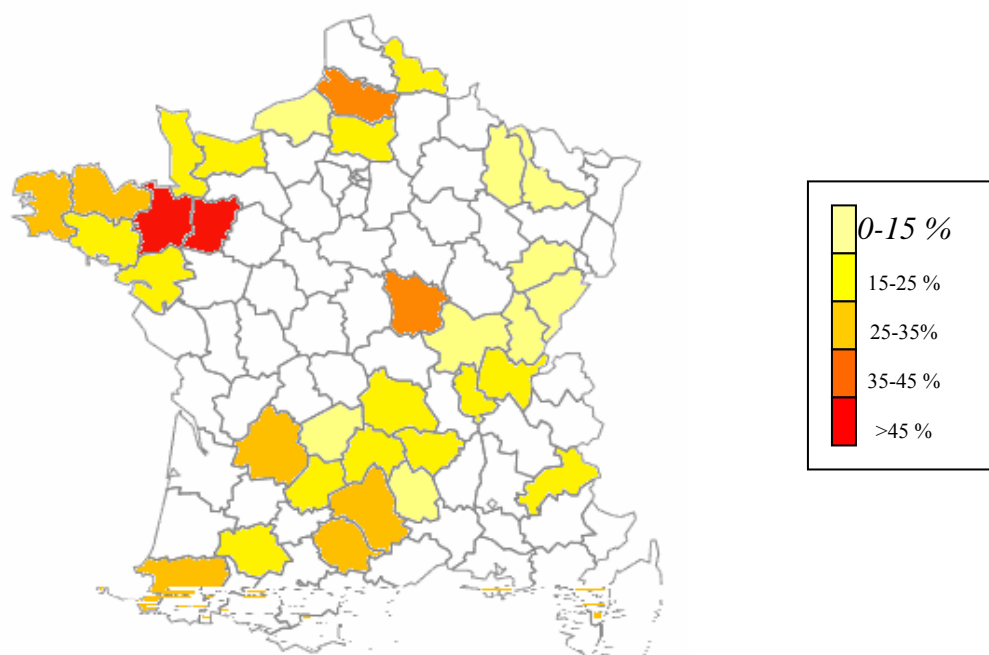


Fig.1 : Séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* dans les avortements bovins en France. (D'après F. Payot thèse Alfort 2001)

1.2. Chez le chien.

Des cas de néosporose canine ont été décrits en Europe, sur le continent américain, en Asie, en Afrique du Sud et en Australie, mais encore trop peu d'études de prévalence ont été menées à l'échelle mondiale et l'incidence de la maladie est encore mal estimée dans cette espèce.

*Les études sérologiques, par immunofluorescence ou technique ELISA, menées jusqu'à présent ont montré que 0 à 37,8% des chiens pouvaient posséder des anticorps contre *Neospora caninum* (tableau 2). La séroprévalence a été évaluée à 7% aux Etats-Unis, entre 18 et 37,8% en Amérique latine, et entre 2 et 29% en Europe. Les écarts entre ces valeurs publiées sont probablement consécutifs au mode de vie des animaux. En effet, la séroprévalence est significativement plus importante chez les chiens de ferme ou errants que sur la population canine urbaine (Wouda et al., 1999a, Basso et al., 2001b, Gennari et al., 2002). Au Royaume-Uni, des anticorps anti-Nc ont été détectés sur 51% des 300 sérums de chiens de chasse testés. Cette valeur est très supérieure aux séroprévalences de 5,8 et 16,6% observées au cours d'études portant sur des chiens urbains. La forte exposition est vraisemblablement liée au régime alimentaire de ces chiens fréquemment constitué de viande bovine crue (Hemphill et al., 2000).*

1.3. Séroprévalence dans la faune sauvage.

Le contact avec Neospora caninum a aussi été mis en évidence dans différentes espèces de la faune sauvage. Deux cas de néosporose observés chez des cervidés et un cas sur une espèce d'antilope suggèrent que les ruminants sauvages peuvent participer au cycle du parasite, comme hôte intermédiaire (Woods et al., 1994, Dubey et al., 1996c). Toutefois, les enquêtes sérologiques sont à l'heure actuelle encore peu nombreuses (tableau 3). Deux études de séroprévalence menées aux Etats-Unis sur des cerfs à queue blanche (Odocoileus virginianus) ont montré que plus de 40% des animaux possèdent des anticorps spécifiques de Neospora caninum (Dubey et al., 1999b, Lindsay et al., 2002). En Europe, l'exposition des chamois et des cervidés, au parasite, a été constatée dans les Alpes italiennes (Ferroglia et al., 2001). Un titre en anticorps supérieur au 1:40 en agglutination a été chez de 0,94 à 100%.

	-160 citadins -125 issus d'élevages bovins laitiers -35 issus d'élevages bovins allaitants	26,2% 48% 54,2%	
- Uruguay	414	20%	
- Iles Falkland	500	0,2%	
AUSTRALIE	451	9%	<i>Barber et al., 1997b</i>
- Melbourne	207	5%	
- Sydney	150	12%	
- Perth	94	14%	
AFRIQUE			
- Kenya	140	0%	
- Tanzanie	49	11%	
EUROPE			
- Pays-Bas	152 chiens de ferme 344 chiens urbains	23,6% 5,5%	<i>Wouda et al., 1999c</i>
			<i>Barber et al., 1997a</i>
- Belgique	300	11%	<i>Rasmussen et Jensen. 1996</i>
			<i>Lindsay et Dubey 2000</i>
- Danemark	98	15%	
- Italie	194	29%	<i>Hemphill et al., 2000</i>
- Royaume-Uni	163 chiens urbains d'Angleterre 300 Foxhound 104 chiens londoniens	16,6% 51% 5,8%	
			<i>Ortuno et al., 2002</i>
- Suède	398 780	0,5% 2%	
- Espagne	130 chiens de Catalogne	12,2%	
ASIE			
- Japon	198	7%	<i>Lindsay et Dubey 2000</i>

Tableau 3 : Résultats des études de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* menées sur les ruminants sauvages.

Pays	Test utilisé	Effectif testé	Nombre d'animaux possédant des anticorps	Source
Italie	Agglutination ($\geq 1:40$) (Test Vétouinol)	- 119 chamois (<i>Rupicapra rupricapra</i>) - 102 cerfs élaphe (<i>Cervus elaphus</i>) - 43 chevreuils (<i>Capreolus capreolus</i>)	- 35 (29,4%) - 13 (12,7%) - 16 (37,2 %)	Ferroglio <i>et al.</i> , 2001
Etats-Unis (14 états du sud-est)	Agglutination ($\geq 1:25$)	- 305 cerfs à queue blanche (<i>Odocoileus virginianus</i>)	- 145 (48%)	Lindsay <i>et al.</i> , 2002
Etats-Unis (16 réserves du nord est de l'Illinois)	Agglutination ($\geq 1:25$)	- 400 cerfs à queue blanche (<i>Odocoileus virginianus</i>)	- 162 (40,5%)	Dubey <i>et al.</i> , 1999b

Tableau 4 : Séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* chez les carnivores sauvages dans le monde.

Pays	Test utilisé	Effectif testé	Résultats (Positifs)	Source
Etats-Unis	IFAT ($\geq 1:25$)	52 coyotes	5 (10%)	Lindsay <i>et al.</i> , 1996b
Etats-Unis	Agglutination ($\geq 1:25$)	26 renards gris	4 (15,6%)	Lindsay <i>et al.</i> , 2001
Belgique	IFAT ($> 1/64$)	123 renards roux	21 (17 %)	Buxton <i>et al.</i> , 1997a
Royaume Uni	IFAT	54 renards roux	1 (2%)	Barber <i>et al.</i> , 1997b
	IFAT	16 renards roux	1 (6%)	Simpson <i>et al.</i> , 1997
Irlande	IFAT (1/1600)	70 renards roux	1 (1,4%)	Wolfe <i>et al.</i> , 2001
Suède	Agglutination ELISA	221 renards roux	0 (0%)	Jakubek <i>et al.</i> , 2001

2. *Neospora*, un agent pathogène naturel pour de nombreuses espèces.

Neospora caninum s'est révélé être un agent abortif majeur en reproduction bovine mais des cas cliniques ont aussi été décrits dans d'autres espèces. Les mécanismes de l'infection et de l'expression de la maladie ne sont pas encore parfaitement connus mais le pouvoir pathogène du parasite semble comparable à celui décrit chez *Toxoplasma gondii*. Ce dernier est responsable d'avortements et de morbidité néonatale chez les mammifères et de cas médicaux graves chez les animaux et les humains immunodéprimés.

2.1. Le pouvoir pathogène de *Neospora caninum*

Neospora caninum est potentiellement pathogène pour l'hôte intermédiaire qui l'héberge. Après l'invasion cellulaire, le parasite est à l'origine de la mort des cellules dans lesquelles les tachyzoïtes se multiplient activement, conduisant ainsi à l'apparition de foyers de nécrose dans les tissus colonisés (Dubey, 1990 ; Dubey et Lindsay 1993), en particulier dans les muscles, le tissu nerveux et plus rarement dans la peau (Fritz *et al.*, 1997), les viscères (Dubey *et al.*, 1988) ou les poumons (Greig *et al.*, 1995). L'infection du fœtus ou de l'embryon et ou l'altération du placenta à l'issue d'une parasitémie est à l'origine de l'interruption de la gestation chez les femelles gravides (Hemphill *et al.*, 2000). Cette parasitémie peut être secondaire à une primo-infection ou au réveil d'une infection latente par des bradyzoïtes enkystés (Hemphill, 1999).

Outre la lyse mécanique des cellules, des infiltrats lymphoplasmocytaires sont à l'origine de foyers inflammatoires et de granulomes autour des kystes tissulaires dégénérés, localisés dans le tissu nerveux. La réaction de l'hôte est donc en partie à l'origine de l'apparition des symptômes neurologiques observés sur les animaux infectés. La libération d'éventuelles substances toxiques ou chimiotactiques par le parasite pourrait jouer un rôle non négligeable dans la genèse des lésions (Lindsay et Dubey, 2000).

La réaction immunitaire de l'hôte parasité dans la lutte contre l'infection n'est pas encore bien connue. Mais, il semblerait qu'elle puisse gêner la multiplication des formes endogènes. En effet, l'infection expérimentale par *Neospora caninum* peut être asymptomatique dans certains cas (Dijkstra *et al.*, 2002) et des anticorps (IgG) sont observés trois semaines après l'infection expérimentale des bovins (Lundén *et al.*, 1998 ; De Marez *et al.*, 1999). Cependant, la seule présence d'anticorps ne permet probablement pas le contrôle de la maladie car *Neospora* est un parasite intracellulaire. La composante cellulaire de la réponse immunitaire intervient probablement dans la protection contre l'infection (Khan *et al.*, 1997 ; Lunden *et al.*, 1998). Chez la souris, *Neospora caninum* stimule à la fois les réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale. Bien que le détail des mécanismes cellulaires ne soit pas encore connu,

le rôle protecteur des cytokines (IL-12 et interféron (IFN)- γ) a été démontré chez la souris (Khan *et al.*, 1997 ; Baszler *et al.*, 1999b). Chez la femelle gestante, les cytokines ont un rôle important dans le maintien de la gestation. Certaines telles l'interleukine (IL) 10 et le Transforming Growth Factor (TGF)- β sont bénéfiques, d'autres en revanche sont néfastes (IL-2, IL-12, IFN- γ , et Tumoral Necrosis Factor (TNF)- α). Ainsi, la réaction cellulaire à l'encontre de l'invasion parasitaire pourrait être à l'origine d'une production accrue de cytokines délétères pour la gestation chez les bovins (Buxton *et al.*, 2002).

2.2. Chez le chien :

Le rôle pathogène de Neospora caninum a été décrit pour la première fois chez le chien (Bjerkas et al., 1984). Dans cette espèce le parasite est responsable d'une atteinte neuromusculaire chez les chiots âgés de quatre semaines à quelques mois. Mais des cas établis chez des chiens à un âge de deux jours (Barber et Trees, 1996) ou chez des animaux de 15 ans ont été rapportés (Dubey et al., 1988a). Aucune prédisposition de sexe ou de race n'a été établie. En revanche, la maladie sévit en général chez plusieurs individus de la même portée, car contaminés congénitalement. Les jeunes infectés par Neospora caninum développent une parésie progressive et ascendante concernant essentiellement les membres postérieurs (Lindsay et Dubey, 2000). Le déficit neurologique se manifeste par une démarche « en saut de lapin » et aboutit à une hyperextension dite « en position du phoque » (Pluye, 1999). D'autres anomalies peuvent apparaître telles qu'une paralysie des muscles masticateurs se manifestant par une impossibilité à ouvrir la gueule ou une dysphagie (Dubey et Lindsay, 1996). Une parésie flasque accompagnée d'une fonte musculaire et d'une mort par insuffisance cardiaque a aussi été décrite (Odin et Dubey, 1993). Une atteinte du système nerveux central peut donner lieu à de l'ataxie, un syndrome vestibulaire, un nystagmus, une anisochorie, des crises épileptiformes et des troubles du comportement (Dubey et al., 1990b). Plus rarement, l'infection parasitaire se traduit par une pneumonie (Greig et al., 1995), par une dermatose nodulaire (Fritz et al., 1997), ou une inflammation des glandes annexes du tube digestif (Dubey et al., 1988a). A l'autopsie, les lésions ne sont en général pas spécifiques. On a parfois fait état de zones de nécrose au sein du système nerveux central, de granulomes dans les tissus viscéraux, et d'une striation blanche-jaunâtre sur les muscles (Lindsay et Dubey, 2000). L'examen histologique permet de mettre en évidence des foyers de nécroses consécutifs à la multiplication des tachyzoïtes dans différents organes ou à la rupture de kystes à bradyzoïtes dans le tissu nerveux.

2.3. Chez les bovins :

Neospora caninum est une cause majeure d'avortement chez les bovins. Ce parasite est responsable d'environ 25% des avortements aux Etats-Unis et dans les Pays-Bas (Dubey, 1999b). Son pouvoir pathogène s'exprime chez la vache gravide et le veau nouveau-né. Les cas cliniques observés dans cette espèce pourraient être consécutifs à la transmission transplacentaire du parasite.

2.3.1. Conséquences de l'infection pour la femelle gravide

Neospora caninum serait responsable de 15 à 20% des avortements soumis à un diagnostic de laboratoire (Anderson *et al.*, 2000). Chez la femelle gestante infectée, le fœtus peut mourir in utero et être résorbé, momifié, ou expulsé. Le veau peut aussi naître vivant malade ou sain cliniquement mais infesté chronique (Barr *et al.*, 1991, Barr *et al.*, 1994a, Dubey et Lindsay, 1996, Williams *et al.*, 2000). Djikstra *et al.*, (2002) ont ainsi relaté le cas d'un fort taux de séroconversion, traduisant l'exposition au parasite, dans un troupeau sans augmentation du taux d'avortement associé. L'incidence de la maladie sur la mortalité embryonnaire reste encore méconnue, mais du fait de son tropisme pour l'appareil génital, *Neospora caninum* pourrait être à l'origine d'une baisse des performances de reproduction dans les élevages (fig. 2). Lorsque la femelle gestante n'avorte pas, elle donne naissance dans 90 % des cas à un animal séropositif (anticorps pré-colostaux) porteur du parasite (Pitel *et al.*, 2001c). Le devenir de la gestation à l'issue d'une contamination par le parasite dépend de l'âge du fœtus, de l'importance de la parasitémie et de la souche de *Neospora caninum* (Innes *et al.*, 2002).

2.3.2. Conséquences pour le veau né d'une mère infectée.

Dans certains cas les veaux nés vivants mais infectés congénitalement peuvent présenter un mauvais état corporel, associé à des troubles neurologiques (ataxie, diminution des réflexes, perte de la proprioception, hyperextension des membres...), à des anomalies oculaires congénitales (exophtalmie, strabisme...), ou à des malformations vertébrales liées à une atteinte des neuroblastes (Parish, 1987 ; Colery, 1995 ; Dubey *et al.*, 1990d ; Barr *et al.*, 1993 ; Dubey et Lindsay, 1996 ; Anderson *et al.*, 2000). Chez ces animaux, l'infection parasitaire est caractérisée essentiellement par des lésions d'encéphalomyélite non-suppurative et de myosite (Dubey et Lindsay 1996).

INGESTION D'OOCYSTES SPORULES

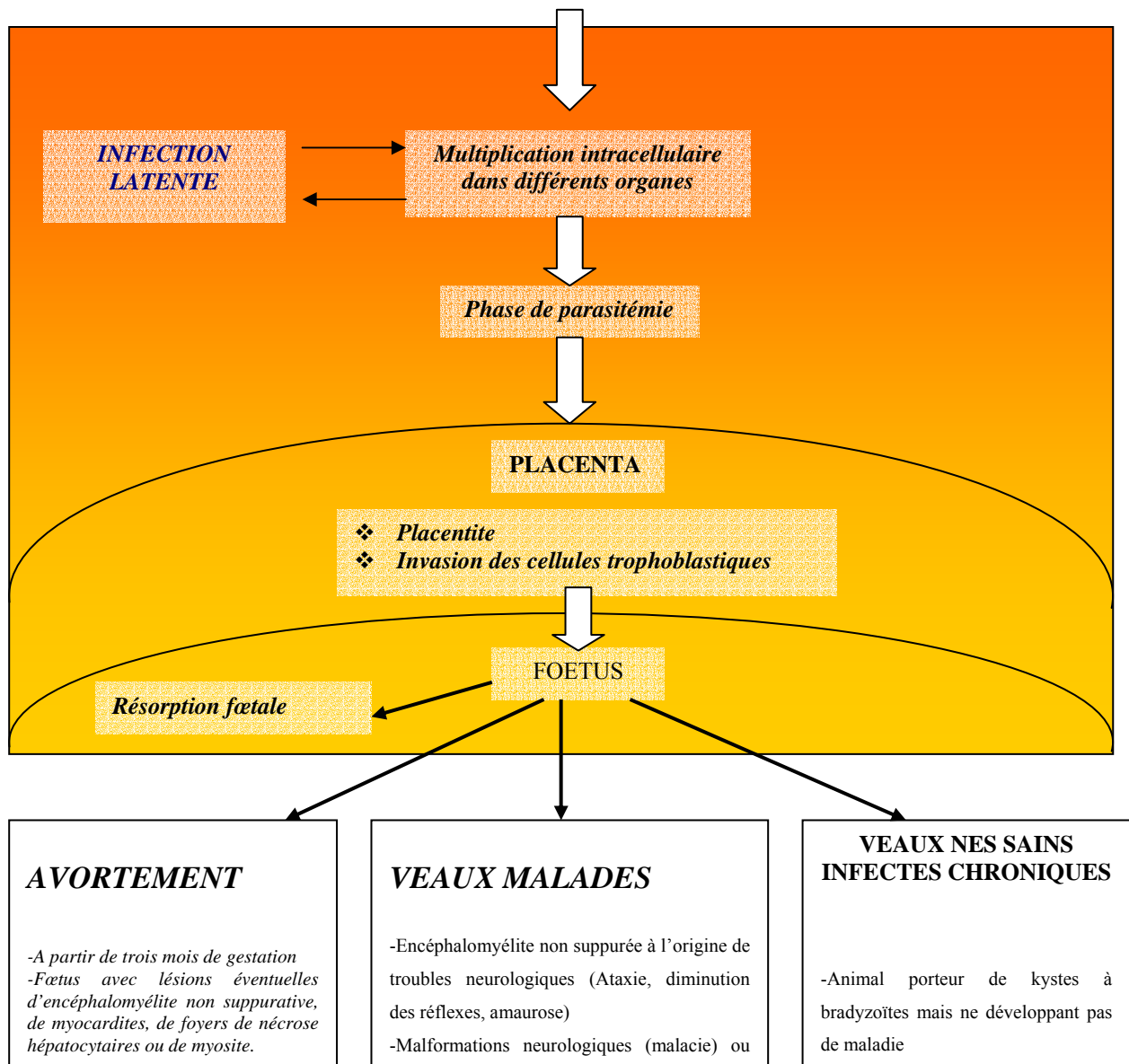


Fig. 2 : Physiopathogénie de l'infection par *Neospora caninum* chez les bovins et conséquences pour le fœtus (d'après Dubey et Lindsay, 1996).

2.3.3. Caractéristiques des avortements à *Neospora caninum*.

L'avortement domine le tableau clinique de cette affection mais il est peu spécifique sur le plan clinique. Il peut avoir lieu de 3 mois jusqu'au terme de la gestation (Dubey, 1999b) mais il apparaît être plus fréquent entre le 3^{ème} et le 6^{ème} mois (Pitel *et al.*, 2000). L'aspect du fœtus

peut être normal, momifié ou autolysé. Ces avortements ne sont en général pas suivi de complications *post-partum*, et les mères reviennent en chaleur normalement.

Du point de vue épidémiologique, les avortements à *Neospora* peuvent prendre un profil sporadique, enzootique ou épizootique. Une étude prospective menée pendant deux ans et demi dans deux fermes n'a révélé aucune influence de l'âge, du numéro de lactation, de commémoratifs d'avortement chez les vaches, de la durée de gestation, ni du sexe du veau (Paré *et al.*, 1996). Ils peuvent survenir tout au long de l'année, mais certains auteurs ont relaté une influence saisonnière : un pic hivernal a été observé en Californie (Thurmond *et al.*, 1995). En Hollande une étude menée entre 1995 et 1997 a révélé que 38 des 50 avortements à *Neospora* se sont déroulés entre juin et septembre (Bartel *et al.*, 1999). Des facteurs augmentant la survie du parasite dans le milieu ou une exposition des bovins à des agents immunodépressifs au cours des périodes évoquées pourrait éventuellement expliquer ces fluctuations saisonnières observées (Thurmond *et al.*, 1995). Aucune prédisposition raciale pour l'infection à *Neospora* n'a été décrite dans des études s'intéressant à différentes races ; en revanche une étude menée en France (Klein *et al.*, 1997) a révélé une séroprévalence plus importante en élevage laitier qu'en élevage allaitant. Cette constatation est vraisemblablement liée au système d'élevage plus qu'à une prédisposition raciale (Hemphill *et al.*, 2000).

2.3.4. Etude des facteurs de risques associés aux avortements à *Neospora*.

Théoriquement, on distingue deux niveaux au risque qu'une vache avorte de la néosporose : le risque pour qu'elle s'infeste (risque infectieux) et le risque pour qu'elle avorte de son infection (risque abortif). En pratique la distinction des risques infectieux et abortif est délicate (Hemphill *et al.*, 2000). Divers facteurs de sensibilité ont été proposés sans avoir été confirmés telles des infections virales, bactériennes, des carences alimentaires, l'ingestion de toxiques ou les traitements immunodépressifs (tableau 5). La baisse des défenses immunitaires induite par ces agents pourrait être à l'origine de la réactivation d'une infection latente (Hemphill 1999). L'immunosuppression peut aussi être physiologique en particulier chez la vache gestante (Buxton *et al.*, 2002 ; Innes *et al.*, 2002). Cette espèce est particulièrement sensible à l'infection comparée aux petits ruminants qui développent rarement la maladie dans les conditions naturelles. La résistance des ovins et des caprins pourrait être le fruit d'une immunité maternelle plus efficace au cours de la gestation.

D'autres facteurs tels la conduite d'élevage, le rationnement des animaux ou la présence de carnivores sur l'exploitation ont été proposés comme facteurs influençant l'exposition au parasite et pouvant ainsi jouer un rôle dans l'incidence des avortement. Ces facteurs seront étudiés ultérieurement (Paragraphe 3.3).

Tableau 5 : Facteurs de risques associées aux avortements à *Neospora caninum*.

Facteur de risque	Références
<p>Infections intercurrentes</p> <p>Virales</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Virus de la diarrhée virale bovine (BVD)</i> - <i>Herpès virus bovin type 4 (BHV4)</i> - <i>Virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR)</i> <p>Bactériennes</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Actinomyces pyogenes</i> - <i>Leptospira hardjo</i> 	<p><i>Dubey et al., 1990d ; Björkman et al., 2000</i></p> <p><i>Nietfeld et al., 1992</i></p> <p><i>Otter et Wilson, 1997</i></p> <p><i>Hoar et al., 1996 ; Yaeger et al., 1994</i></p> <p><i>Otter et Wilson, 1997</i></p>
<p>Alimentaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Carence en Selenium</i> - <i>Déséquilibre protéique de la ration</i> 	<p><i>Dubey et al., 1990d</i></p> <p><i>Bartel et al. 1999</i></p>
<p>Substances toxiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Intoxication aux nitrates</i> - <i>Mycotoxines</i> 	<p><i>Dubey et al., 1990d</i></p> <p><i>Bartel et al. 1999</i></p>
<p>Iatrogène</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Corticoïdes</i> - <i>Vaccination</i> 	<p><i>Bartel et al., 1999</i></p>
<p>Epidémiologique :</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Présence de chien.</i> - <i>Présence d'une basse-cour</i> - <i>Contact avec la faune sauvage</i> 	<p><i>Ould-Amrouche et al. 1999 ; Mainar-Jaime et al. 1999</i></p> <p><i>Klein et al., 1997</i></p> <p><i>Barling et al. 2000</i></p>

2.4. Chez les petits ruminants :

Quatre cas de néosporose caprine ont été décrits en Californie (Barr et al., 1992), en Pennsylvanie (Dubey et al., 1992a) au Costa-Rica (Dubey et al., 1996b) et au Brésil

(Corbellini et al., 2001). Les manifestations cliniques sont en tous points similaires à celles rencontrées lors de néosporose bovine et de toxoplasmose caprine : avortements (Barr et al., 1992, Dubey et al., 1996b) et naissance de chevreaux mort-nés (Dubey et al., 1992a) ou chétifs (Corbellini et al., 2001). Les lésions observées sont semblables à celle rencontrées dans l'espèce bovine. Peu d'études de prévalence ont été réalisées mis à part, le travail mené par England et al., (1998) en Norvège sur 107 sérums issus de 7 troupeaux pour lesquels aucun titre supérieur au 1/40^{ème} n'a été détecté en IFAT. Une étude similaire portant sur un effectif plus important (59 troupeaux et 759 animaux) a été réalisé en France. La faible séroprévalence (1,4% des individus et 8,9% des troupeaux) plaide pour une incidence négligeable de la néosporose dans les troubles de reproduction observés, mais suggère que le parasite peut circuler dans l'espèce caprine (Chartier et al., 2000).

Les ovins sont aussi réceptifs et sensibles dans certaines circonstances à l'infection parasitaire. Dans cette espèce, *Neospora* peut être à l'origine d'avortement et de mortalité néonatale (Dubey et al., 1990a, Dubey et Lindsay, 1996). Mais, la prévalence de l'infection à *Neospora caninum* comme cause naturelle d'avortements est vraisemblablement faible (Buxton, 1998).

2.5. Chez les chevaux :

La néosporose a aussi été décrite dans l'espèce équine. Huits cas cliniques ont été publiés à ce jour (tableau 6). L'infection parasitaire s'est manifestée, dans la plupart des cas, par des symptômes d'EPM (Equine Protozoal Myeloencephalite) mais aussi d'avortement et de coccidiose digestive à *Neospora*. On ne sait pas si l'infection par *Neospora sp.* est la cause primaire des cas décrits ou est consécutive à une affection sous-jacente favorisant la multiplication du parasite (Hamir et al., 1998). Cependant, l'exposition des chevaux est manifeste puisque des dépistages sérologiques par agglutination (tableau 7) ont révélé une séroprévalence de 14 % en France (Pittel et al., 2001) et entre 11 et 23 % aux Etats-Unis (Cheadle et al., 1999a ; Dubey et al., 1999a).

Au cours de deux études, *Neospora sp.* a été isolé à partir de prélèvements de chevaux et caractérisé en culture cellulaire (Marsch et al, 1998, Cheadle et al., 1999c). Des différences morphologiques, immunologiques et génomique ont été mises en évidence entre l'isolat équin et les isolats bovins et canins de *Neospora caninum* (Marsch et al., 1998). Ces divergences ont conduit les auteurs à considérer cet isolat comme une nouvelle espèce au genre *Neospora*. qui a été nommé *Neospora hughesi*.

Pourtant, l'ADN de *Neospora caninum* a été extrait et amplifié par PCR sur des avortons équins. (Spencer et al., 2000). La spécificité de la technique utilisée (amplification de la séquence NC-5) interdit les réactions croisées avec *Neospora hughesi* (Kaufman et al., 1996 ; Yamage et al., 1996). Le cheval pourrait donc dans certaines circonstances être réceptif et sensible à *N.caninum*.

Le rhinocéros qui appartient au même titre que les chevaux à l'ordre des Périssodactyles, est aussi réceptif et sensible à *Neospora caninum* puisque qu'un cas de néosporose a été décrit chez un jeune rhinocéros blanc (*Ceratotherium sinum*) né dans un centre de sauvegarde (Williams, 2002).

Tableau 6: Récapitulatif des cas de néosporose équine (d'après Pronost *et al.*, 2000)

	Animal	Manifestation clinique	Organe cible	Moyen de diagnostic
Etats-Unis	Fœtus appalosa de 2 mois	Avortement	Poumon	Immunohistochimie
Etats-Unis	Femelle appalosa de 10 ans	Entérite, amaigrissement, anémie	Intestin grêle	Immunohistochimie
Etats-Unis	Femelle quarter horse de 1 mois	Cécité	Cerveau	Immunohistochimie
Etats-Unis	Femelle pinto de 19 ans	Encéphalomyélite, paraplégie, adénome pituitaire	Système nerveux central	Immunohistochimie
Etats-Unis	Quarter horse de 11 ans	Ataxie	Cerveau, moelle épinière	Immunohistochimie, PCR, microscopie électronique
France	Croisé morgan-quarter horse de 20 ans	Ataxie, adénome de la thyroïde	Moelle épinière	Immunohistochimie, microscopie électronique
France	Fœtus pur-sang de 8 mois et demi	Avortement	Cerveau, cœur	PCR
Etats-Unis	Femelle palomino de 13 ans	Ataxie	Moelle épinière	Culture cellulaire Microscopie électronique

Tableau 7 : Séroprévalence chez les chevaux de l'infection à *Neospora sp.* en France, en Argentine, au Brésil et au Etats-Unis. (D'après Pronost *et al.*, 2000)

Titre en anticorps	France (434 sérums)	Etats-Unis (296 sérums)	Argentine (76 sérums)	Brésil (101 sérums)
1/40	23 %	23 %	0%	0%

1/80	14 %	17 %	0%	0%
------	------	------	----	----

2.6. Dans les espèces de la faune sauvage.

A l'heure actuelle seulement deux cas de néosporose naturelle ont été publiés chez les espèces de la faune sauvage. Le premier a été décrit chez un cerf à queue noire (*Odocoileus hemionus columbianus*). Des tachyzoïtes ont été identifiés au sein des lésions de nécrose observées sur divers organes d'une jeune femelle de deux mois trouvée morte en Californie (Woods *et al.*, 1994). D'autre part, un cas de transmission congénitale a été rapporté chez un cerf (*Cervus eldi siamensis*). Il s'agissait d'un fœtus mort-né dans un zoo français qui a présenté en histologie des lésions d'encéphalomyélite associées à la présence de kystes à bradyzoïtes (Dubey *et al.*, 1996c). Par analogie avec les bovins, on peut donc penser que les ruminants sauvages puissent aussi être réceptifs et sensibles au parasite.

Aucun cas clinique de néosporose naturelle n'a encore été décrit chez les carnivores sauvages bien que ceux-ci soient exposés au parasite. Pourtant, le renard bleu (*Alopex lagopus*) est, dans les conditions expérimentales, réceptif et sensible à l'inoculation du parasite puisque Bjerkas *et al.*, ont observé des tachyzoïtes de *Neospora caninum* au sein de lésions d'encéphalite 10 semaines après l'injection intra-musculaire de tissus nerveux de chien infesté (Dubey et Lindsay 1996). De plus, la transmission verticale a été mise en évidence chez le renard roux (Schaes *et al.*, 2001a). Les renards pourraient donc être sensibles à *Neospora caninum* dans les conditions naturelles, au même titre que le chien.

2.7. Un risque pour l'homme ?

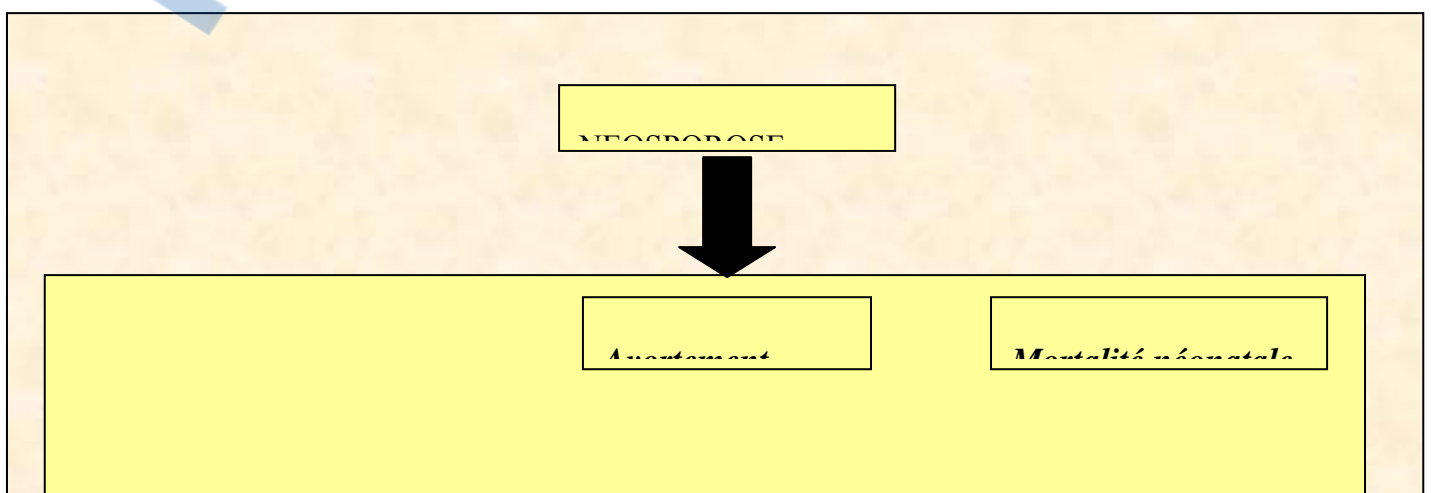
Les tachyzoïtes de *Neospora caninum* sont expérimentalement pathogènes pour les primates (non-humain) puisque inoculés in utero ou par voie intraveineuse à des macaques (*Maccaca mulata*) gravides, le parasite est responsable d'encéphalomyélite chez les fœtus (Barr *et al.*, 1996b). L'hypothèse d'un éventuel danger zoonotique a alors été émise. Une enquête sérologique en Angleterre a révélé que l'homme pouvait être exposé à *Neospora caninum* (Tranas *et al.*, 1999), mais aucune étude n'a encore été entreprise pour préciser la réceptivité et la sensibilité de l'homme vis-à-vis de *Neospora caninum* (Graham *et al.*, 1999).

3. Les conséquences économiques de la néosporose.

La large répartition de *Neospora caninum* et son pouvoir pathogène en font une cause majeure d'avortement. Selon certaines études, le parasite serait responsable de 20 à 43 % des avortements en Californie (Anderson *et al.*, 1991, 1995) et de 15 à 20 % au Pays-Bas (Wouda *et al.*, 1999b). Hormis l'avortement, le parasite est aussi responsable de mortalité embryonnaire, de mortinatalité et de pathologie néonatale. Le coût de l'affection (fig.3) est difficile à évaluer car elle est non seulement responsable de la perte de la valeur potentielle du fœtus, mais aussi de frais indirects. Hobson *et al.*, (2002) ont observés que la production laitière est significativement plus faible dans les troupeaux séropositifs présentant des problèmes d'avortement que chez les animaux séronégatifs. Mais cette moindre production est vraisemblablement consécutive à l'avortement car les animaux séropositifs issus de troupeaux sans troubles ont une production similaire aux animaux séronégatifs. Ce manque à gagné sur le lait (Thurmond *et al.*, 1997a), les dépenses engendrées pour les soins des veaux malades, pour les réformes précoces, pour la remise à la reproduction et pour le diagnostic (Tees *et al.*, 1999) doivent être pris en considération dans le calcul des pertes économiques.

Les répercussions de la maladie ont été estimées à 35 millions de dollars en Californie. En Australie, les pertes sont évaluées à 85 millions de dollars pour l'industrie laitière et 25 millions de dollars pour la filière viande (Dudey, 1999b). Une estimation des pertes engendrées par *Neospora caninum* est bien entendu difficile à calculer du fait des nombreux paramètres à prendre en compte en particulier le système de production, la valeur des animaux, le pays voire de la région concernée.

Quelques cas de néosporose ont été observés chez les chevaux, espèce dans laquelle la valeur individuelle des animaux peut être très importante (Pronost *et al.*, 2000). L'exposition à *Neospora caninum* a aussi été mise en évidence chez le Buffle d'eau (*Bubalus bubalis*). Bien que la sensibilité de ces animaux ne soit pas connue, l'infection parasitaire pourrait avoir d'importantes répercussions économiques et humaines. L'exploitation de cette espèce joue en effet, un rôle majeur dans l'économie agricole des pays en voie de développement.



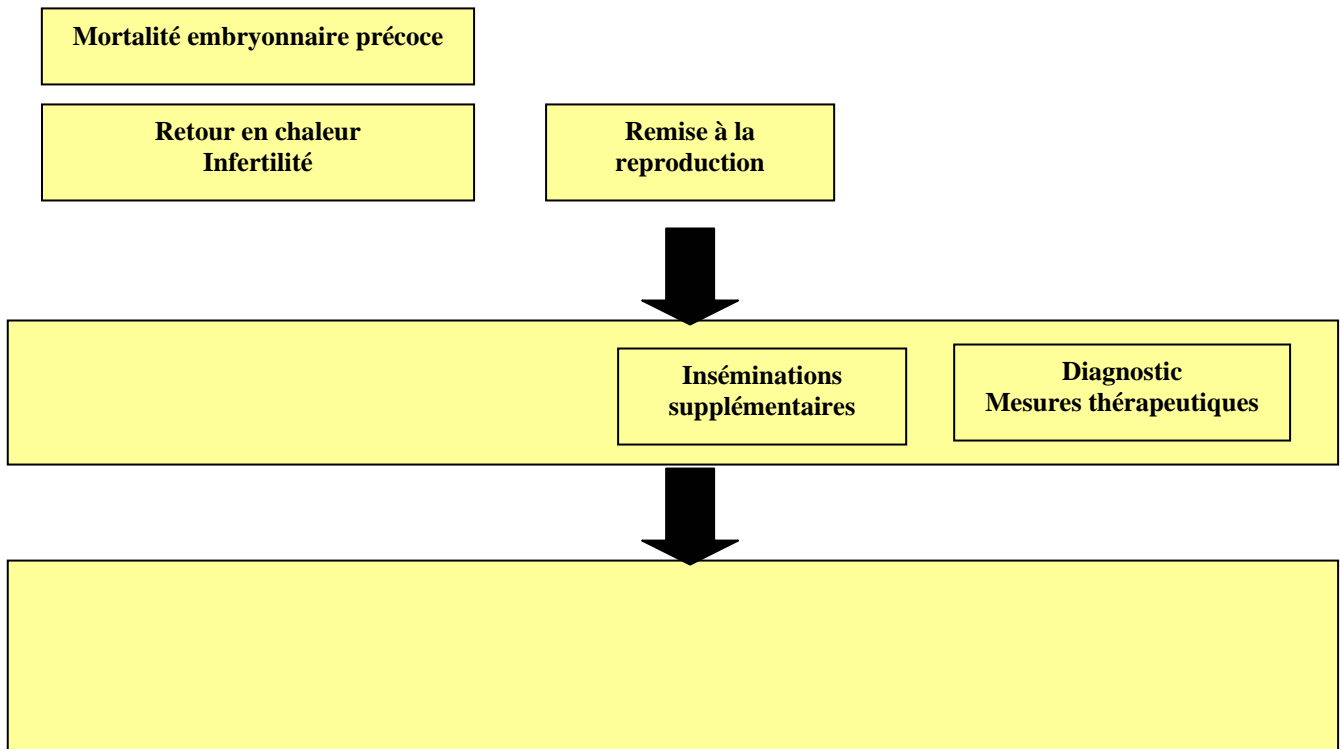


Fig. 3 : Conséquences économiques engendrées par *Neospora caninum* dans les élevages. (D'après Trees et al., 1999)

Neospora caninum est donc un parasite largement réparti dans le monde. De nombreuses espèces de mammifères domestiques et sauvages sont exposées, mais c'est dans l'espèce bovine que les conséquences de l'infection sont majeures. La sensibilité des ruminants et carnivores sauvages est encore peu connue bien que leurs réceptivités aient été mises en évidence.

B. Cycle de développement et ses conséquences pour l'épidémiologie et la lutte contre la néosporose.

1. Le cycle de développement de *Neospora caninum*

1.1. Les formes parasitaires.

Les caractéristiques du développement endogène du parasite dans les conditions naturelles sont encore peu connues. Les formes parasitaires de Neospora caninum décrites chez l'hôte intermédiaire ont longtemps étaient confondues avec celles de Toxoplasma gondii. Pourtant ces deux parasites sont morphologiquement différents (Lindsay et al., 1993)

1.1.1. Le tachyzoïte : forme de dissémination endogène (fig.5-5').

Le tachyzoïte est doté d'un pouvoir élevé de multiplication. Chez l'animal infecté, on le retrouve dans de nombreux types cellulaires : cellules nerveuses, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales vasculaires, myocytes, hépatocytes, cellules rénales tubulaires (Dubey, 1999b). Ils se présente sous la forme d'un unicellulaire ovoïde ou en croissant, mesurant 3-7 μm X 1-5 μm (Dubey *et al.*, 2002a). Après l'infection de l'hôte, le tachyzoïte colonise le cytoplasme cellulaire et se multiplie rapidement de façon asexuée par endodyogénie dans une vacuole parasitophore (Dubey et Lindsay, 1996). Sous la pression des défenses immunitaires de l'hôte, ils passent au stade de bradyzoïtes enkystés (Hemphill, 1999).

1.1.2. Le kyste tissulaire : une forme de résistance endogène (fig.4).

Le kyste tissulaire est une forme dormante à multiplication lente et strictement localisée dans le tissu nerveux. Il est non septé et contient de nombreux bradyzoïtes qui se multiplient par endodyogénie. Ces derniers sont allongés avec un noyau subterminal et mesurent 8 X 2 μm . Ils possèdent les mêmes organites que les tachyzoïtes, mais s'en distinguent néanmoins par le nombre moindre de leurs rhoptries (Speer et al., 1989, 1999 ; Dubey et al., 2002). La résistance des bradyzoïtes est encore imparfaitement connue. Toutefois, dans les conditions expérimentales, ils peuvent survivre jusqu'à quatorze jours à la réfrigération à 4°C, mais sont sensibles à la congélation à -20°C (Lindsay et al., 1992). Ils sont par ailleurs résistants à l'acidité gastrique ; en effet, ils survivent à la digestion dans une solution d'acide chlorhydrique et de pepsine in vitro (Lindsay et Dubey, 1990).

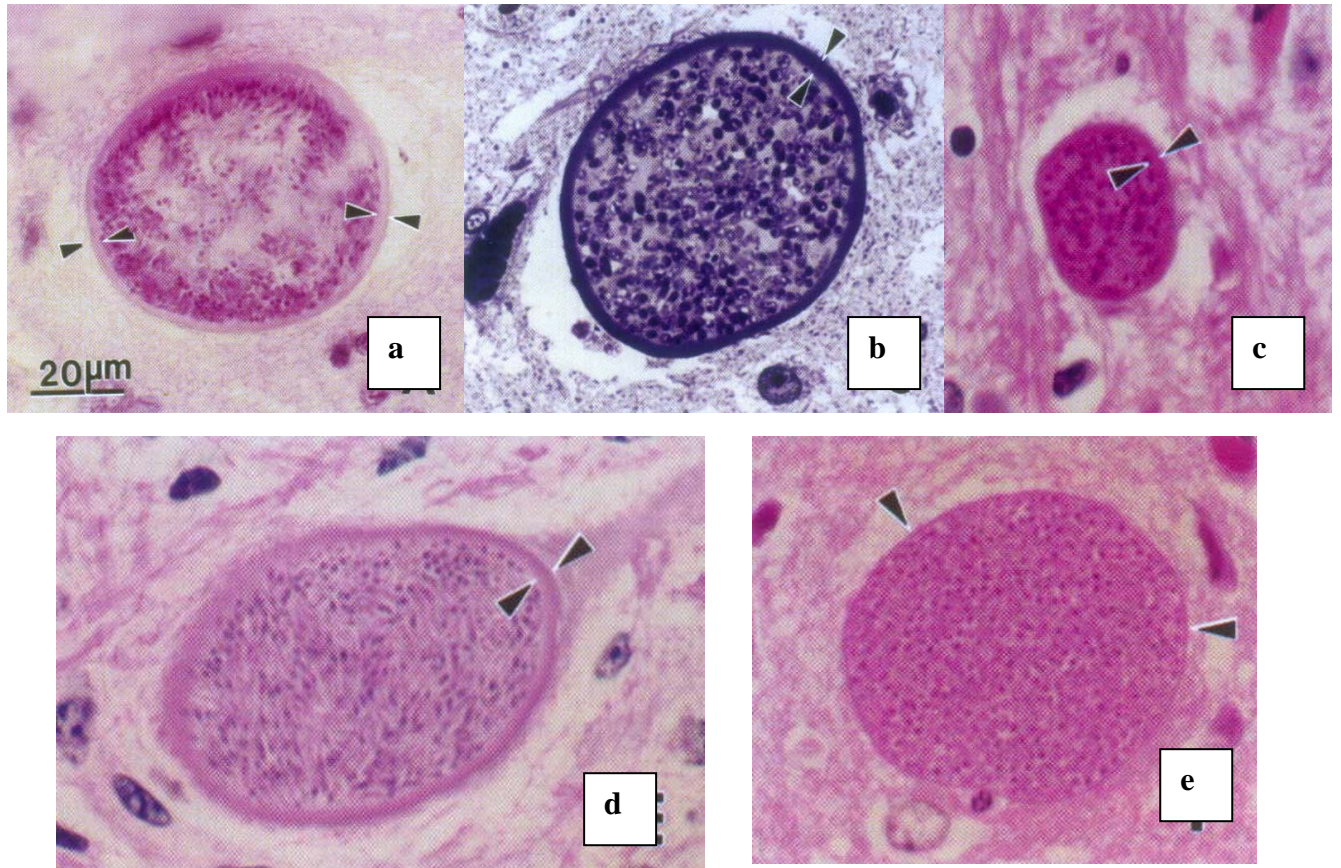


Fig. 4 : Photographies de kystes tissulaires de *Neospora caninum* et de *Toxoplasma gondii* observés en microscopie optique, sur des coupes histologiques de tissus nerveux d'un chien (a, b), d'un cervidé (c), et d'un veau (d). Ces kystes se distinguent de ceux de *Toxoplasma gondii* (e) par la présence d'une paroi plus épaisse (indiquée par les flèches). Chacun de ces kystes renferment un grand nombre de bradyzoïtes. (D'après Dubey et al., 2002)

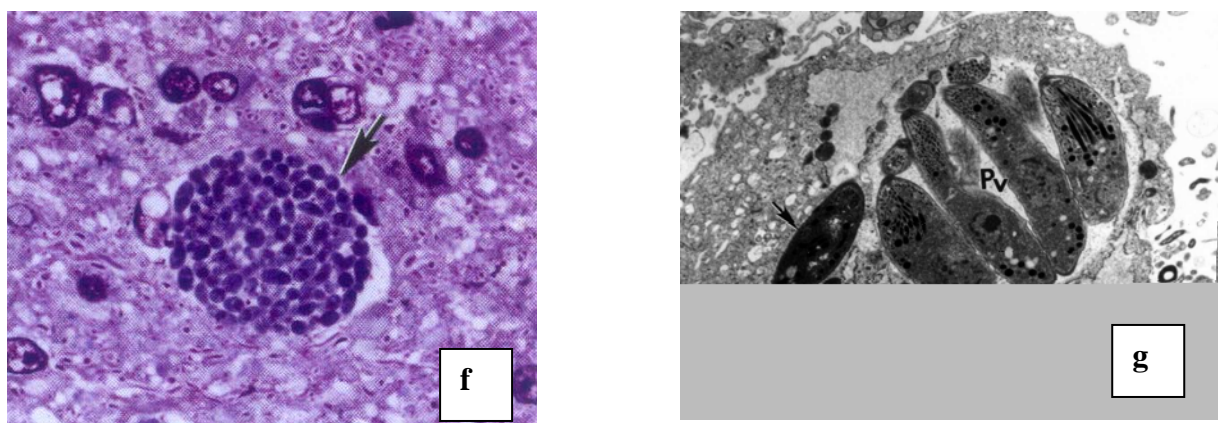


Fig.5 : Photographies de tachyzoïtes de *Neospora caninum* observés en microscopie optique (f) et en microscopie électronique à transmission (g). Un amas de tachyzoïtes est visible sur la coupe histologique (coloration Giemsa) d'encéphale de chien infecté expérimentalement (f). Les tachyzoïtes en culture (cellules HS68) peuvent être observés (g) libre dans le cytoplasme ou contenus en groupe dans une vacuole parasitophore (Pv). (D'après Dubey et al., 2002)

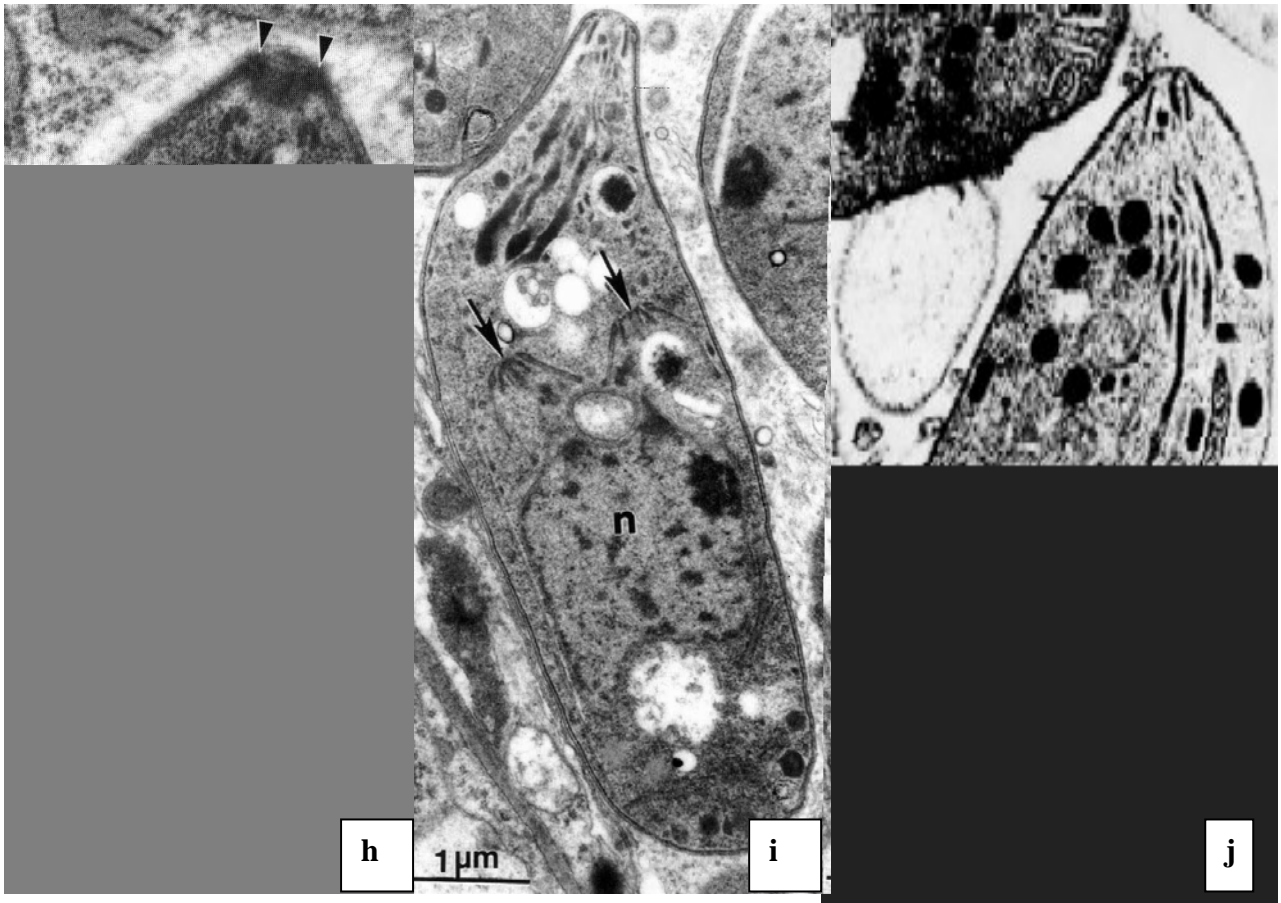


Fig. 5': Photographies de tachyzoïtes de *Neospora caninum* (h, i) et de *Toxoplasma gondii* (j) observés en microscopie électronique à transmission. Les tachyzoïtes de *Neospora* ont entre 6 à 16 rhoptries électrodenses (9 sur cette coupe), et un complexe apicale constitué d'un conoïde et de deux anneaux apicaux. Sur le cliché (i), le tachyzoïte en début de division contient les complexes apicaux (flèches noires) des deux cellules filles avant la division nucléaire (n). Le tachyzoïte de *Toxoplasma* (j) se distingue du précédent par un nombre de rhoptries plus faible et la rareté des micronèmes antérieurs et des corps denses (j). (D'après Dubey et al., 2002)

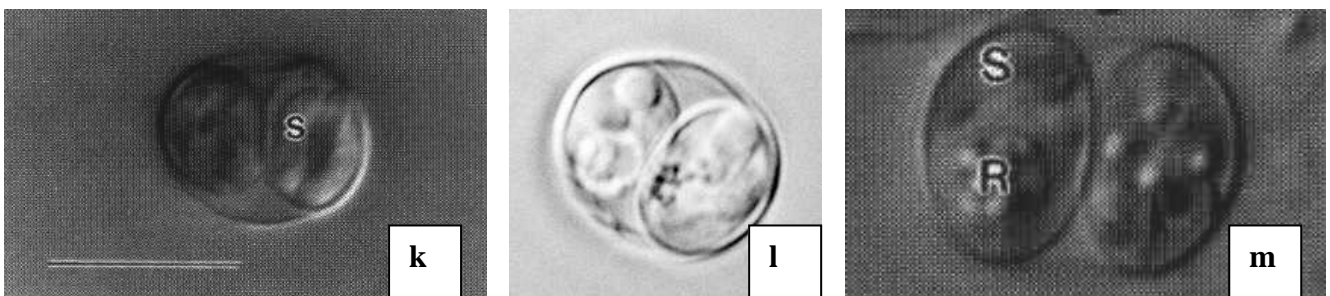


Fig. 6 : Photographies d'ocystes sporulés de *Neospora caninum* (k, l, m), observés en microscopie optique. Ces oocystes, à paroi lisse, incolore et sans micropyle, contiennent deux sporocystes pourvu chacun de quatre sporozoïtes. Un des sporozoïte (S) est visible sur les clichés x et x. Un résidu de la division des sporozoïtes (R) peut parfois être observé dans les sporocystes. (D'après Dubey et al., 2002)

1.1.3. L'oocyste : forme de résistance dans le milieu extérieur (fig.6).

L'oocyste, forme de résistance du parasite dans le milieu extérieur, a été observé pour la première fois dans les selles de chiens nourris avec des tissus infectés par des kystes tissulaires (McAllister *et al.*, 1998b ; Lindsay *et al.*, 1999a). Il est sphérique, mesure 11.7X11.3µm, et est délimité par une paroi lisse, incolore et dépourvue de micropyle. Sous sa forme sporulée, il contient deux sporocystes ellipsoïdes (8.4X6.1µm) pourvus chacun de quatre sporozoïtes allongés (7-8X2-3µm). Les oocystes de *Neospora caninum* sont identiques en microscopie optique à ceux

Sarcocystis, *Besnoitia*, *Hammondia* et *Neospora* ont un cycle fondé sur la relation proie-prédateur entre un hôte définitif carnivore et d'un hôte intermédiaire porteur de kystes tissulaires. La classification des différentes coccidies Eimerides a été établie à l'origine sur des considérations morphologiques et biologiques (annexe 4, 5, 6). Les similitudes phénotypiques observées entre *Neospora caninum* et *Toxoplasma gondii* suggèrent que ces deux espèces suivent un cycle comparable. Le toxoplasme circule entre un hôte définitif féliné (chat, lion, puma, ocelot, jaguar) et un hôte intermédiaire facultatif mammifère ou oiseau. Le chat peut s'infecter en ingérant des oocystes mûrs contenus dans la terre (cycle monoxène) ou en mangeant des tissus d'hôtes intermédiaire infecté de kystes tissulaires (cycle hétéroxène). Le chat joue donc à la fois le rôle d'hôte définitif et intermédiaire pour *Toxoplasma gondii*. Bien que des immunoglobulines anti-*Neospora* aient été détectés à un titre supérieur au 1/40, en DAT chez 11,9 % (60/502) des chats au Brésil (Dubey *et al.*, 2002c), l'excrétion d'oocystes de *Neospora caninum*, dans les conditions naturelles et expérimentales, n'a jamais été obtenue dans l'espèce féline (McAllister *et al.*, 1998a).

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de préciser les relations phylogéniques entre les différentes espèces de coccidies en analysant le degré de similitude des séquences génomiques. Cette approche a permis en outre de révéler que *Neospora caninum* entretient une relation phylogénique plus étroite avec *Hammondia heydorni* qu'avec *Toxoplasma gondii*, ce dernier étant très proche de *Hammondia hammondi* (annexe 7). Ces résultats ont conduit certains auteurs à envisager deux lignées évolutives (Mugrigger *et al.*, 1999). La première représentée par *Toxoplasma gondii* et *Hammondia hammondi*, a un cycle de développement avec un féliné comme hôte définitif. La seconde représentée par *Hammondia heydorni* et *Neospora caninum*, a un cycle de développement avec un canidé comme hôte définitif.

Hammondia heydorni se multiplie par schizogonie puis par gamogonie chez le chien, le coyote et le renard qui sont des hôtes intermédiaires. Ce parasite est peu pathogène pour l'hôte intermédiaire mais il peut infecter de nombreux hôtes intermédiaires herbivores (bovins, ovins, cervidés, chevaux...) et carnivores (renard, chien...). Le cycle de *Neospora* s'apparente donc à celui de *H. heydorni* de part la grande variété d'hôtes intermédiaires et sa phase de multiplication sexuée chez un canidé (le chien). L'intervention du coyote et du renard dans le cycle de *Neospora* en tant qu'hôte définitif n'a pas encore été établie. Pourtant, des oocystes *Hammondia heydorni*-like, indifférentiable en microscopie optique de ceux de *Neospora caninum*, ont été décrits dans les selles de renards nourris avec de la viande de mouton, de chevreuils ou de rennes (Ashford, 1977, Entzeroth *et al.*, 1978, Gjerde, 1984).

Sporogonie :

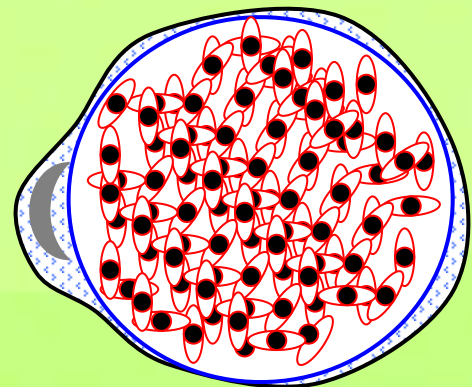
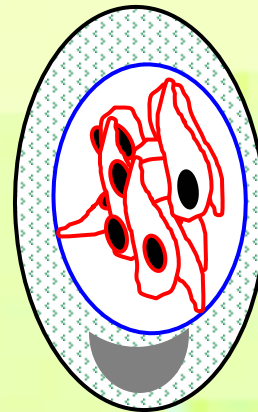
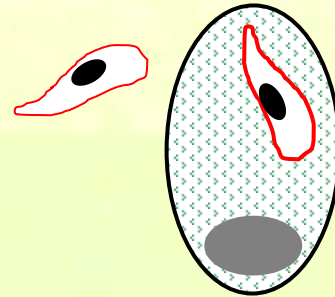
Les oocystes rejetés dans les excréments ne sont pas infectant; ils le deviennent après sporulation en 24 h, dans les conditions optimales.



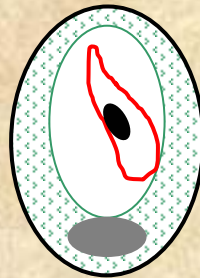
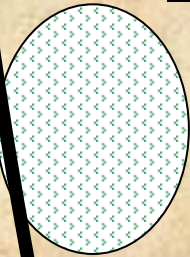
Milieu extérieur

Hôtes intermédiaires

Phase de réplication asexuée par schizogonie



Hôte définitif (tube digestif)



Phase de réplication par schizogonie puis gamogonie :

Les schizontes colonisent des cellules de l'épithélium digestif pour former des gamontes. A l'issue de la fécondation, l'œuf diploïde (ookyste) est évacué avec les excréments. Cette étape ne a lieu que chez l'hôte définitif (le chien).

2. Les sources de parasite.

2.1. Une grande variété d'hôtes intermédiaires sources de kystes tissulaires.

Neospora caninum a été observé dans les tissus de nombreux mammifères. En effet, des cas de néosporose naturelle ont été décrits chez le chien, les bovins, et en moindre proportion chez les ovins, les caprins, le cheval, le cerf, l'antilope (tableau 9). De surcroît, certaines espèces tels la souris, le rat, la gerbille, le macaque, le chat et le renard ont pu être infectées expérimentalement avec succès (tableau 8).

Des anticorps ont aussi été retrouvés chez les buffles d'eau (Bubalus bubalis). Cette espèce de bovidé, adaptée aux milieux marécageux est largement répartie en Eurasie tropicale et subtropicale. On la retrouve sous sa forme domestique en Europe (Italie et Balkans), sur le pourtour méditerranéen, en Asie (îles du sud-est jusqu'à la Chine méridionale du Nord) et sur le continent américain. Sa forme sauvage est plus localisée ; elle est établie en Inde, au Népal et à Ceylan (Schilling et al., 1986). Quatre études de séroprévalences (tableau 10) ont montré que cette espèce était fortement exposée à Neospora caninum, au même titre que le bœuf domestique (Bos taurus), en particulier au Brésil, en Egypte, et en Italie où plus de 60% des troupeaux sont séropositifs.

L'exposition a aussi été mise en évidence chez le chameau (Hilali et al., 1998) et certains félinés africains (Cheadle et al., 1999b). A l'image du toxoplasme, l'existence d'un réservoir sauvage de Neospora caninum a été suggéré à plusieurs reprises. En effet, les anticorps détectés dans les différentes espèces sauvages de ruminants (bovidés, cervidés et caprins) et de carnivores (renards et coyotes) laissent à penser qu'ils puissent jouer un rôle d'hôte intermédiaire dans le cycle parasitaire (Dubey, 1999b). Récemment, la trace de parasite a été retrouvée dans le tissu nerveux de renards roux en Espagne (Almeria et al., 2002). Bien qu'aucune forme endogène n'ait été observée au cours de cette étude, la mise en évidence de séquences d'ADN spécifique de Neospora caninum suggère que le renard puisse être un hôte intermédiaire pour ce parasite. Par ailleurs, l'observation d'une persistance d'anticorps chez de jeunes renardeaux nés de mères séropositives a permis de révéler l'existence d'une transmission congénitale dans cette espèce (Schaes et al., 2001a).

Ainsi, le réservoir de parasite est constitué d'espèces variées, domestiques et sauvage. Mais, leur importance respective dans le cycle parasitaire est imprécise.

Tableau 8 : Résultats de l'infection par *Neospora caninum* des espèces hôtes intermédiaires expérimentales.

Espèce	Circonstances de l'infection expérimentale	Résultats	Référence
Souris	Inoculation de divers souches de tachyzoïtes à des souris immunodéprimées, immunodéficientes, et immunocompétentes	Souris immunodéprimées, immunodéficientes : néosporose clinique. Souris immunocompétentes : pas de symptômes mais présence de kystes tissulaires	Dubey et Lindsay 1996
Rat	Inoculation de 10^5 tachyzoïtes sur des rats immunodéprimés	Néosporose hépatique, pulmonaire et cérébrale. Pas de développement du parasite sur rats non immunodéprimés.	Dubey et Lindsay 1996.
Gerbille	Inoculation IP avec tissus de chien naturellement infecté	Mise en évidence dans la cavité péritonéale de nombreux tachyzoïtes (non infectants pour un second lot de gerbilles).	Cuddon <i>et al.</i> , 1992
Boeuf	Inoculation de tachyzoïtes -IM et SC sur 3 vaches gravides (isolat canin) -IV et IM sur 6 vaches gravides (isolat bovin)	1 fœtus à encéphalomyélite/2foetus sains sans parasite. 3 avortons infectés/2 veau sains/1 veau momifié et infescé	Dubey <i>et al.</i> , 1992c Barr <i>et al.</i> , 1994a
Chat	Inoculation IM de 10^6 et $5 \cdot 10^6$ tachyzoïtes de trois souches sur des chats immunodéprimés (1) ou non (2)	Encéphalomyélite, myosite, hépatite, pneumonie, et néphrite (1)	Dubey <i>et al.</i> , 1990e
	Inoculation SC de $2 \cdot 10^6$ tachyzoïtes chez une chatte gestante de 47 jours.	Lésions d'encéphalite, de myosite asymptomatique. Mortalité fœtale, néosporose généralisée chez les chatons nés vivants, placentite, métrite et néphrite chez la femelle.	Dubey et Lindsay, 1989b.
	Inoculation SC et PO de tachyzoïtes chez des chatons de 3 jours	Encéphalomyélite et myosite avec de nombreux tachyzoïtes au sein des lésions.	Dubey et Lindsay, 1989c.
	Ingestion par 6 chatons de cerveaux de souris infectées / 1 chaton inoculé par voie parentérale	Pas d'oocystes émis.	Mc Allister <i>et al.</i> , 1998
Chèvre	Inoculation de tachyzoïtes sur 6 chèvres naines à 3 stades de gestation différents	Début de gestation : avortement/résorption Mi-gestation : mort né et agneaux sains Fin de gestation : mort peu de temps après la naissance sans mise en évidence de parasite chez les nouveau-nés.	Lindsay <i>et al.</i> , 1995b
Chien	Inoculation de tachyzoïtes chez des femelles gestantes et des chiots (de 10^6 à $5 \cdot 10^6$ tachyzoïtes de divers souches)	Momification, résorption fœtale, encéphalite et myocardite chez les nouveaux nés. Encéphalite, myosite, hépatite et pneumonie chez les chiots. Présence de kystes tissulaires dans le tissu nerveux et de tachyzoïtes dans divers organes.	Dubey et Lindsay, 1989b. Cole <i>et al.</i> , 1995.
Coyote	Trois jeunes coyotes (<i>Canis latrans</i>) inoculés avec du cerveau de souris infectées.	Pas de développement de la maladie, pas d'excrétion d'oocystes, séroconversion.	Lindsay <i>et al.</i> , 1996b
Macaque	Inoculation de macaques (<i>Macaca mulatta</i>) IM et IV avec $1,6 \cdot 10^7$ à 43 jours de gestation	Néosporose congénitale, encéphalomyélite chez les foetus	Barr <i>et al.</i> , 1994b
Mouton	Inoculation IM et IV de brebis gravides	Avortement (J25 et J26 PI) : fœtus avec encéphalite et myosite.	Dubey <i>et al.</i> , 1996b
	Inoculation IV de $1,7 \cdot 10^5$ et $1,7 \cdot 10^7$ tachyzoïtes NC-2 et NC-Liv sur 36 brebis à différents stades de gestation (J65, 90, 120)	J65 :100% avortement J90 :58% avortement, 25% agneaux chétifs, 17% agneaux sains J120 :100% agneaux sains Pas de parasite mis en évidence chez les adultes, NC uniquement observé sur avortons et agneaux chétifs.	
	Inoculation IV, IM, SC de $1,5 \cdot 10^6$ tachyzoïtes sur 3 agneaux d'une semaines	Les 3 agneaux développent une néosporose clinique.	Dubey <i>et al.</i> , 1996a
	Inoculation IV de $1,7 \cdot 10^5$ tachyzoïtes NC-Liverpool et de NC-2 à des brebis gestantes	Avortements répétitifs secondaires à une réactivation de l'infection.	Jolley <i>et al.</i> , 1999
Renard	Inoculation IM de broyat de cerveau de chien infecté naturellement à des renards polaires (<i>Alopex lagopus</i>).	Encéphalomyélite Tachyzoïtes observables sur coupes	Bjerkas <i>et al.</i> , 1984

Tableau 9 : Circonstances de la découverte des espèces hôtes intermédiaires naturelles pour *Neospora caninum*.

Espèce	Organe cible	Méthode de détection	Source
Chien	Fœtus, tissus nerveux, muscle squelettique, cœur, œil, poumons, foie, pancréas, peau.	Histologie, immunohistochimie, PCR, culture, infection expérimentale.	Lindsay et Dubey, 2000.
Boeuf	Tissus nerveux, muscles squelettiques, myocarde, foie, reins, poumons chez le fœtus. Muscles tissus nerveux et placenta chez l'adulte.	Histologie, immunohistochimie, PCR, culture, infection expérimentale.	Dubey et Lindsay, 1996.
Mouton	Encéphale chez un agneau mort-né.	Ultrastructure, immunohistochimie.	Dubey <i>et al.</i> , 1990a
Chèvre	Encéphales d'avortons chez des chèvres laitières Encéphale chez un chevreau	Histologie, immunohistochimie, ultrastructure	Barr <i>et al.</i> , 1992 Dubey <i>et al.</i> , 1992a Dubey <i>et al.</i> , 1996b Corbellini <i>et al.</i> , 2001
Cheval	Encéphale (5) Avortement (2) Tube digestif (1)	Immunohistochimie, PCR, ultrastructure, culture.	Pronost <i>et al.</i> , 2000
Cerf Odocoileus hemionus columbianus	Poumons, reins, foie	Histologie, immunohistochimie	Woods <i>et al.</i> , 1994
Cervus eldi siamensis	Encéphale chez un faon mort-né		Dubey <i>et al.</i> , 1996c
Antilope (<i>Tragelaphus imberbis</i>)	Encéphale, cœur, poumons, foie, rate de 3 morts-nés.	Histologie, sérologie, PCR	Peters <i>et al.</i> , 2001

Tableau 10 : Etudes de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* réalisées chez le buffle d'eau (*Bubalus bubalis*)

Pays	Technique (Seuil de positivité)	Effectif	Séroprévalence	Référence
Italie	IFAT* (>1 : 200)	50 troupeaux 1377 animaux	82 % (41) des troupeaux. 34,6 % (476) des animaux.	Guarino <i>et al.</i> , 2000
Brésil	IFAT (>1 : 25) SA** (>1 : 40)	222 femelles	64 % (142) en IFAT 53 % (117) en NAT	Fujii <i>et al.</i> , 2001
Vietnam	ELISA IFAT	200 animaux	1,5 % (3)	Huong <i>et al.</i> , 1998
Egypte	SA (>1 : 20)	75 animaux	68 % (51)	Dubey <i>et al.</i> , 1998

* IFI : Immunofluorescence indirecte ** SA : Séro-

2.2. Le chien un hôte définitif source d'oocystes.

Les similitudes entre *Neospora caninum* et *Toxoplasma gondii* suggèrent que le cycle de ce parasite coccidien est fondé sur l'interaction proie-prédateur avec un carnivore pour hôte définitif. Divers essais d'infection expérimentale ont été entrepris sur différents carnivores tels le chat (McAllister *et al.*, 1998a), le raton laveur (Dubey *et al.*, 1993), le coyote (Lindsay *et al.*, 1996b), les mustelidés (furet, hermine, et belette) (McAllister *et al.*, 1999) et des oiseaux tels le faucon, le vautour, la chouette effraie, et le corbeau (Baker *et al.*, 1995). Ces essais se sont révélés infructueux : aucun oocyste n'a pu être mis en évidence dans les selles de ces animaux. A l'heure actuelle, la production d'oocystes n'a été observée que dans l'espèce canine.

Le chien est considéré comme hôte définitif depuis l'expérience de McAllister *et al.*, (1998b). L'équipe américaine a nourri quatre chiens beagle pendant 3 jours avec des souris expérimentalement infectées de kystes tissulaires. Des oocystes sphériques sporulant artificiellement au bout de trois jours, sont observés dans les fèces des chiens contaminés. De tels oocystes distribués à des souris immunodéprimées confèrent à celles-ci une néosporose évolutive (McAllister *et al.*, 1998b). Une expérience similaire est reproduite par Lindsay *et al.* (1999a) sur deux chiens dont l'un reçoit 100mg d'acétate de méthylprednisolone par voie intra-musculaire plusieurs fois avant et après l'ingestion de tissus nerveux de souris infectées expérimentalement par un isolat bovin de *Neospora caninum*. Des oocystes ont été observés dans les selles de J5 à J10 après l'inoculation chez le chien immunodéprimé et en moindre quantité entre J6 et J9 chez le chien non immunodéprimé (Lindsay *et al.*, 1999a).

Depuis ces expériences, le chien est considéré comme un hôte définitif potentiel de *Neospora caninum*. Le premier cas d'excrétion naturelle a été observé en Argentine (Basso *et al.*, 2001a) sur un jeune Rottweiler mâle de 45 jours, qui avait eu accès à de la viande crue. Des coccidies *Hammondia*-like ont été observés dans l'extrait de flottation, au cours de l'analyse coprologique. Le pouvoir pathogène du parasite isolé a été mis en évidence lors de l'inoculation à des gerbilles et des souris knock-out pour le gène de l'interféron gama. Les analyses histologiques, immunohistochimiques, et la PCR menés sur les tissus de rongeurs infectés ont révélés la présence de *Neospora caninum*. Plus récemment, en République Tchèque, l'ADN de *Neospora caninum* a été amplifié et séquencé à partir de fèces obtenus d'un Berger allemand (Slapeta *et al.*, 2002). Le chien est donc un hôte définitif naturel pour *Neospora caninum*.

Les modalités du développement de *Neospora caninum* dans le tube digestif du chien et les caractéristiques de l'excrétion des oocystes dans les conditions naturelles ne sont pas encore précisément connues. Expérimentalement, ces oocystes sont excrétés en faible quantité, de manière inconstante et sur une courte durée, après une période prépatente d'environ cinq jours (Lindsay *et al.*, 1999a, Bergeron *et al.*, 2001b).

La phase de développement de *Neospora caninum* conduisant à la production d'oocystes dans les matières fécales du chien (schizogonie et gamogonie) s'accompagne tardivement (au-delà du 120^{ème} jour) d'une production d'anticorps anti-*Neospora* détectables par IFI et Western-Blot (McAllister *et al.*, 1998b ; Lindsay *et al.*, 1999a ; Schares *et al.*, 2001b). Ceci suggère qu'au cours de cette étape du cycle la colonisation de l'organisme par les formes parasites est tardive ou le fruit d'une infection par des oocystes sporulés que le chien ingérerait après les avoir excrétés.

La réaction immunitaire induite par l'infection par *Neospora caninum* chez le chien pourrait aussi entraver la phase de reproduction sexuée puisque l'excrétion n'a été observée que sur des chiens n'ayant pas subi de conversion sérologique à l'égard du parasite (Lindsay *et al.*, 1999a ; Schares *et al.*, 2001b). Les animaux naïfs sur le plan immunologique vis-à-vis de *Neospora*, et en particulier les jeunes chiens, semblent plus réceptifs au développement sexué de ce parasite puisque les cas d'excrétion dans les conditions naturelles n'ont été observés que sur des animaux de moins d'un an (Basso *et al.*, 2001 ; Slapeta *et al.*, 2002).

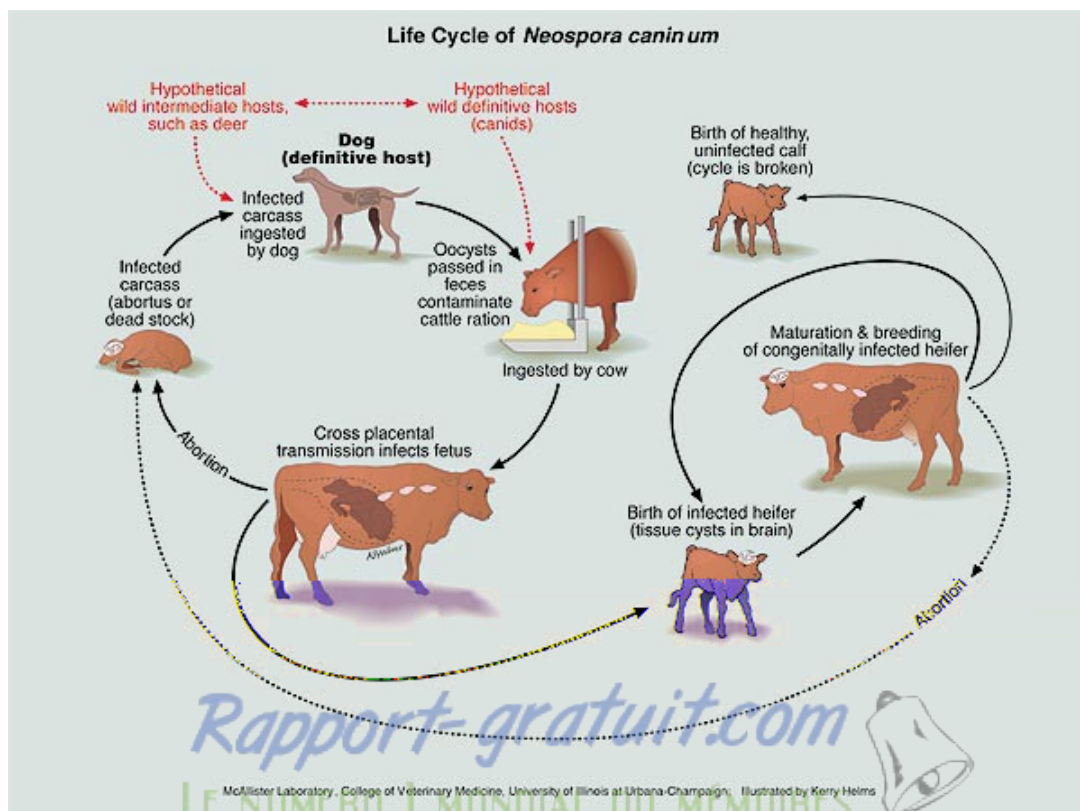


Fig. 8 : Principales voies de contamination par *Neospora caninum* dans les élevages bovins. (D'après McAllister)

3. Les modalités de transmission.

Chez les bovins, deux voies de transmission ont été décrites dans les élevages infectés. Une transmission verticale entre la vache et le fœtus et une contamination horizontale entre différents animaux sans liens de parenté (fig. 8).

3.1. Une transmission verticale

La transmission transplacentaire est la première voie de contamination découverte. Elle a été induite expérimentalement chez la chienne (Dubey et Lindsay, 1989a), la chatte (Dubey et Lindsay 1989c), la vache (Dubey et al., 1992b, Barr et al., 1994a), la brebis (Dubey et Lindsay 1990a, McAllister et al., 1996), la chèvre (Lindsay et al., 1995), la truie (Jensen et al., 1998) et la souris (Cole et al., 1995). Dans les conditions naturelles, les cas de néosporose congénitale ont été décrits chez le chiot, le veau, la chevreau, le poulain, et le faon (Dubey 1999b). L'observation d'une persistance d'anticorps chez des jeunes renardeaux nés de femelles séropositives a aussi permis de mettre en évidence l'existence d'une transmission congénitale dans cette espèce (Schaes et al., 2001a).

*Dans l'espèce bovine, la transmission de *Neospora caninum* au fœtus est consécutive à une phase de parasitémie. Expérimentalement, la probabilité de transmission chez les bovins et les conséquences lésionnelles pour le fœtus seraient liées au moment de l'infection au cours de la gestation (Williams et al., 2000). Comme cela est connu pour la toxoplasmose, plus l'inoculation est tardive au cours de la gestation et plus la probabilité de transmission au fœtus est forte mais moins les dommages tissulaires sont importants (Hemphill et al., 2000). Cette voie de contamination s'est révélée être un mode de transmission au sein des troupeaux très efficace puisque la probabilité qu'une vache séropositive infecte son fœtus est comprise entre 82 à 95% selon les publications (Davison et al., 1999, Hemphill et al., 2000). La transmission congénitale de *Neospora caninum* chez la femelle gestante pourrait être favorisé par le déficit de l'immunité maternelle induit par la gestation (Quinn et al., 2003).*

La transmission transplacentaire peut être répétée chez un animal au cours de gestations successives (Barr et al., 1993, Jolley et al., 1999). Son mécanisme reste en revanche encore méconnu. On ne sait pas encore si les infections congénitales répétées sont dues à une réactivation du parasite chez la femelle ou bien sont secondaires à une réinfection (Atkinson et al., 2000, Dubey, 1999b). Il apparaît que la plupart des avortements sporadiques et endémiques sont le résultat du réveil du parasite au cours d'une infection chronique. En effet, les vaches séropositives ont un risque deux à trois fois plus élevé d'avorter que celles qui sont séronégatives (Moen et al., 1998, Paré et al., 1997). De même, les génisses expérimentalement infectées avant la gestation ont un risque 7,8 fois plus élevé d'avorter, en particulier au cours de leur première gestation (Thurmond et Hietala, 1997b). L'avortement n'étant pas systématique, le jeune infecté in-utero peut naître sain cliniquement et porteur du parasite, participant ainsi à la constitution d'un réservoir parasitaire.

Ce mode de contamination contribue à la persistance de l'infection dans les élevages (Anderson et al., 2000). Toutefois, la transmission verticale ne peut expliquer à elle seule l'épidémiologie de la néosporose (Wouda et al., 1999b).

En effet, la transmission vertical n'étant pas systématique chez l'animal infecté, Neospora caninum devrait disparaître du troupeau sans infection postnatale. Ainsi, le haut niveau de prévalence en élevage ne peut s'expliquer qu'avec la participation d'une transmission horizontale (French et al., 1999).

3.2. Une transmission horizontale.

Les cas de séroconversion post-natale chez des veaux (Davison *et al.*, 1999, French *et al.*, 1999 ; Thurmond et Hietala, 1995, 1997b) ont permis de constater qu'il n'existait pas forcément d'association entre le statut sérologique des mères et celui de leur descendance (Dijkstra *et al.*, 2002). Les modalités de la contamination extra-utérines sont encore peu connues. On peut néanmoins envisager deux modes de transmission horizontale dans un troupeau ; l'une résultant de la contamination directe à partir des animaux du troupeau, l'autre faisant intervenir une source externe de parasite (French *et al.*, 1999).

Dans le premier cas, la distribution, aux veaux, de lait ou de colostrum issu d'animaux infectés, pourrait expliquer les cas de séroconversion observés après la naissance. Bien que les tachyzoïtes soient sensibles in vitro à la digestion par une solution d'acide chlorhydrique et de pepsine, l'hypothèse d'une transmission orale avec passage de tachyzoïtes à travers les muqueuses buccales ou oesophagienne n'est pas écartée (Dubey et Lindsay, 1990). En effet, il a été démontré que du lait contaminé par des tachyzoïtes de cultures et distribué par voie orale

pouvait infecter des veaux (Uggla *et al.*, 1998). Récemment, l'ADN de *Neospora caninum* a été amplifié par PCR à partir de lait prélevé sur des vaches infectées (Moskwa *et al.*, 2003). Bien que la technique employé soit spécifique, ces résultats n'ont pas permis de savoir sous quelle forme le parasite est excrété, s'il est vivant et infectant pour le veau qui le consommerait. L'ingestion des produits de la mise bas contaminés (placenta et fluides fœtaux) par les autres vaches du troupeau est aussi une hypothèse envisageable pour expliquer une transmission horizontale (Bergeron *et al.*, 2000).

Dans le second cas, un hôte définitif excréteur d'oocystes pourrait contaminer l'élevage. Ainsi, le chien en temps qu'hôte définitif du parasite est une source potentielle d'oocystes (McAllister et al., 1998b ; Lindsay et al., 1999a ; Basso et al., 2001a). Son rôle dans la transmission naturelle du parasite aux bovins est encore peu connu, mais diverses observations de terrain suggèrent que Neospora caninum puisse circuler entre l'espèce canine et l'espèce bovine dans les élevages (McAllister et al., 2000 ; Pitel et al., 2001a). Ainsi, l'identité entre les isolats bovins et canins de Neospora caninum (Stenlund et al., 1997) et l'étroite relation entre les statuts sérologiques des bovins et des chiens de ferme (Wouda et al., 1999a) ont révélé que le parasite était transmis entre les deux espèces.

La contamination post-natale peut être à l'origine d'épidémies d'avortements (Bergeron *et al.*, 2000 ; Crawshaw et Brocklehurst, 2003). Dans un troupeau, le taux moyen de transmission horizontale a été évalué à 22 % (Bjorkman *et al.*, 2003).

3.2.1. La contamination naturelle des chiens par des tissus infectés.

Les différences significatives de séropositivité observées à l'égard de Neospora caninum entre chiens de ferme et chiens citadins suggèrent que l'environnement et le mode de vie des chiens en milieu rural puissent favoriser l'exposition au parasite (Sawada et al., 1998, Wouda et al., 1999a). On ne sait pas encore comment le chien s'infecte dans les conditions naturelles mais on pense qu'il se contamine en ingérant des kystes tissulaires par carnivorisme (Dubey et Lindsay, 1996). Les avortons, tissus placentaires et liquides amniotiques sont des sources potentielles d'infection. Du parasite vivant a été isolé à partir de fœtus ou de placenta de bovins infectés (Shivaprasad et al., 1989, Barr et al., 1994a, Fioreti et al., 2000, Bergeron et al., 2001a) et de l'ADN de parasite a été détecté par PCR dans du liquide amniotique (Ho et al., 1997). Par ailleurs, les kystes à bradyzoïtes résistent à un pH acide et sont en mesure d'être infectants par voie orale (Lindsay et Dubey, 1990). Cependant, Bergeron et al., (2001b) ont montré que des chiens nourris avec des fœtus bovins naturellement infectés et n'excrétaient pas d'oocystes et qu'aucun anticorps spécifique de Neospora n'étaient

délectable. Les résultats de cette expérience peuvent être attribués à une charge parasitaire insuffisante, à une faible résistance des kystes à bradyzoïtes présents dans le tissu nerveux des fœtus ou à une résistance des chiens infectés. La culture du parasite à partir des avortons est en effet délicate et laisse penser que le parasite ne résiste pas longtemps dans les conditions naturelles à l'autolyse cadavérique (Conrad et al., 1993). La contamination du chien a toutefois été mise en évidence après l'ingestion de placenta naturellement infecté (Dijkstra et al., 2001).

Les produits carnés crus sont aussi des sources potentielles de parasite. Au Royaume-Uni, l'alimentation des chiens de chasse avec de la viande de bovins crus est vraisemblablement responsable de la très forte séroprévalence observée dans cette population comparée à celle de la population canine urbaine (Hemphill et al., 2000).

L'hypothèse d'une contamination des chiens par des petits mammifères a aussi été suggérée, cette voie de transmission demande toutefois à être confirmée (Klein et al., 1997).

3.2.2. La contamination des bovins par les oocystes d'origine canine :

La présence d'un chien au sein du troupeau s'est révélée être un important facteur de risque pour l'exposition de bovins (Ould-Amrouche et al., 1999, Mainar-Jaime et al., 1999) et la survenue d'avortements à *Neospora caninum* (Bartels et al., 1999, Paré et al., 1998). Par ailleurs, diverses études rétrospectives tendent à confirmer l'hypothèse que le chien puisse être à l'origine d'épidémies de néosporose en élevage (McAllister et al., 2000, Pitel et al., 2001a).

Celui-ci en tant qu'hôte définitif pourrait contaminer les stocks d'aliments et l'eau de boisson des animaux par les oocystes qu'il excrète suite à l'ingestion de tissus infectés (Anderson et al., 2000, Dijkstra et al., 2002). La sensibilité des bovins aux oocystes est encore peu connue. On sait qu'ils sont potentiellement infectants pour les veaux (De Marez et al., 1999) et les vaches (Trees et al., 2002), mais la dose nécessaire pour induire des troubles cliniques est indéterminée. Elle est vraisemblablement importante puisque l'infection de vaches gestantes a été obtenue après ingestion de 600 oocystes mais sans que cette dose ne provoque d'avortements (Trees et al., 2002). Cette constatation est contradictoire avec les caractéristiques de l'excrétion des oocystes par le chien. En effet, ils sont produits en faible quantité (10 oocystes par gramme de fèces) et sur une courte durée (McAllister et al., 1998b, Lindsay et al., 1999a, Dijkstra et al., 2001). Comparée au toxoplasme qui induit des avortements chez les petits ruminants, le chat excrète plus de 150 millions d'oocystes, sur une courte période, suite à une première infection (Davis et Dubey 1995) et la dose nécessaire

pour induire un avortement chez la brebis est inférieure à 1500 oocystes (Owen et al., 1998). L'inadéquation entre les quantités d'oocystes excrétés par le chien et celles nécessaires pour infecter les animaux est paradoxale avec le fort taux de contamination observé dans des cas avérés de transmission horizontale de néosporose. De surcroît, des cas de contamination post-natales ont été observés dans des fermes en l'absence de chien. Cette constatation plaide en faveur de l'intervention d'un autre hôte définitif carnivore (communication personnelle, PH Pitel).

3.3. Facteurs favorisant l'infection.

Outre la présence de chiens sur l'exploitation, d'autres facteurs favorisant l'exposition au parasite ont été observés. Ainsi, la forte densité animale semble favoriser le contact avec le parasite (Barling *et al.*, 2001). Les modalités d'alimentation pourraient aussi avoir une incidence sur le risque d'exposition : l'utilisation d'un distributeur automatique de concentré est associée à une plus faible séropositivité des animaux, tandis que l'utilisation de bales de foin est associée à une plus forte séropositivité (Barling *et al.*, 2001). Le foin contaminé pourrait servir de vecteur aux oocystes excrétés par l'hôte définitif carnivore sur les prairies de récolte. Mais aucune étude n'a permis d'évaluer la résistance de l'oocyste dans les conditions naturelles (Dubey, 1999b).

*D'autres travaux ont montré que la présence d'une basse-cour dans les fermes est un facteur de risque pour les avortements à *Neospora caninum* (Bartel et al., 1999, Ould Amrouch et al., 1999). Les volailles pourraient être des vecteurs mécaniques de parasite ou bien infecter les chiens qui les consommeraient. Peu d'études sur la réceptivité des oiseaux ont été publiés mais l'infection a pu être obtenue expérimentalement chez le pigeon (Mc Guire et al., 1999). Les animaux de basse-cour sont aussi les proies des carnivores sauvages tel le renard. Celui-ci est particulièrement fréquent aux abords des élevages. Au même titre que le chien, il pourrait avoir un rôle d'hôte définitif, être une source d'oocystes et ainsi contaminer les stocks d'aliment ou l'eau de boisson des bovins (Barling et al., 2001). L'observation d'une association spatiale entre l'abondance de carnivores sauvages (renard gris et coyote) et la séroprévalence de *Neospora caninum* dans les élevages au Texas renforce l'hypothèse selon laquelle les carnivores sauvages jouent un rôle dans le cycle de *Neospora caninum* (Barling et al., 2000). Cependant, à l'heure actuelle la production d'oocystes par ces animaux demande encore à être confirmée (Schares et al., 2002).*

4. Les conséquences en terme de lutte contre la néosporose (fig. 14).

Les moyens de lutte contre la néosporose sont encore limités du fait de la découverte récente de ce parasite et des interrogations qui planent encore sur son cycle. Cependant diverses mesures peuvent être employées pour détruire les différentes formes parasitaires (mesures offensives) ou pour éviter la contamination des animaux (mesures défensives).

4.1. Les mesures de lutte offensive.

4.1.1. Des moyens thérapeutiques encore limités pour la lutte chez l'animal infecté..

De nombreuses substances médicamenteuses ont été testées *in vitro* ou chez la souris, y compris des sulfamides, des inhibiteurs de la dihydrofolate-réductase/thymidylate synthétase, des macrolides, des antibiotiques ionophores (lasalocide, monensin, salinomycine,...), des tétracyclines et lincosamides. On a démontré que beaucoup présentaient un certain degré d'activité à l'encontre de *Neospora caninum*, encore que le métronidazole, l'amprolium, la paromomycine et la roxarsone aient une activité limitée ou nulle sur des tachyzoïtes *in vitro* (Dubey et Lindsay 1996). Récemment, Kim *et al.*, (2002) ont montré l'efficacité *in vitro* de l'artémisinine, substance antimalarienne obtenue à partir du qinghao (*Artemisia annua*), plante utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise. Ces recherches laissent entrevoir des espoirs thérapeutiques en matière de néosporose.

Chez le chien atteint de néosporose clinique, les schémas thérapeutiques utilisés sont ceux dérivés du traitement contre la toxoplasmose. L'association sulfadiazine-triméthoprim (30mg/kg/J 2pq), la pyriméthamine (1mg/kg/J) et la clindamycine (11-22mg/kg 2 à 3 fois par jour) sont recommandés en monothérapie ou associés pendant plusieurs semaines. La réussite thérapeutique est d'autant meilleure que le traitement est précoce (Barber, 1998).

Chez les ruminants, l'arsenal thérapeutique est encore très limité du fait du coût des traitements à administrer et de l'absence d'études d'efficacité *in vivo*. Le décoquinat, anticoccidien est utilisé en pratique chez la brebis contre la toxoplasmose. Administré chez la brebis gestante 10 jours avant l'infection par le toxoplasme (Buxton *et al.*, 1996), il diminue l'expression clinique de la maladie (diminution des lésions placentaire et augmentation du nombre d'agneaux vivants). Ce produit est actif sur des tachyzoïtes extracellulaires de *Neospora caninum* entretenus en culture ; à une concentration de 0,1µg.ml⁻¹ il tue les tachyzoïtes en 5 minutes, (Lindsay *et al.*, 1997). Cependant, aucune étude ne permet actuellement de juger de l'efficacité du produit chez l'animal vivant. Certains auteurs proposent l'utilisation du décoquinat en prévention des avortements à *Neospora*. Par exemple, une étude de terrain réalisée par Baricco *et al.* et présentée sur un poster au cours des journées françaises de Buïatrie (Paris, 2002), a consisté à évaluer l'efficacité du

décoquinate dans la prévention des avortements chez les vaches allaitantes. Pour ce travail, les auteurs se sont intéressés à un élevage italien infecté chroniquement par *Neospora caninum* et ayant un taux d'avortement moyen de 12,5% depuis 5 ans. Un lot de 90 vaches et génisses ont reçu du décoquinate (Deccox) à la posologie de 1mg/kg pendant 2 mois à partir du 4^{ème} mois de gestation. L'administration de cette molécule était associée à un moindre taux d'avortement (-70%) chez les animaux traités par rapport au lot témoin (44 bovins issus du même élevage). Cette étude de terrain vient compléter celle réalisée par Journal *et al.* (2001) qui avait utilisé cette molécule à 2mg/kg/J entre 1,5 et 8 mois de gestation. Mais d'autres travaux sont encore nécessaires pour vérifier l'effet anti-coccidien de ce produit chez la vache gestante infectée par *Neospora caninum*.

Des résultats encourageant ont été obtenu avec une autre substance. Le toltrazuril est un anti-coccidien efficace chez la souris infectée par *Neospora caninum*, en limitant la formation de lésions cérébrales de néosporose chez les animaux infectés (Gottstein *et al.*, 2001). Son dérivé le toltrazuril-sulfone (Ponazuril) a aussi une certaine efficacité chez le veau inoculé avec du parasite expérimentalement puisqu'il empêche l'infection du tissu nerveux et d'autres organes (Kritzner *et al.*, 2002).

4.1.2. Les mesures entreprises pour l'assainissement des troupeaux.

La transmission verticale est un mode majeur de persistance de l'infection des troupeaux (Davison *et al.*, 1999, Hemphill *et al.*, 2000). La mesure la plus drastique contre ce mode de contamination serait la réforme de tous les animaux infectés (vache et veaux). En pratique, cette mesure n'est applicable que sur des cheptels pour lesquels la prévalence d'infection est faible. Sur les effectifs à plus forte prévalence il est, pour des raisons économiques et pratiques plus judicieux de ne pas garder les veaux congénitalement infectés pour le renouvellement du troupeau (Wouda 2000).

Bien que la transmission horizontale soit moins fréquente que la transmission verticale, elle semble nécessaire au maintien de l'infection (French *et al.*, 1999). Elle peut être interrompue en détruisant d'une part les tachyzoïtes et kystes à bradyzoïtes contenus dans les placentas, fluides amniotiques et avortons, et d'autre part les oocystes contenus dans les matières fécales de l'hôte définitif (le chien par exemple).

4.2. Les mesures défensives.

4.2.1. La prévention de la transmission verticale.

La contamination congénitale peut aussi être limitée dans les élevages pratiquant le transfert embryonnaire en utilisant des animaux séronégatifs comme femelles porteuses. Cette

technique permet de pérenniser la valeur génétique d'animaux séropositifs tout en prévenant la transmission verticale (Thurmond et Hietala 1995, Landmann *et al.*, 2002).

Ce mode de contamination pourrait aussi être prévenu par la vaccination des animaux. D'un point de vue épidémiologique, le risque d'avortement provoqué par *Neospora caninum* diminue avec le numéro de lactation des vaches (Thurmond et Hietala 1997b). De plus, les vaches ayant déjà subi une infection par *Neospora caninum* ont un risque plus faible d'avorter lors d'un second contact avec le parasite que celles n'ayant pas connu d'infection antérieure (McAllister *et al.*, 2000). Expérimentalement, la vaccination de souris avec des tachyzoïtes entiers a permis d'éviter la transmission verticale chez ces animaux infectés (Liddell *et al.*, 1999a). Les mécanismes immunologiques de la protection vaccinale contre la néosporose ne sont pas clairement définis. Une étude a montré que l'infection expérimentale par *Neospora caninum* provoque une prolifération de lymphocytes T produisant de l'interféron- γ . Cette cytokine inhibe, par ailleurs, la multiplication des tachyzoïtes dans les cellules en culture (Lunden *et al.*, 1998).

Les recherches actuelles s'orientent vers la production de vaccins recombinants induisant des anticorps dirigés contre des protéines de surface et des granules denses, molécules jouant un rôle dans l'invasion des cellules par le parasite (Jenkins, 2001). Un vaccin tué et adjuvé est commercialisé depuis peu aux Etats-Unis (NeoGuard® Intervet USA). Les essais cliniques ont démontré son innocuité et ont révélé qu'il pouvait diminuer le taux d'avortement chez les animaux infectés, mais il ne prévient pas la transmission verticale du parasite (Innes *et al.*, 2002).

4.2.1. Prévention de la transmission horizontale :

Aucune étude n'a encore été développée pour préciser l'efficacité de la vaccination dans la prévention de la transmission horizontale. Cette voie de contamination peut être limitée en empêchant le contact des chiens avec les produits de la mise bas ou de l'avortement (placenta, fluide fœtal, fœtus) des animaux infectés. Ceci afin d'éviter leur infection et l'excrétion possible d'oocystes dans l'environnement des bovins. Thurmond et Hietala (1995) conseillent aussi d'interdire l'accès des bovins au fœtus, au liquide amniotique et au placenta après le part ou l'avortement. Cette voie de transmission n'a pas été démontrée mais elle n'est pas exclue puisque les veaux sont réceptifs à l'ingestion de tachyzoïtes (Uggla *et al.*, 1998). Une autre mesure consiste à limiter la contamination des aliments et des sources de boisson du troupeau à partir des oocystes, ceci en interdisant l'accès des chiens aux stocks d'aliments (McAllister *et al.*, 2000). L'exclusion des chiens de l'exploitation n'est pas forcément justifiée puisque une étude récente a montré que dans un élevage la présence de chiens pouvait diminuer le

risque de séropositivité des animaux. L'hypothèse formulée par les auteurs est que la présence de chiens préviendrait la contamination de l'environnement en éloignant les carnivores sauvages des troupeaux (Barling *et al.*, 2001). Même si aucune étude n'a encore démontré avec certitude le rôle de la faune sauvage dans la transmission du parasite, il est conseillé de protéger les zones d'alimentation et les stocks de nourritures des matières fécales d'animaux sauvages (Thurmond et Hietala, 1995)

Les moyens de lutte développés contre la néosporose découlent de la connaissance du cycle de *Neospora caninum* dont la biologie n'est pas encore précisément cernée.

Les données actuelles ont montré que ce parasite a un cycle de type coccidien dixène avec une grande variété d'espèces mammifères hôtes intermédiaires dont le chien et le bœuf et un hôte définitif carnivore (le chien). Le faible nombre de cas publiés d'excrétion naturelle d'oocystes par le chien, et l'inadéquation entre la quantité d'oocystes produits par le chien et la dose nécessaire pour infecter un bovin soulève un paradoxe épidémiologique. Une des hypothèses formulée pour répondre à ce paradoxe fait intervenir un autre hôte définitif. Diverses études suggèrent que le renard pourrait détenir, dans le cycle de *Neospora caninum*, le double rôle, celui d'un hôte intermédiaire et celui d'un hôte définitif capable d'excréter des oocystes. Certains ruminants sauvages sont également réceptifs et constituent de la sorte un réservoir potentiel de parasite. Le rôle de ces animaux sauvages dans le cycle du parasite reste encore flou à l'heure actuelle, et des études complémentaires sont encore nécessaires pour lever certaines interrogations ; en particulier pour savoir si les espèces sauvages sont capables de transmettre le parasite en quantité suffisante pour infecter un bovins, par quel moyen ils le transmettent et s'ils représentent un réel danger pour les troupeaux de bovins.

C. Les méthodes de diagnostic.

Les manifestations cliniques de l'avortement chez les bovins sont la plupart du temps peu spécifiques. Le recours au laboratoire est de ce fait indispensable pour fonder un diagnostic de néosporose.

1. Les méthodes expérimentales de diagnostic.

Depuis 1988, diverses techniques ont été développées pour le diagnostic de la maladie ou les recherches menées sur le parasite et sa biologie.

1.1. Les techniques sérologiques.

1.1.1. L'immunofluorescence indirecte (IFI).

Premier test mis au point pour mettre en évidence les anticorps anti-Neospora caninum chez le chien (Dubey et al., 1988b), elle est considérée comme une technique de référence. La méthode consiste à mettre en contact des tachyzoïtes de culture (Nc-1) fixés sur des lames avec le sérum à tester (dans ce cas le chien) à différentes dilutions; puis après rinçage à révéler les éventuels anticorps spécifiques, fixés sur les antigènes du parasite, avec des anticorps de l'espèce d'origine marqués à la fluorescéine (fig. 9). Les lames sont ensuite lues au microscope à épifluorescence. Une lame est considérée comme positive lorsque les tachyzoïtes présentent une fluorescence périphérique. Ce test a été développé pour différentes espèces, en particulier dans l'espèce bovine à partir de la souche de culture BPA-1 (Dubey et al., 1996a).

Les tachyzoïtes étant entiers, le test ne détecte que des anticorps dirigés contre des antigènes de surfaces, or ceux-ci sont considérés comme plus spécifiques que les composants intracellulaires chez les espèces du groupe des Apicomplexa (Björkman et Uggla, 1999). Cependant l'infection expérimentale de différents hôtes a montré qu'il existait parfois une faible réaction croisée avec d'autres coccidies (Dubey et al., 1996a), en particulier avec Toxoplasma gondii. En revanche dans ce cas seule une fluorescence apicale non spécifique est observée (Paré et al., 1995a). Ainsi, l'interprétation appropriée du test repose sur la

différenciation de la fluorescence apicale et de la fluorescence du parasite entier. La lecture de la lame est donc subjective et exige un personnel qualifié et entraîné.

La définition d'un seuil de positivité dépend des caractéristiques intrinsèques au test : matériel utilisé, propriétés du conjugué et du microscope (Björkman et Uggla 1999). Il est aussi fonction de l'âge de l'animal. Les valeurs seuil sont en effet plus faibles chez le veau ou le fœtus que chez l'adulte (Dubey, 1999b, Hemphill et al., 2000).

En plus d'être utilisable sur sérum de bovin adulte, l'immunofluorescence indirecte a l'intérêt d'être utilisable sur du sérum de veaux (avant la prise colostrale) et les fluides fœtaux (Barr et al., 1995, Paré et al., 1995a).

Ce test a servi pour la recherche des anticorps anti-*Neospora* chez de nombreuses espèces : chien, renard, chat, bœuf, mouton, chèvre, buffle, cheval, rongeur et primate. Il n'en reste pas moins difficile à mettre en œuvre et d'interprétation délicate ; en revanche il se révèle être spécifique.

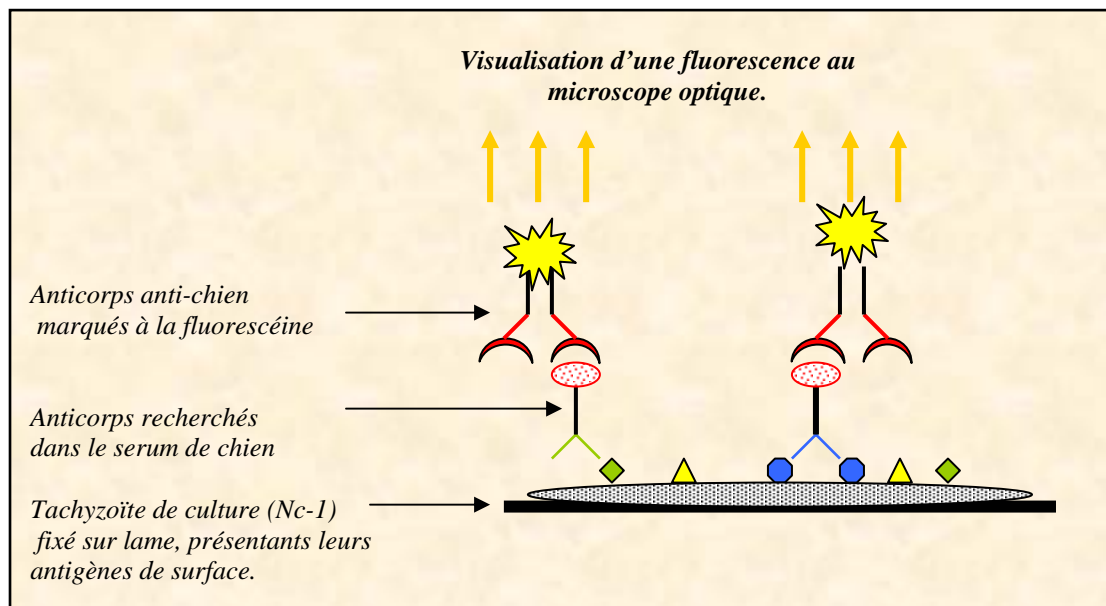


Fig.9 : Principe de la technique de détection des anticorps anti-*Neospora caninum* par immunofluorescence indirecte (Dubey et al., 1988b)

1.1.2. ELISA.

Les tests ELISA sont utilisés pour la recherche d'anticorps d'un grand nombre d'agents pathogènes dont *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum*. Initialement, il a été développé

pour détecter les anticorps anti-*N. caninum* chez les bovins (Paré *et al.*, 1995b), avec des tachyzoïtes de *Neospora.sp*, isolés de fœtus bovin et soniqués. Depuis, deux techniques ELISA ont été développées.

1.1.2.1. L'ELISA indirect.

Le principe consiste à fixer les anticorps spécifiques de *Neospora caninum* présents dans les échantillons de sérum positif en les faisant réagir avec des antigènes spécifiques (extraits solubles ou fractions membranaires) adsorbés au fond des puits d'une plaque de microtitration. Ces anticorps sont ensuite mis en contact avec un conjugué (anticorps spécifiques de l'espèce étudiée couplés à une enzyme). Après incubation et rinçage, la liaison anticorps-conjugué est révélée avec un substrat chromogène qui en présence de la portion enzymatique induit l'apparition d'une coloration dans le puits (fig. 10). La réaction enzymatique est ensuite interrompue avec une solution d'arrêt et l'intensité de la coloration est mesurée par spectrophométrie et exprimée en densité optique (DO). Un échantillon négatif est ainsi caractérisé par une faible intensité de coloration (faible DO) alors qu'un échantillon positif est révélé par une forte intensité de la coloration (DO élevée).

Traditionnellement, des préparations de tachyzoïtes entiers (souche bovine BPA-1 ou canine Nc-1) soniqués ou traités avec un détergent sont utilisés en guise d'antigènes. Une sensibilité de 89 % et une spécificité de 97 % ont été mesurées avec un test préparé à partir d'une souche bovine (Paré *et al.*, 1995b). Des laboratoires rapportent des sensibilités et spécificités respectives de 92-98% et 87-100% avec ce type d'extraits (Björkman et Ugglå 1999).

Cependant les tests sérologiques menés sur les antigènes de membrane seraient plus spécifiques, que les tests réalisés avec des antigènes intracellulaires pour lesquels on suspecte d'éventuelles réactions croisées avec d'autres parasites Apicomplexa. Selon Dubey et Lindsay (1993), comparé à l'IFI il y aurait plus de réactions croisées entre *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum* entiers (souche parvaforme) avec un test utilisant un extrait de parasite entier. Aussi pour se parer d'éventuelles réactions croisées avec d'autres parasites, en particulier avec *Toxoplasma gondii* différents moyens ont été dé

- la réduction du nombre d'antigènes en utilisant des protéines recombinantes ou des antigènes capturés par des anticorps monoclonaux (Lally *et al.*, 1996a Baszler *et al.*, 1996, Jenkins *et al.*, 1997).

Deux variantes intéressantes de cette méthode ELISA ont été proposées. Un test ELISA a été développé pour détecter des anticorps dans le lait. Les résultats obtenus par ELISA sur lactosérum et ELISA sérum sont concordants dans 95% des cas (Björkman *et al.*, 1997). D'autre part, Björkman *et al.*, (1999, 2003) ont décrit un test ELISA Iscom dont le but est de mesurer l'avidité des IgG. Le principe de ce test repose sur le fait que les premiers anticorps (IgM) synthétisés ont une affinité pour l'antigène moindre que ceux produits (IgG) plus tardivement. Comparée à celle de l'IFI, la sensibilité et la spécificité du test ont été évaluées respectivement à 99% et à 96% (Frosling *et al.*, 2003). A l'échelle du troupeau, une forte prévalence en anticorps à faible avidité peut donc indiquer que la contamination est récente, mais le résultat obtenu sur une sérologie individuelle doit être interprété avec plus de précaution (Sager *et al.*, 2003).

*Calcul d'un ratio entre la
DO(E) et la DO (P)
corrigées de la DO (N)*



*Lecture de la densité optique (DO) pour l'échantillon
(E) et les contrôles négatifs (N) et positifs (P).*



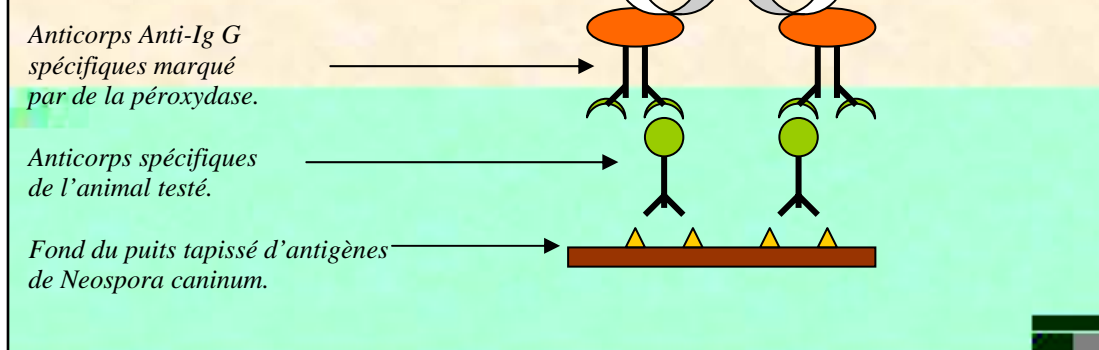


Fig.10 : Principe de l'ELISA indirect appliqué à la détection d'anticorps anti-*Neospora caninum*. (D'après Björkman et Uggl, 1999)

1.1.2.2. L'ELISA compétitif.

Dans cette technique, après avoir mis en contact un échantillon du sérum de l'animal testé avec l'antigène adsorbé au fond du puits, on ajoute des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre un épitope de l'antigène de *Neospora caninum* et liés à une enzyme peroxydase. Si le sérum testé ne contient pas d'anticorps reconnaissant le même épitope que l'anticorps monoclonal, ce dernier se fixe sur l'antigène et est révélé par le substrat chromogène. Au contraire un sérum positif empêche la fixation des anticorps monoclonaux et est caractérisé par une faible coloration du milieu. L'intensité de la coloration déterminée par mesure d'une densité optique permet de calculer un pourcentage d'inhibition du sérum testé par rapport au contrôle négatif (Baszler *et al.*, 1996). Cette technique met en évidence la présence d'anticorps pour un épitope donné, elle s'avère donc plus spécifique et moins sensible que le test ELISA traditionnel. Par ailleurs, aucun conjugué spécifique d'espèce n'étant utilisé, il est donc applicable, sans modification, à de nombreuses espèces, à la différence des tests ELISA classique ou d'IFI.

Tableau 11 : Principe et performance des principales méthodes ELISA développées pour le diagnostic sérologique de la néosporose. (D'après Björkman et Uggl 1999)

	Principe	Caractéristique et performance du test Se (sensibilité) Sp (spécificité)
Extrait total de tachyzoïtes	Lysat de tachyzoïtes entiers obtenus par sonication ou par action détergente.	Se=89-98 % Sp=87-100 % De rares cas de faibles réactions croisées avec d'autres protozoaires (<i>Babesia bovis</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Sarcocystis cruzi</i>) ont été décrites.
Tachyzoïtes entiers fixés.	Les tachyzoïtes ainsi fixés exposent uniquement des antigènes de surface.	Pas de réaction croisées avec <i>T. gondii</i> , <i>S. cruzi</i> , <i>Eimeria</i> spp, <i>Cryptosporidium parvum</i> , ou <i>Babesia divergens</i> . Sérologie bovine : Se=95 % et Sp=96 %

Iscom	Incorporation de protéines de membrane dans des complexes immunostimulants.	Aucune réaction croisée décrite actuellement. Sérologie canine : Se=98 % Sp=96 %. Sérologie bovine : Se=100 % Sp=96 %. Ce test a été adapté à la recherche d'anticorps dans le lait.
Protéines recombinantes	Utilisation d'un mélange de deux protéines recombinantes comme antigène.	Très bonne spécificité.
Capture d'antigènes.	Utilisation d'anticorps monoclonaux pour capturer une protéine de <i>Neospora caninum</i> , utilisée comme substrat antigénique.	Aucune donnée concernant les performances du test n'a été publiée.

1.1.3. Western-blot.

Cette technique consiste à faire migrer des antigènes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis de les transférer (électrotransfert) sur une membrane de nitrocellulose. Après avoir inhibé les sites de liaison non spécifiques, les membranes sont incubées dans le milieu pour lequel on recherche d'éventuels anticorps. La liaison antigène-anticorps est ensuite révélée avec un conjugué (anticorps couplé à une enzyme) et un substrat de révélation. On évalue ainsi la réaction immunitaire humorale de l'animal testé par le calcul de la fraction de la réponse immunologique totale pour chaque antigène. Cette technique est très fiable, permet de détecter des anticorps mais aussi de caractériser des antigènes inconnus avec des anticorps connus. C'est une technique de choix pour la recherche, mais elle n'en demeure pas moins trop coûteuse et compliquée pour le diagnostic en routine courante.

1.1.4. La séro-agglutination.

Le D.A.T. (Direct Agglutination Test) est utilisée depuis 1959 pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose chez l'homme et chez l'animal. Le principe de ce test repose sur le fait que l'on observe une agglutination lorsque des anticorps spécifiques des tachyzoïtes traités au formol sont mis en contact avec des anticorps spécifiques. La méthode d'agglutination directe a été adaptée pour Neospora caninum par Romand et al., (1998) avec l'isolat canin Nc-1 et par Packham et al., (1998) avec l'isolat bovin BPA-1.

Les sérums testés sont traités au 2-mercaptoéthanol (2-ME) pour détruire les IgM. A la différence du test d'agglutination utilisé pour le diagnostic de la toxoplasmose ou un taux d'IgM est calculé en comparant le sérum non traité au sérum traité au 2-ME, le test de séroagglutination employé au diagnostic de néosporose détecte les immunoglobulines (IgG), signes d'une conversion sérologique ancienne.

La comparaison de la méthode d'agglutination directe par Packham et al., en 1998 à celle de l'immunofluorescence indirecte a montré que la sensibilité et la spécificité du test sont

comparables à celles de l'IFI (Björkman et Uggla 1999). Toutefois, une moindre sensibilité a été décrite dans une étude de séroprévalence canine utilisant les deux techniques (Ortuno et al., 2002). Le DAT est considéré comme spécifique de *Neospora caninum* car aucune réaction croisée n'a été trouvée avec les parasites proches, tels que *Toxoplasma gondii*, *Hamondia spp.*, et *Sarcocystis spp.* (Romand et al., 1998, Packham et al., 1998). Par ailleurs, du fait de la simplicité du principe, il s'avère rapide, facile d'utilisation et très sensible ; d'autre part il est applicable à de nombreuses espèces dans la mesure où aucun anticorps conjugué spécifique d'espèce n'est utilisé. En contrepartie, il nécessite de disposer d'un nombre important de tachyzoïtes pour que la réaction soit visible à l'œil nu.

1.2. Les méthodes directes de mise en évidence du parasite.

1.2.1. Les examens nécropsique et histologique.

L'examen nécropsique du fœtus et de ses enveloppes est souvent pauvre en information, les avortons étant fréquemment autolysés (Dubey, 1999b). Par ailleurs, il n'existe aucune lésion macroscopique spécifique de néosporose. Le fœtus peut parfois présenter des lésions de type inflammatoire ou dégénérative dans le cerveau, le cœur ou les muscles squelettiques tels des foyers blancs pâles sur les muscles et de minuscules foyers de nécrose dans l'encéphale (Dubey et Lindsay, 1996). D'après Barr *et al.*, l'atteinte myocardique et cérébrale est systématique (fig. 11). Le recours à l'histologie est indispensable pour caractériser ces lésions. En effet, *Neospora caninum* peut être à l'origine chez le fœtus d'une encéphalomyélite non suppurative, multifocale, avec infiltrat cellulaire, prolifération gliale et occasionnellement des calcifications (Dubey et Lindsay, 1996). L'observation d'un foyer central de nécrose encerclé par des cellules inflammatoires (gliales ou mononucléées) serait très évocatrice d'encéphalite à *Neospora* (Dubey et Lindsay, 1993).

L'examen nécropsique est en outre le moment privilégié pour la collecte et le conditionnement des échantillons destinés au laboratoire.

L'encéphale et le muscle cardiaque sont des prélèvements de premier choix pour rechercher le parasite chez le fœtus et le veau (tableau 12)

Il seront conservés frais ou congelés pour rechercher l'ADN du parasite par PCR, formolés pour rechercher les kystes tissulaires sur les coupes histologiques avec ou sans immunomarquage (tableau 12).

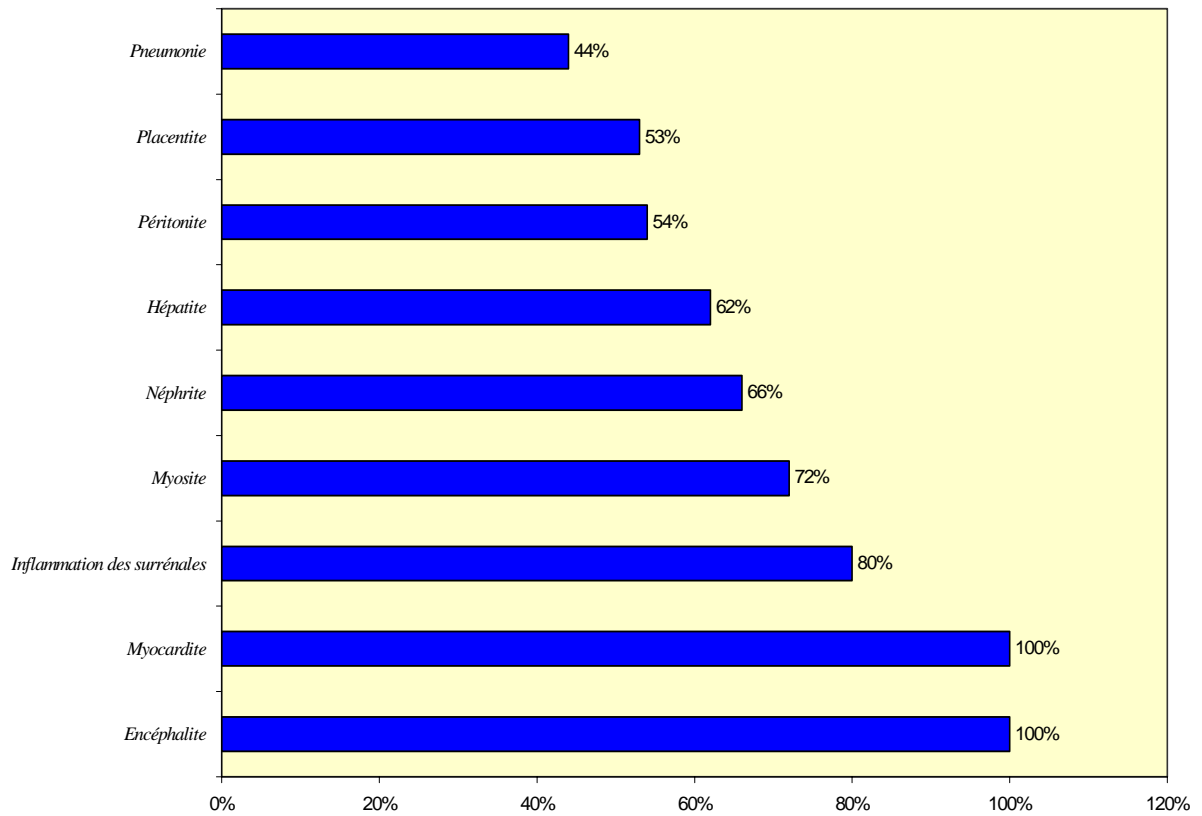


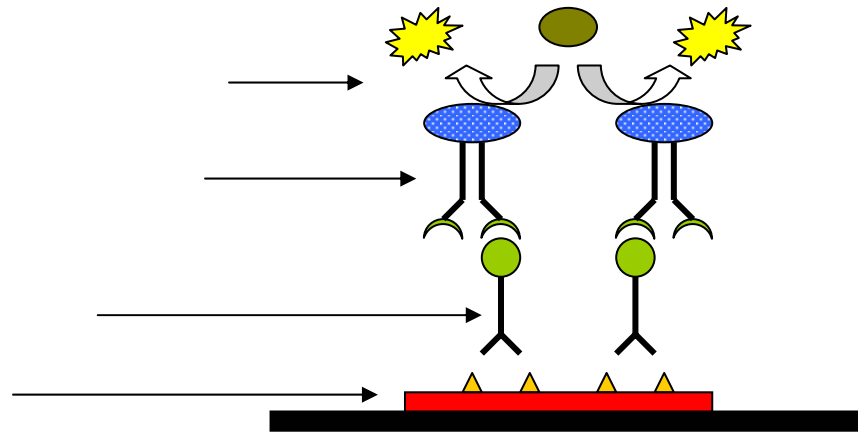
Fig. 11 : Fréquence des lésions observées au cours d'une étude sur la néosporose portant sur 82 fœtus bovins (Barr et al., 1990).

Tableau 12: Prélèvements et conditions d'envoi pour les différentes techniques de diagnostic de la néosporose. (D'après Pittel et al, 2001c.)

Type de prélèvement	Animal concerné	Conditions d'envoi	Analyse réalisable	Intérêt
Encéphale	Avorton, veau	Congelé, frais Formol	PCR Histologie/Immunohistochimie	++++
Cœur	Avorton, veau	Congelé, frais Formol	PCR Histologie/Immunohistochimie	++
Muscle	Veau	Congelé, frais Formol	PCR Histologie/Immunohistochimie	+
Autres organes	Avorton, veau	Congelé, frais Formol	PCR Histologie/Immunohistochimie	+
Placenta	Avorton	Congelé, frais Formol	PCR Histologie/Immunohistochimie	+/-
LCR	Veau	Congelé, frais	PCR	+/-
Fluides foetaux	Avorton	Congelé, frais	Séroagglutination/IFAT	++

1.2.2. L'immunohistochimie.

C'est une méthode de marquage par un complexe immunopéroxydase pour détecter *Neospora caninum* dans les tissus fixés par le formol et inclus dans la paraffine (fig. 12). Cette technique a été décrite pour la première fois par Lindsay et Dubey (1989b) ; au cours de l'évaluation de la spécificité du test aucune réaction croisée n'a pu être mise en évidence avec *T.gondii*, *H. hammondi*, *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis capricanis*, *Sarcocystis tenella*, *Besnoitia jellisoni*, *Caryospora bigenetica*, *Hepatozoon canis*, *Atoxoplasma* sp.. Par ailleurs, un système utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques de *N.caninum* a été mis au point afin d'augmenter la spécificité de la méthode (Dubey et Lindsay 1996). L'immunohistochimie est de sorte un test très spécifique. En revanche, la sensibilité de la méthode est variable. Elle dépend de la réactivité de l'antisérum produit en immunisant des lapins avec le parasite, du protocole de la technique (temps d'incubation, traitement éventuel de l'échantillon avec une enzyme protéolytique, ...), de la qualité du prélèvement analysé. Occasionnellement, deux échantillons prélevés sur le même animal et traités de la même manière peuvent réagir différemment en immunohistochimie ; aussi l'analyse de plusieurs coupes est nécessaire avant de pouvoir affirmer un résultat négatif (Dubey et Lindsay 1996).



*Fig.12 : Principe de la recherche de Neospora caninum par immunohistochimie.
(Dubey et Lindsay, 1999b)*

1.2.3. Culture cellulaire et inoculation à l'animal de laboratoire.

N. caninum a été initialement cultivé in vitro sur des cellules endothéliales et monocytes de bovins (Dubey *et al.*, 1988b). Depuis, de nombreuses autres types cellulaires ont été utilisées (cellules Verro, fibroblastes humains, ...). Seuls les tachyzoïtes sont cultivés et ceux-ci peuvent conserver leur infectiosité chez la souris après huit ans de culture cellulaire (Dubey et Lindsay 1996, Lindsay et Dubey, 1989c). Toutefois, un minimum de deux mois est nécessaire avant de pouvoir conclure à un résultat négatif.

L'inoculation à des souris ou des gerbilles (xénodiagnostic) peut également être utilisée pour mettre en évidence *Neospora caninum* (Lindsay et Dubey, 1989a). Le développement des manifestations cliniques dépend de la lignée de souris, de la souche et de la dose du parasite, et d'un éventuel traitement immunodépresseur préalable (corticoïdes).

La réussite d'un isolement et de l'inoculation est fonction du nombre de parasites dans le tissu et du stade d'autolyse du tissu (Dubey, 1999b). De ce fait, il faut impérativement disposer d'un prélèvement frais pour que les parasites soient viables. Ces deux méthodes sont coûteuses en temps et en argent. Elles sont par conséquent réservées à la recherche mais ne sont guère utilisées en diagnostic de routine

1.2.4.L'examen coprologique.

Les oocystes du parasites peuvent être recherchés dans les matières fécales du chien, espèce hôte définitif. Un enrichissement préalable est nécessaire par une méthode de flottation dans une solution de saccharose à saturation (d=1,20). Le surnageant est ensuite mélangé à de l'eau puis centrifugé. Le culot ainsi obtenu peut être observé en microscopie optique pour rechercher des oocystes de Neospora caninum, qui sont néanmoins semblables à ceux de Toxoplasma gondii. La technique d'enrichissement a été utilisé pour l'étude expérimentale présentée dans ce document (II.A.2.2.). Le culot enrichi peut aussi être utilisé pour rechercher Neospora caninum par la technique d'amplification génique (PCR).

1.2.5. L'amplification génique (PCR).

Différentes techniques ont été décrites pour rechercher l'ADN de N.caninum par PCR (Dubey 1999b). Elles consistent toutes à extraire l'ADN du parasite, à amplifier certaines séquences spécifiques de N. caninum (fig. 13) et à révéler les amplicons après migration sur un gel d'électrophorèse. En revanche, elles se distinguent par le protocole d'extraction et la nature du fragment d'ADN amplifié.

Diverses séquences ont été testées pour la recherche et l'identification du parasite. La séquence de l'ADNr 18S peut être utilisée en PCR pour le diagnostic de toxoplasmose sur divers organes et fluides (Ellis, 1998). La comparaison de cette séquence chez Neospora caninum et Toxoplasma gondii a révélée un faible nombre de nucléotides différents. Les profils de restriction obtenus après digestion des produits d'amplification de l'ADNr 18S par l'enzyme DdeI (Brindley et al.,1993) ou l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques d'espèces sur les produits d'amplification (Ho et al., 1997) ont permis de distinguer ces deux espèces. Bien que le développement de la PCR à partir de l'ADNr 18S ait été d'un intérêt majeur dans la connaissance de la biologie du parasite, son utilisation est limitée par le fort niveau de similarité observé entre les séquences de Toxoplasma et Neospora (Ellis et al., 1994).

Afin de développer une technique PCR suffisamment spécifique de Neospora, d'autres séquences de l'ADNr ont été comparées dans les différentes espèces de coccidies formant des kystes tissulaires. Ainsi, Ellis et al., (1998b) ont développé une PCR basée sur la séquence LSU de l'ADNr qui est suffisamment spécifique de Neospora pour pouvoir le distinguer des autres espèces.

La région de l'ITS (Internal Transcribed Spacer) permet aussi de faire la distinction entre différentes espèces de coccidies formant des kystes tissulaires. La comparaison des séquences entre Toxoplasma et Neospora a montré environ 80% de similarité, avec un nombre suffisant

de bases différentes permettant le développement d'une PCR spécifique d'espèce. Une PCR nichée (« nested PCR ») basée sur cette région a aussi été développée (Payne et al., 1996) Après une première amplification de l'ITS avec des amorces universelles (Tim3 et Tim 11), une seconde PCR est réalisée avec des amorces internes spécifiques d'espèce (NS1 et TS3). Cette technique a pu être améliorée en recherchant des amorces plus spécifiques et en réalisant les deux amplifications successives sans changer de tube (Ellis et al., 1997).

La PCR a aussi été appliquée sur la séquence NC-5 du parasite ; cette méthode s'est révélée suffisamment spécifique et sensible pour être utilisée en routine pour la recherche de parasite dans différents organes (Kaufmann et al., 1996, Yamage et al., 1996, Lally et al., 1996b).

*Cette séquence est le support de différentes variantes de PCR. Liddell et al. (1999b) ont décrit une PCR compétitive permettant d'évaluer le niveau d'infection et de s'affranchir des résultats faussement négatifs avec la méthode traditionnelle. Spencer et al. (2000) ont utilisé la séquence NC-5 pour la réalisation d'un amorçage aléatoire de la séquence (« random priming ») permettant de distinguer *Neospora caninum* de *Neospora hughesi*. Enfin, une technique d'amplification en temps réel a été développée avec cette même séquence. Cette dernière a l'intérêt de suivre la quantité d'ADN amplifiée et d'estimer la quantité de parasite recherchée (Muller et al., 2002).*

La PCR a l'avantage d'être applicable à différents tissus, frais, congelés ou fixé sur lame (Baszler et al., 1999a), voire autolysés (Pittel, communication personnelle). Par ailleurs, cette technique a l'avantage d'être en partie automatisable. Son développement a trouvé de nombreuses applications diagnostiques, phylogéniques, et dans la connaissance de la biologie du parasite. Elle permet en outre de détecter les différentes formes parasitaires vivantes ou mortes avec une même technique. A ce titre, des oocystes ont pu être mis en évidence dans les fèces de chiens, par PCR (Hill et al., 2001). Cette approche laisse entrevoir des perspectives intéressantes pour préciser le rôle du chien comme hôte définitif et pour explorer le rôle de carnivores sauvages dans le cycle parasitaire (Jenkins et al., 2002).

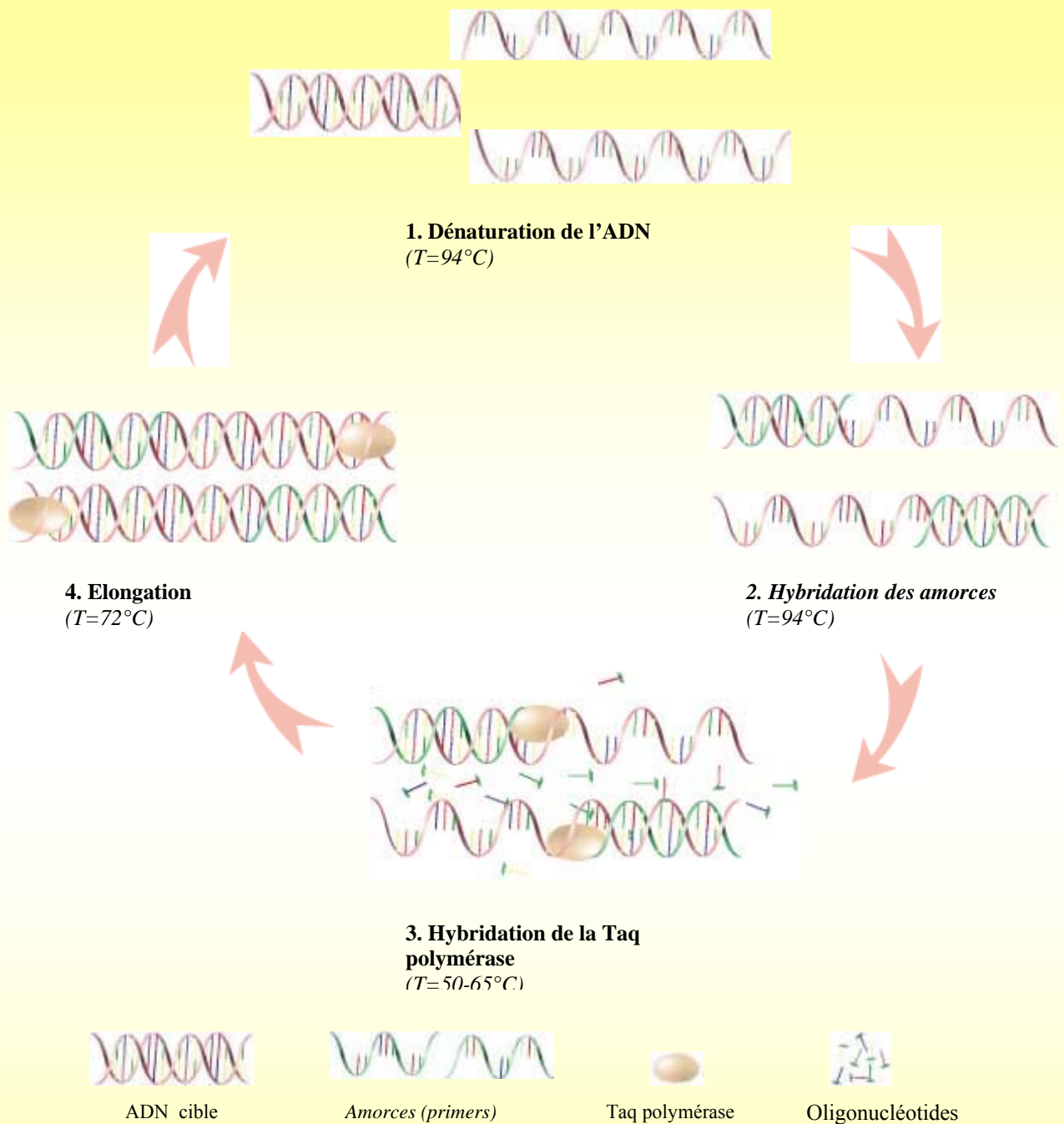


Fig. 13: Mécanisme de la méthode d'amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Au cours d'un cycle, les deux amorces spécifiques (sens et anti-sens) s'hybrident à l'acide nucléique cible en présence d'un excès de désoxynucléotides. La Taq polymérase (ADN polymérase stable à haute température) synthétise le brin complémentaire, sa taille est conditionnée par la durée de la phase d'élongation. L'ADN neoformé est soumis successivement à n cycles qui permettent d'obtenir 2^n copies d'ADN.

2. Application au diagnostic de terrain.

Les manifestations cliniques de l'infection par Neospora caninum en élevage bovin sont peu spécifiques (Lindsay et al., 1996a). Les examens complémentaires sont nécessaires pour étayer un diagnostic de néosporose. Les différentes techniques développées pour mettre en évidence le parasite n'ont pas la même valeur.

2.1. Valeur des techniques pour un diagnostic individuel.

Le recours au laboratoire est indispensable pour le diagnostic étiologique et différentiel de l'avortement chez les bovins. Compte tenu de son faible coût, et de son intérêt pratique, l'examen sérologique de l'animal ayant avorté est fréquemment utilisé. Les tests ELISA, l'agglutination et l'IFI peuvent être utilisés (annexe 8') ; leur spécificité et leur sensibilité sont équivalentes (Bjorkman et Uggl, 1999). Une sérologie positive pour Neospora caninum permet de confirmer l'exposition au parasite. Toutefois, cet examen ne suffit pas pour conclure que l'avortement en est la conséquence. Bien que les animaux séropositifs aient un risque trois à cinq fois plus important d'avorter que des animaux indemnes (Pare et al., 1997, Wouda et al., 1999b), l'exposition au parasite ne s'accompagne pas nécessairement d'un avortement et ne protège pas la vache des autres agents abortifs, ni même d'un futur avortement à Neospora caninum. Par ailleurs, il n'existe pas de corrélation entre le taux d'anticorps et le risque d'avortement (Pare et al., 1995b, Schares et al., 1999). L'observation d'une conversion sérologique 3 semaines après le premier prélèvement est un bon indicateur d'une infection. Mais, la contamination étant souvent précoce par rapport à l'avortement, les animaux ont déjà effectué leur conversion lors des manifestations cliniques (Pitel et al., 2001c).

Le praticien doit aussi rester prudent dans l'interprétation d'un résultat sérologique négatif, en effet, on peut observer une diminution du taux d'anticorps autour du péri-partum (Conrad et al., 1993 ; Hemphill et al., 2000).

Les résultats donnés par la sérologie, chez les vaches, ayant un niveau de certitude trop faible, les méthodes de diagnostic direct chez le fœtus sont à privilégier. Elles ont l'avantage de mettre en évidence le parasite, son ADN ou les lésions qu'il a pu provoquer. La PCR est une technique à la fois très sensible et spécifique mais elle ne permet pas de faire un lien de cause à effet entre la présence de parasite et l'induction de l'avortement puisqu'un certain nombre de fœtus peuvent être porteur sain du parasite (Williams et al., 2000). L'histologie et l'immunohistochimie ont l'avantage de mettre en évidence un phénomène actif et de relier la présence de Neospora caninum aux symptômes observés ; cependant ces techniques sont

vraisemblablement moins sensibles que la technique d'amplification génique qui a par ailleurs l'atout d'être automatisable et applicable aux tissus autolysés (annexe 8).

Ainsi, le diagnostic individuel de néosporose ne doit pas être fondé sur un unique résultat de laboratoire. La confrontation des données cliniques, épidémiologiques et des éléments apportés par le laboratoire est indispensable pour affirmer un diagnostic de néosporose.

*La principale difficulté du diagnostic repose sur le fait qu'une proportion non négligeable de transmission congénitale de *Neospora caninum* ne conduit pas à des troubles de reproduction (Pare et al., 1996 ; Thurmond et Hietala, 1997b ; Moen et al., 1998). Ainsi la mise en évidence du parasite ou de sa trace chez le fœtus ne permet pas d'affirmer l'origine de l'avortement dans la mesure où d'autres agents sont responsables de tels symptômes (BVD, brucellose, IBR, fièvre Q, traumatisme, cause iatrogène...).*

La néosporose peut aussi être suspecté chez des veaux atteints de troubles neurologiques, en particulier dans les élevages rencontrant des problèmes d'avortement. Le diagnostic différentiel est délicat compte tenu du grand nombre de maladies neurologiques pouvant atteindre les jeunes bovins. Dans ce cas, la recherche du parasite et des lésions dans les tissus des animaux morts permet de confirmer l'infection parasitaire. L'utilisation de la sérologie chez l'animal vivant est limitée du fait de la présence d'anticorps colostraux.

2.2. Diagnostic de néosporose à l'échelle du troupeau (fig.14).

*Le diagnostic de la maladie à l'échelle du troupeau intervient généralement à l'issue d'un ou plusieurs avortements provoqués par *Neospora caninum* ; l'objectif étant de déterminer le mode principal de contamination de l'élevage pour choisir l'attitude à adopter vis à vis du troupeau et lutter efficacement contre la maladie (Pitel et al., 2001c).*

La première étape consiste à préciser le contexte épidémiologique des avortements. Ainsi, le praticien devra tenir compte de la conduite de l'élevage, du statut sanitaire de l'exploitation vis-à-vis des maladies infectieuses, du nombre d'avortements, de leur répartition dans le temps, des signes cliniques associés, et de l'âge des avortons. Dans un second temps, il pourra réaliser un sondage sérologique des animaux. C'est dans ce contexte que la sérologie prend tout son intérêt pour estimer l'exposition de la population testée au parasite (Paré et al., 1998). Il est intéressant de tester les ascendants, les descendants et collatéraux des animaux ayant avorté, en particulier face à une contamination verticale. La recherche des anticorps sur les animaux d'un même lot que les femelles ayant avorté est utile dans le cadre d'une contamination horizontale. Enfin, si l'examen sérologique partiel du troupeau révèle la

présence d'animaux séropositifs, il est intéressant de sonder tout le cheptel pour appliquer les mesures de lutte.

Lorsqu'un mode de contamination horizontal est suspecté, il convient de réaliser un examen sérologique des autres animaux de la ferme, en particulier du chien qui est une source potentielle d'oocystes. Toutefois, le résultat de la sérologie doit être interprété avec prudence, car la plupart des chiens excréteurs n'ont pas d'anticorps détectables par les techniques de routine (Schaes et al., 2001b). Un résultat positif signifie donc que le chien a été exposé au parasite, qu'il a pu excréter et qu'il n'excrète probablement plus au moment de l'analyse, alors qu'un chien séronégatif est un excréteur potentiel d'oocystes. Le statut sérologique des chiens n'est donc pas une technique intéressante pour la détection des animaux excréteurs. Cependant, des anticorps spécifiques d'un antigène de haut poids moléculaires (152kDa) extrait d'une préparation de tachyzoïtes ont été détectés chez des chiens excréteurs par immunoblot ; des études supplémentaires sont en revanche nécessaires pour évaluer la spécificité de ce test (Schaes et al., 2001b).

Le diagnostic de la néosporose est délicat puisque l'infection par *Neospora caninum* peut être asymptomatique. Divers techniques ont été développées pour mettre en évidence le parasite ou les signes de son infection : des techniques sérologiques (IFAT, NAT, ELISA, Western Blot) et des méthodes de détection directe (immunohistochimie, culture, inoculation et PCR). Ces tests n'ont pas la même valeur et leur utilisation doit être raisonnée en particulier dans les élevages de bovins où les frais de diagnostic sont souvent limités.

Ces méthodes sont aussi employées en recherche pour l'étude du parasite et de sa biologie. Nous avons choisi d'utiliser la séroagglutination et les tests ELISA pour l'étude expérimentale de séroprévalence présentée dans la suite de ce document. Pour la recherche de parasite dans les tissus nerveux et les matières fécales de renard, nous avons employé la méthode d'amplification génique (PCR) qui outre les fortes sensibilité et spécificité de la technique a l'intérêt d'être en partie automatisable.

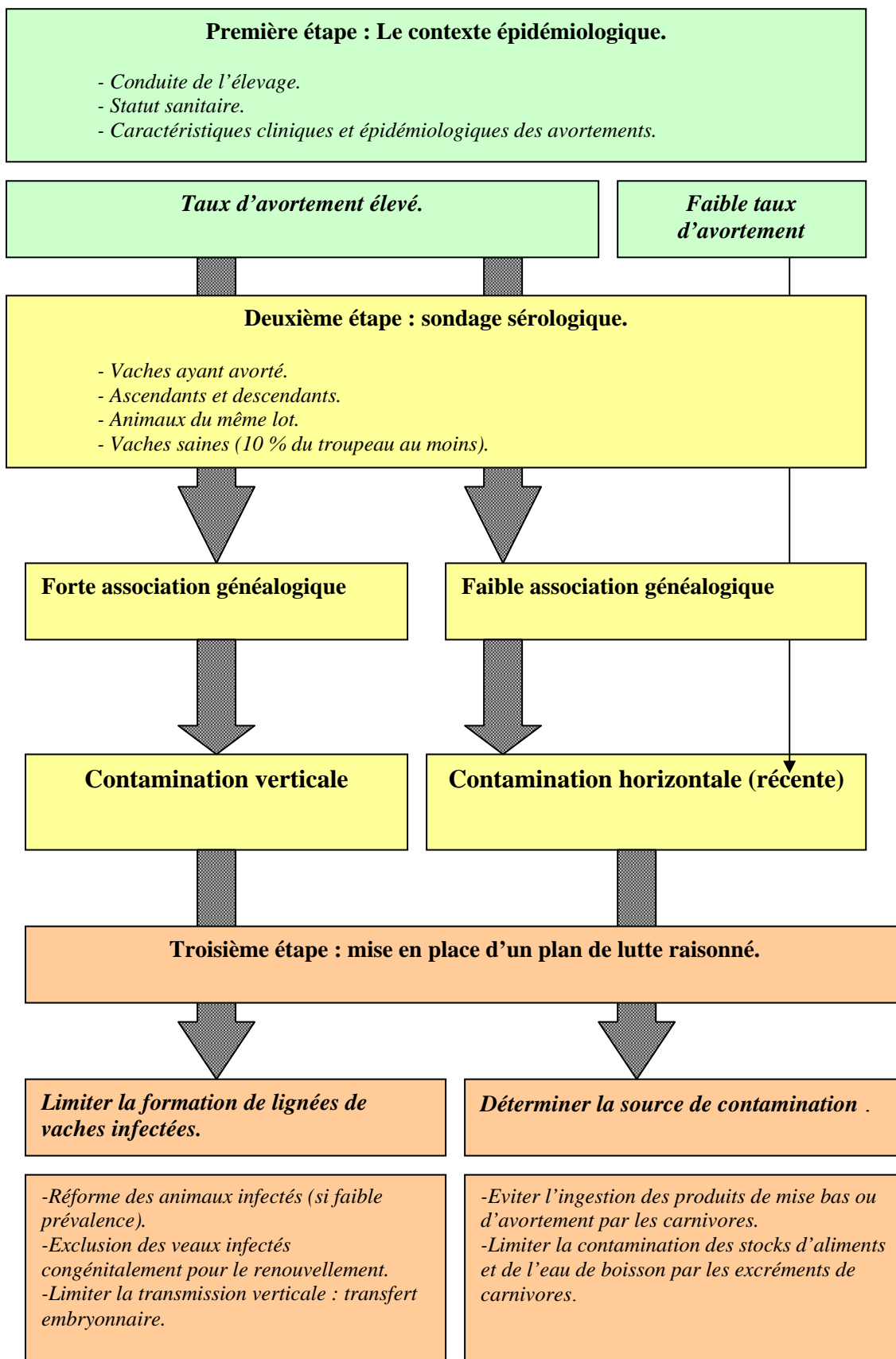


Fig. 14 : Protocole de diagnostic en vue d'une lutte raisonnée contre la néosporose en élevage bovin (D'après Pitel et Fortier, 2002).

II. Etude expérimentale.

Neospora caninum est un parasite décrit essentiellement chez les chiens et les bovins, chez d'autres espèces domestiques, et divers animaux sauvages tels le cerf à queue blanche (*Odocoileus virginianus*) (Dubey *et al.*, 1999b), le cerf à queue noire (*Odocoileus hemionus*) (Woods *et al.*, 1994), le coyote (*Canis latrans*) (Lindsay *et al.*, 1996b) et le renard roux (*Vulpes vulpes*) (Buxton *et al.*, 1997a). Actuellement, le rôle de la faune sauvage dans le cycle du parasite et dans l'épidémiologie de la maladie est encore mal connu. Pourtant aux vues de quelques études séroépidémiologiques, l'hypothèse d'un cycle sylvestre a été formulé à plusieurs reprises (Dubey, 1999a, Barling *et al.*, 2000, Barling *et al.*, 2001). L'exposition des ruminants sauvages est peu décrite en France, alors que des anticorps ont été retrouvés sur des populations de chevreuils, de cerfs et de chamois prélevés dans les Alpes italiennes (Ferroglio et Rossi, 2001). Par ailleurs, les études de séroprévalence menées sur le renard roux en Belgique, en Irlande et au Royaume-Uni ont montré que cette espèce était exposée à *Neospora caninum* (Buxton *et al.*, 1997a ; Barber *et al.*, 1997 ; Simpson *et al.*, 1997 ; Wolfe *et al.*, 2001). Récemment, ce canidé s'est révélé être réceptif au parasite puisque l'ADN de *N. caninum* a été retrouvé dans l'encéphale de renards sauvages en Espagne (Almeria *et al.*, 2002). De plus, la transmission verticale a été mise en évidence chez cet hôte (Schaes *et al.*, 2001a), mais aucune étude n'a encore permis de montrer qu'il était capable d'excréter des oocystes au même titre que le chien (Schaes *et al.*, 2002).

Le travail expérimental présenté dans cette partie consiste à évaluer la prévalence de l'infection par *Neospora caninum* dans des populations françaises de chevreuils, de chamois, de bouquetins et de renards roux. J'ai réalisé ces recherches dans le cadre d'un stage de fin d'étude au laboratoire Franck Duncombe (LDV-14), à l'initiative du Dr. Pitel qui m'a encadré tout au long de mon travail. Nous avons tenté de déterminer le statut sérologique de différentes espèces de ruminants et renards sauvages. Par ailleurs, nous avons recherché l'ADN de *Neospora caninum* par la technique d'amplification génique (PCR) développé par le laboratoire, à partir de prélèvements d'encéphales et de matières fécales de renards sauvages chassés en Bretagne et collectés par la Fédération de Chasse.

A. Matériel et méthode.

1. Serologies à partir de sérums de ruminants et de renards sauvages.

1.1. Les groupes d'animaux testés :

Pour évaluer l'exposition de la faune sauvage au parasite, nous avons testé 428 sérums provenant de :

- 100 chamois (*Rupicapra rupicapra*)
- 65 bouquetins (*Capra ibex*)
- 106 chevreuils (*Capreolus capreolus*)
- 157 renards (*Vulpes vulpes*)

Un total de 256 prélèvements sanguins de ruminants nous ont été envoyés sous couvert du froid par le Laboratoire Départemental Vétérinaire de Savoie (73). Ces sérums, prélevés dans le cadre d'études biologiques sur les ongulés sauvages, menées dans différents départements français, ont été choisis au hasard dans la sérothèque de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) de Nancy sur différentes années. L'âge et le sexe sont connus pour chacun de ces animaux.

Par ailleurs, les sangs de 17 chevreuils et de 157 renards ont été prélevés en Bretagne, par la Fédération de chasse d'Ille-et-Vilaine. Ces échantillons ont été obtenus, par ponction cardiaque, sur des animaux morts ; puis ont été conservés à -20°C avant leur utilisation.

1.2. Les tests utilisés :

Trois techniques sérologiques ont été utilisées pour détecter les anticorps anti-*Neospora* dans ces espèces :

- la séroagglutination
- l'ELISA indirect
- L'ELISA par compétition

Le test d'agglutination décrit par Romand *et al.*, (1998) a été réalisé par le laboratoire de la toxoplasmose (Institut de puériculture, 26 Bd Brune 75014 PARIS cedex), service ayant mis au point la technique. Les sérums, préalablement traités au 2-mercaptoéthanol et dilués au 1/20, 1/40, et 1/80 sont mis en contact avec des tachyzoïtes de *N. caninum* produits sur ascite

de souris. Les sérums positifs au 1/80 ont ensuite été testés aux dilutions 1/100, 1/200, 1/400 et 1/800.

Pour l'ELISA par compétition, nous avons utilisé le kit VMRD ® *Neospora caninum* C-ELISA (LSI, Lissieu, France). L'indice de fixation des immunoglobulines spécifiques du parasite recherché a été évalué par lecture de la densité optique à 630nm avec un spectrophotomètre (DYNEX).

A la différence des deux tests précédemment cités, pour lesquels il n'existe a priori pas de barrière d'espèces, les conjugués utilisés pour la réalisation de l'ELISA indirect sont spécifiques de l'espèce testée. En supposant qu'il puisse exister des communautés antigéniques d'une part entre les ruminants sauvages et les bovins et d'autre part entre le renard et le chien, nous avons aussi testé le kit ELISA indirect fourni par BIOVET (Saint-Hyacinthe, Canada) pour les sérums de renards et celui distribué par INTERVET S.A. (CHEKIT, Bommeli diagnostics, Angers Technopole) pour les sérums de ruminants. La fixation des immunoglobulines sur les anticorps recherchés a été calculée par mesure de la densité optique à 405nm pour ces deux tests. Nous avons suivi le protocole indiqué par les fabricants pour chacun des tests et utilisé les seuils de positivité proposés pour interpréter les résultats (tableau 13).

Tableau 13: Tests sérologiques utilisés pour l'étude de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* dans la faune sauvage. Les techniques ELISA ont été réalisées au LDV-14 ; les prélèvements ont été envoyés à l'Institut de Puériculture pour y être testés en parallèle par l'équipe ayant mis au point la technique d'agglutination pour le diagnostic de la néosporose. Avec les tests ELISA, nous avons évalué la fixation des immunoglobulines marquées par mesure de la densité optique pour les échantillons testés. les contrôles négatifs et positifs.

Test	Espèces testées	Kits utilisés ou laboratoire d'analyse	Interprétation des résultats (données fournisseurs)
ELISA par compétitif	Ruminants Sangliers Renards	Kit VMRD <i>Neospora caninum</i> C-ELISA	Positif si % inhibition. ≥ 30 Négatif si % inhibition < 30 % % inhibition = $100 \times (\text{Don} - \text{Doe}) / \text{Don}$.
ELISA indirect	Renards	BIOVET Kit de détection des anticorps dirigés contre <i>Neospora caninum</i> dans les sérums de chiens.	Positif si ratio ≥ 0.3 Négatif si ratio < 0.3 Ratio = $(\text{Doe} - \text{Don}) / (\text{Dop} - \text{Don})$.
	Ruminants Sangliers	INTERVET Kit de détection d'anticorps anti- <i>Neospora</i> dans les sérums d'origine bovine.	Positif si pvc $> 50\%$ Douteux si pvc = $40-50\%$ Négatif si pvc $< 40\%$ pvc = $100 \times (\text{DOe} - \text{Don}) / (\text{DOp} - \text{Don})$
Agglutination	Ruminants Sangliers Renards	Prélèvements envoyés pour analyse à l'Institut de Puériculture (Laboratoire de la Toxoplasmose-PARIS)	Sérums positif après traitement au 2-Mercapto-éthanol si une agglutination est observée à un titre supérieur ou égal au 1/40 (Romand <i>et al.</i> , 1998).

2. Recherche de l'ADN de *N.caninum* dans les organes et fèces de renards sauvages.

2.1. Les groupes d'animaux étudiés.

Afin d'évaluer l'infection des renards par *Neospora caninum*, l'ADN du parasite a été recherché dans 78 prélèvements de cerveaux de renards sauvages et dans les encéphales de fœtus prélevés sur 17 utérus de femelles gestantes de renards roux prélevées en Bretagne. D'autres part, 58 fèces prélevées sur des animaux chassés en Ile-et-Vilaine ont aussi été testés en PCR après avoir été enrichis par une technique de flottation.

2.2. Flottation et lyse des oocystes.

La flottation des oocystes a été conduite en utilisant la technique décrite par J.P. Dubey (communication personnelle). Ainsi, les fèces de renards conservés dans une solution de bichromate de potassium à 2,5% sont soumises à un enrichissement parasitaire en utilisant la méthode de flottation avec une solution de saccharose ($d=1,20$). Après avoir homogénéisé approximativement 20 g de fèces avec 40 ml d'une solution de sucrose, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes (2500 tours/min). 5 ml du surnageant est ensuite rincé avec 10 ml d'eau purifiée et centrifugé (10 min à 2500 tours/min). Le culot est placé à -80°C afin d'assurer une conservation optimale de l'ADN.

Après décongélation, le produit d'extraction des fèces est mis à incuber avec 300 µl d'acide torocholique pendant 90 minutes à température ambiante dans des tubes à microbilles. A l'issue de cette première phase de lyse chimique, l'extrait est soumis à trois ribolyses successives (Ribolyser Hybaid, 30s, 6m.s⁻²).

2.3. Préparation des encéphales.

Les encéphales de renards sont broyés dans une solution tampon utilisée en routine pour la culture de cellules (Milieu Minimum Essentiel) pendant 120 secondes avec un Stomacher® (AES Labo, Combourg, France). Le broyat est ensuite centrifugé (15min, 3000 tours/min) et l'ADN est extrait à partir de 50mg du culot de centrifugation à l'aide d'un kit d'extraction sur colonnes (QIAamp® DNA Mini Kit, QIAGEN).

2.4. Extraction de l'ADN (annexe 9).

Les extraits de fèces et d'encéphales sont incubés pendant une nuit à 56°C avec 20 µl de protéinase K et 180 µl de tampon de lyse. La protéinase K est ensuite inactivée à 70°C pendant 10 minutes. L'ADN est extrait avec un kit d'extraction sur colonne (QIAamp® DNA Mini Kit-QIAGEN). Après précipitation avec 200 µl d'éthanol puis deux lavages avec 500 µL de solution tampon, il est solubilisé avec 200 µl de tampon d'élution. Les extraits ainsi obtenus sont ensuite conservés à -20°C avant d'être utilisés pour la PCR.

Pour valider ce protocole de purification de l'ADN de Neospora à partir du tissu nerveux, des encéphales de bovins infectés naturellement sont extraits en suivant la démarche décrite précédemment au cours de chaque extraction.

Les techniques d'extraction et d'amplification d'ADN ont été testées sur des oocystes de *Neospora* excrétés par le chien. La suspension d'oocystes délivrée par J.P. Dubey a été traitée selon le protocole appliqué aux fèces de renards sauvages.

2.5. Amplification et révélation de l'ADN :

Pour la recherche de *Neospora caninum* par PCR, nous avons choisi d'amplifier la séquence spécifique du génome parasite NC-5 (Kaufmann *et al.*, 1996, Yamage *et al.*, 1996) avec les amorces Np21+ et Np6+ (Lidell *et al.*, 1999). La technique d'amplification employée est celle proposée par Müller *et al.*, 1996 : 5µl d'ADN sont mélangés à 1mM de MgCl₂, à 200µM de dNTPs, à la solution de tampon PCR (10mM TrisHCl, 50mM KCl, pH=8.3) et à 2,5 unités de

Taq Polymérase (Taq Platinum, Invitrogen). L'amplification réalisée dans un thermocycleur selon les cycles décrits dans le tableau 14.

Le produit de l'amplification adjuvé d'un poids de charge est ensuite déposé sur un gel d'agarose à 2% contenant une goutte de bromure d'éthidium pour la migration (100 Volts, 15min.). A la lecture sous-ultra violet, une bande d'ADN amplifiée est recherchée à 337pb. Cette mesure est rendue possible grâce à un marqueur de poids moléculaire (Smart Lader). Pour chaque PCR, des témoins positifs (extrait d'ADN de parasite) et des témoins négatifs (eau osmosé stérile) sont amplifiés afin de s'assurer de la validité des résultats.

Tableau 14 : Paramètres utilisés pour la réalisation de l'amplification de l'ADN de *Neospora caninum*.

Etapes	Température	Temps	
Activation de la Taq	94°C	3 min	
Dénaturation	94°C	1 min	} 40 cycles
Hybridation	63°C	1 min	
Elongation	72°C	2 min	

2.6. Le séquençage.

Afin de contrôler la séquence de l'ADN amplifié, nous avons eu recours au séquençage pour le renard R35. La bande qui offre un signal sous UV (337 pb) est découpée. L'ADN est solubilisée et extrait de l'agarose avec un kit d'extraction (Kit Qiagen®). L'ADN ainsi isolée est amplifiée avec des amorces fluorescentes (Applied Biosystems). Le séquençage a été réalisé par un Laboratoire de biologie moléculaire (CHU de Caen, Calvados). La séquence d'ADN amplifié a été comparée aux séquences répertoriées dans la base de données (GenBank).

B. Résultats.

1. Caractéristiques des populations sauvages étudiées.

1.1. Origine des animaux.

Les sérums de bouquetins et de chamois ont été prélevés pour la majeure partie en Haute-Savoie, à proximité ou dans le parc naturel de la Vanoise. Parmi les prélèvements de bouquetins, 5 sont aussi issus du Parc National du Queyras (région des Alpes françaises). Sur

les 106 sérums de chevreuils, fournis par l'AFSSA de Nancy (54), 70 ont été prélevés sur le territoire français sans que l'on connaisse leur origine géographique ; les 36 autres proviennent des Deux-Sèvres, de Lozère, de Savoie, et d'Ille-et-Vilaine.

Tous les prélèvements de renards sont issus de chasses organisées en Bretagne (département d'Ille-et-Vilaine).

1.2. Le sexe des animaux.

1.4. Age des animaux (fig. 16).

Les ruminants testés ont entre 2 mois et 17 ans. Les médianes des âges sont respectivement de 4 et 5 ans pour les chamois et les bouquetins. Les moyennes des âges sont de 4 ans et 8 mois pour les chamois et 5 ans et 10 mois pour les bouquetins.

Parmi les 86 chevreuils dont l'âge est déterminé, 45 animaux (52 %) ont moins de deux ans (2 ans inclus) et 41 (48 %) ont plus de deux ans. Cette limite d'âge coïncide avec la puberté des animaux qui se déroule dans cette espèce au cours de la deuxième année de vie.

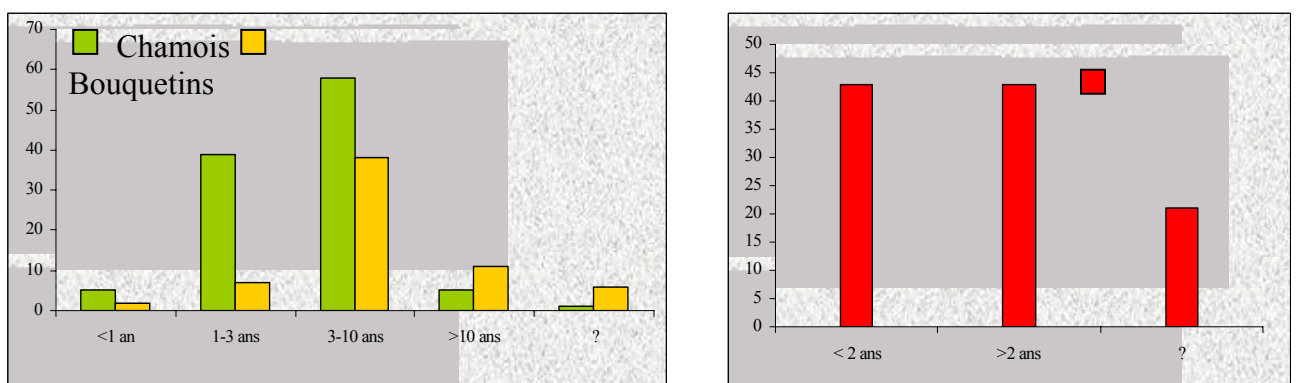


Fig. 16: Histogrammes de répartition des âges de ruminants sauvages testés pour l'étude de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum*.

2. Séroprévalence dans la faune sauvage.

Les résultats des analyses sérologiques sur les sérums de ruminants et de renards sauvages sont synthétisés dans les tableaux des annexes 14 et 15.

2.1. Ruminants sauvages.

Aucun des 272 sérums de ruminants sauvages testés n'a réagi en ELISA indirect (Kit Intervet). Les résultats obtenus en ELISA par compétition ne sont guères plus concluants puisque seulement un sérum de bouquetin et de chamois ont fourni un résultat positif.

En agglutination, des anticorps (IgG) spécifiques d'antigènes de surface de tachyzoïtes ont été retrouvés, après traitement au 2-Mercapto-éthanol à un titre supérieur ou égal au 1/40 chez 31 (29,5%) des 105 chevreuils testés. Des sérums ont réagi positivement aux dilutions 1/40 (12 chevreuils), 1/80 (8 chevreuils), 1/100 (8 chevreuils), 1/200 (2 chevreuils), 1/400 (1 chevreuil). Seuls les sérums en provenance de l'AFSSA de Nancy, d'origine inconnue, ceux prélevés en réserve de Chizé (79) et en Ille-et-Vilaine ont un titre supérieur au 40^{ème} en agglutination. Tous les chevreuils prélevés en Savoie ont des titres inférieurs à la dilution 1/40. Par ailleurs, 5 des 63 sérums (8 %) de bouquetins testés ont des titres en anticorps

supérieurs ou égal au 40^{ème} de dilution. Une agglutination a été observé au 1/100 pour un des sérums, et au 1/40 pour les quatre autres. En revanche, les 100 chamois testés ont tous des titres inférieurs à 1/20 : aucun anticorps n'a été mis en évidence dans cette espèce avec cette technique (fig.17). En considérant les échantillons représentatifs des populations de ruminants étudiés, on peut considérer que les séroprévalences sont comprises entre 20,6 % et 38,4 % ($29,5 \pm 8,9$ %) chez les chevreuils et entre 1 et 15 % ($8 \pm 7\%$) chez les bouquetins (intervalles de confiance à 95 %).

2.2. Les renards.

Parmi les 155 sérums de renards testés en ELISA, 30 (19,4 %) sont positifs avec le kit V.M.R.D., et seulement 4 (2,6 %) sont positifs avec le kit Biovet. Par ailleurs, parmi les 157 sérums de renards envoyés au laboratoire de l'Institut de puériculture pour recherche par agglutination, 32 n'ont pas pu être testés car trop hémolysés. Au total, 84 renards (67,2 % des sérums non-hémolysés) ont un titre en anticorps anti-*Neospora* inférieurs au 40^{ème}. Les renards positifs par cette technique ont des titres de 40 (14 renards), de 80 (12 renards), 100 (13 renards), 200 (1 renard) et 400 (1 renard). Ainsi, en utilisant arbitrairement un seuil de positivité de 1/40, 41 (32,8 %) renards testés possèdent des anticorps anti-*Neospora* (fig.17). A condition que l'échantillon soit représentatif de la population étudiée, on peut considérer que la prévalence de l'infection à *Neospora caninum* en Ille-et-Vilaine est comprise entre 25,3% et 40,3% ($32,8 \pm 8,4\%$) chez le renard roux (intervalle de confiance à 95 %).

Bouquetins

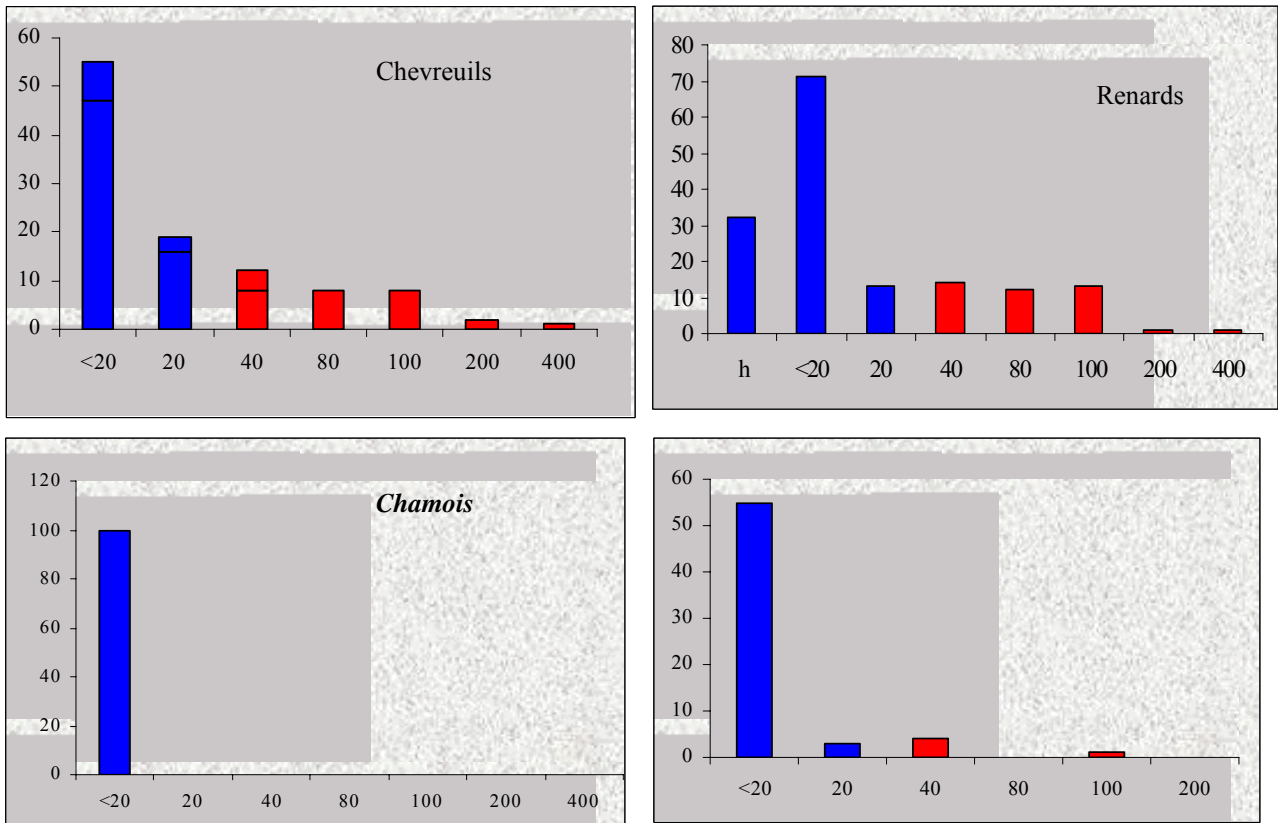


Fig. 17 :Histogramme de répartition des titres en anticorps anti-*Neospora* obtenus dans les sérums de ruminants et de renards testés en séro-agglutination.

Des anticorps à une dilution supérieure ou égale au 1/40 (en rouge) ont été détectés chez 29,4% des chevreuils et 32,8% des renards. Aucun sérum de chamois n'a agglutiné à un titre supérieur au vingtième de dilution : alors que un et quatre sérums de bouquetins ont été titrés respectivement au

2.3. Etude comparative des tests sérologiques employés dans les différentes espèces.

Les différences de séroprévalence observées sur les sérums testés par différentes techniques, nous a conduit à comparer les résultats obtenus en calculant un pourcentage de corrélation ((nombre de résultats concordants / nombre de résultat total) x 100).

Comparés à l'agglutination, les résultats des techniques ELISA indirect et compétitif concordent respectivement dans 71,1 % et 67,8 % des cas, lorsqu'elles sont appliquées aux sérums de renards sauvages (annexe 20). Dans cette espèce, une corrélation de 82,3% a été obtenue entre les deux méthodes ELISA.

Le grand nombre de ruminants négatifs avec les techniques ELISA rendent peu interprétables les pourcentages obtenus (annexe 21-26). Chez les bouquetins, un seul sérum a fourni un résultat positif en ELISA par compétition. Chez les chevreuils et les bouquetins, les résultats d'agglutination concordent respectivement dans 92,1% et 70,5% des cas avec les résultats des ELISA.

2.4. Influence de l'âge, du sexe et du moment de prélèvement.

L'âge et le sexe ne sont pas connus pour les renards. Ils sont en revanche déterminés pour une partie des ruminants sauvages.

2.4.1. Age.

Tous les chamois étant séronégatifs, l'influence de l'âge n'a pas pu être évaluée dans cette espèce. Deux bouquetins positifs en agglutination ont trois ans, les autres ont respectivement cinq, neuf et douze ans. Chez les chevreuils, 26,8% des plus de deux ans sont séropositifs contre 31,1% pour les animaux de deux ans et moins (fig. 18). Cette différence n'est pas significative ($\chi^2 = 0,23$, 1 ddl, $\alpha = 0,05$).

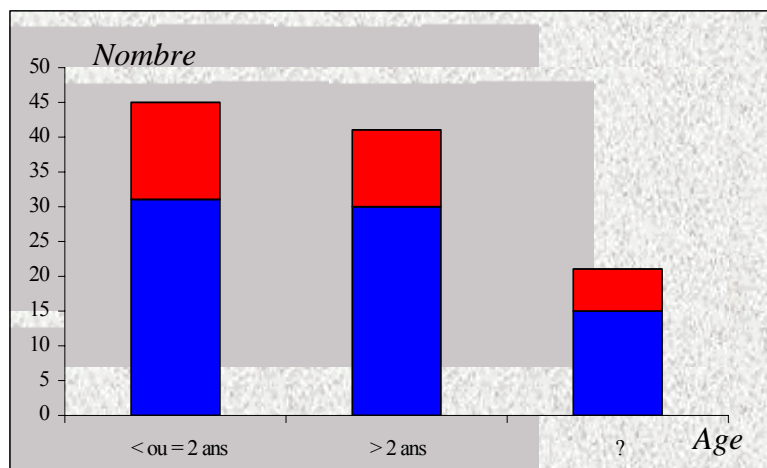


Fig. 18: Histogramme de répartition des résultats de séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* chez les chevreuils par classe d'âge.
Aucune différence statistique de séropositivité n'est observé entre les jeunes (< 2ans) et les adultes (>2ans)

2.4.2. Sexe

La part d'animaux séropositifs est équivalente pour les deux sexes chez les chevreuils, puisque ces animaux représentent 31% (14/45) des mâles et 27% (12/43) des femelles ($\chi^2 = 0,47$; 1 ddl, $\alpha = 0,05$). Chez les bouquetins, 4 des 5 animaux positifs sont des femelles.

2.4.3. Année de prélèvement.

Les sérums de bouquetins positifs ont été prélevés en 1997, 1998, 1999 et en 2000 pour deux d'entre eux. Tous les échantillons de chevreuils positifs datent de 1997 et 1999. Les prévalences pour ces années respectives sont de 54 % (12/22) et 23 % (14/60)

3. Résultats des PCR (tableau 15).

3.1. PCR sur les organes.

Pour chacune des PCR, les contrôles d'extraction (encéphales de bovins naturellement infectés) ont fourni des signaux intenses à 337pb (fig. 19-20). Tous les encéphales de fœtus de renards prélevés sur les femelles gravides sont négatifs. En revanche, parmi les 78 cerveaux de renards adultes, 1 des encéphales (R35) a fourni un signal reproductible et intense à 337 pb sur le gel d'électrophorèse (fig. 19). La bande a été découpée et envoyée au laboratoire de biologie moléculaire du CHU de Caen afin d'en déterminer la séquence. Une fluorescence de moindre intensité, à 337pb a aussi été observée pour 8 autres cerveaux (fig. 20-21). Cependant, le signal dans ces cas n'était pas systématiquement reproductible au cours de PCR successives.

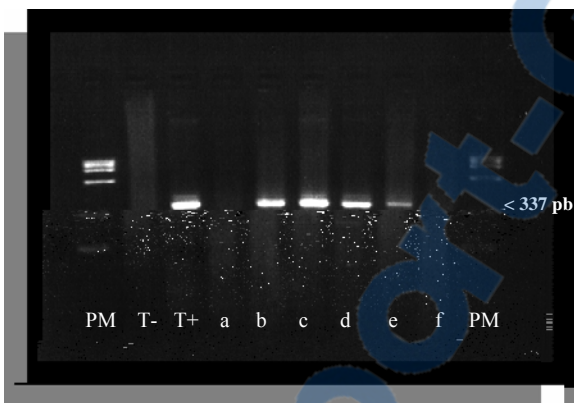
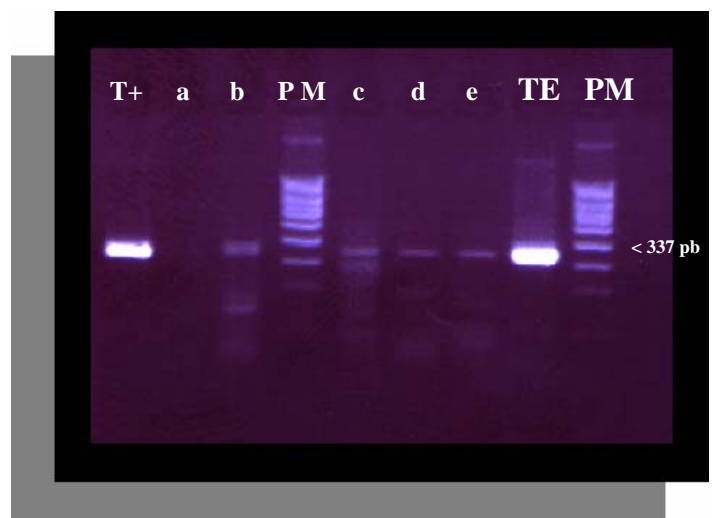


Fig. 19 : Photographie de l'électrophorèse des produits de l'amplification du gène Nc-5 de *Neospora caninum*, réalisée sur des encéphales de renards sauvages. L'encéphale du renard R35(b-f) offre un signal d'intensité comparable au témoin positif d'extraction (T+) à 337 pb.

PM : Marqueurs de poids moléculaires ; T- : Témoin négatif de PCR (eau). T+ : Témoin positif de PCR (cerveau de bovin infecté par NC). a :

Fig. 20 : Gel de migration des produits d'amplification de la séquence Nc-5 des encéphales de renards sauvages positifs au cours de PCR précédentes. Des signaux de faible intensité sont obtenus à 337 pb pour les quatre encéphales de renards sauvages (b-e). Mais, l'intensité des signaux est faible



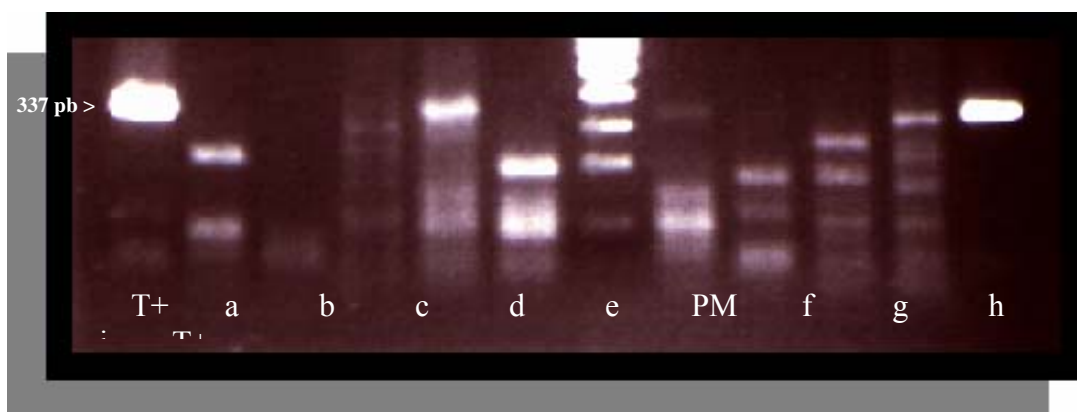


Fig. 21 : PCR réalisée sur des encéphales de renards sauvages. Trois extraits (d, f, i) ont fourni des signaux faibles et d'intensité variable à 337pb. La taille de la bande est déterminée par l'échelle de poids moléculaire (PM) et les témoins positifs (T+).

Tableau 15 : Résultats des amplifications spécifiques de l'ADN de *Neospora caninum* réalisées sur les matières fécales, les utérus gravides et les cerveaux de renards

Origine des prélèvements	Support de la PCR	Nombre de prélèvements	Résultats	
			Nombre de positifs	Prévalence estimée
AFSSA	<i>Cerveaux</i>	60	8	13 ± 9 %

Ile-et-Vilaine	<i>Cerveaux</i>	18	1	(6 %)
	<i>Encéphales de fœtus</i>	17	0	0 %
	<i>Matières fécales</i>	52	8	15 ± 10%

3.2. PCR sur les fèces.

La technique d'extraction utilisée pour les fèces de renards sauvages a été testée sur des oocystes de *Neospora caninum* excrétés par un chien. L'extraction de l'ADN à partir de la suspension d'oocystes lysés a fourni, après l'amplification de la séquence Nc-5 spécifique de *Neospora caninum*, des signaux intenses à 337pb (fig. 22).

Pour 44 des 52 extraits testés provenant de renards sauvages, aucune bande de 337pb n'a été observée à l'issue de la migration. Huit autres des prélèvements (17 %) ont fourni des signaux faibles comparés aux témoins d'extraction et inconstants sur des PCR successives (tableau 15).

Pour tenter d'expliquer la faiblesse des signaux, une PCR a été réalisée sur cinq extraits douteux à différentes concentrations (1/10, 1X, 2X). Elle a montré que pour deux d'entre eux

(R2 et 555F) le signal était plus important aux fortes concentrations et disparaissait pour les extraits dilués. Pour un des renards (R21), aucune bande n'était visible aux concentrations 1/10 et 2X alors qu'un signal a pu être observé pour l'extrait à la concentration 1X.



Fig. 22 : Gel de migration des produits d'amplification de la séquence Nc-5 avec les amorces Np21 et Np6 sur des extraits de fèces de renards . La solution d'oocystes de *N.caninum*, offre des signaux de forte intensité à 337pb (a et j). Quatre signaux au même poids moléculaire sont observés sur les extraits de matières fécales de renards sauvages (c f h et o). Ces signaux sont de

4. Résultats du séquençage.

L'ADN de la séquence NC-5 de l'encéphale du renard R35, extrait du gel d'agarose (337pb) a été amplifié puis soumis au séquençage. Sa séquence (fig. 23) comparée à celles de la banque de données informatiques (BLAST) a révélé 90% de similitude avec une souche autrichienne de *Neospora caninum* (numéro d'accès à la GenBank – AF190 701) décrite par Edelhofer *et al.*, (1999).

```

Query: 21  cttgctccctatgcataatctcccccgatcatcagtgccgccggtgttgctcaacacaga 80
          |||
Sbjct: 261  cttgctccctatgcataatctcccccgatcatcagtgccgccggtgttgctcaacacaga 202

Query: 81  acaactgaactctggataagtatcattgacacactgtccacaccctgacgcaggctgatt 140
          |||
Sbjct: 201  acaactgaactctggataagtatcattgacacactgtccacaccctgacgcaggctgatt 142

Query: 141 caactgacgaatgactaaccacaaaccagtatcccacctttcaccgttaccantctct 200
          |||
Sbjct: 141 caactgacgaatgactaaccacaaaccagtatcccacctctcaccgttaccantctct 82

Query: 201 tgggttna-ccggtnacnnccttngccacnaachnaanaaggngccttgctgacgnaggn 259
          |||
Sbjct: 81  tgggttaccctgttcacacactatagccacaaacaaaaggagccttgctgacgcagggc 22

Query: 260 tgcggnaacnacnacnccgctc 280
          |||
Sbjct: 21  tgcggcccaacaacgacacgctc 1

```

Fig. 23 : Séquence de l'ADN de *Neospora caninum* amplifiée à partir d'un extrait d'encéphale de renard sauvage. Après extraction du gel et amplification, l'ADN extrait de l'encéphale du renard sauvage (R35) a été séquençé. Sur les 280 pb soumises au séquençage, 260 ont pu être déterminées et 235 sont communes

5. Résultats de l'observation microscopique.

Les extraits de flottation de selles de renards, offrant un signal en PCR ont été observés entre lame et lamelles au microscope (objectif X10 et X40). Aucun ookyste semblable à *Neospora* n'a pu être identifié. En outre, l'observation de l'extrait de fèces de chien infecté expérimentalement (J.P. Dubey) et utilisé comme contrôle d'extraction a permis d'observer des oocystes ressemblant à ceux de *Neospora*.

C. Discussion.

1. A propos des techniques utilisées.

1.1. Comparaison des techniques sérologiques.

Les techniques sérologiques utilisées dans notre étude ont été validées pour les espèces domestiques (Romand *et al.*, 1998 ; Baszler *et al.*, 1996 ; Baszler *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2002). La séroagglutination a déjà été employée pour rechercher des anticorps sur des espèces sauvages de ruminants (Dubey *et al.*, 1999b ; Ferroglio *et al.*, 2001 ; Lindsay *et al.*, 2002) et de canidés (Lindsay *et al.*, 2001). Au contraire, peu de données sont à l'heure actuelle disponibles sur l'application des techniques ELISA aux espèces sauvages. Les résultats obtenus sur les sérums de chamois, de bouquetins, de chevreuils et de renards par ELISA indirect (kits BIOVET et INTERVET), ELISA par compétition (kit VMRD) et la séro-agglutination sont différents selon les techniques. La quasi-totalité des sérums de ruminants sauvages testés sont négatifs avec les deux techniques ELISA. Par ailleurs, 31 des 105 sérums (29,2 %) de chevreuils ont un titre supérieur au 1/40 en agglutination, alors qu'aucun anticorps anti-*Neospora* n'a été détecté avec les techniques ELISA. Diverses hypothèses peuvent être formulées pour expliquer la faible sensibilité des kits ELISA :

- Le conjugué :

Nous avons utilisé, dans l'étude, des tests conçus pour détecter des anticorps chez les bovins et le chien. Les conjugués utilisés dans les kits ELISA indirect sont spécifiques des espèces testées (Björkman et Ugglå, 1999) et ne sont pas forcément en mesure de reconnaître les anticorps des ruminants et renards sauvages. En revanche, aucune barrière d'espèce n'interdit a priori l'utilisation de l'ELISA par compétition (Björkman et Ugglå, 1999) et de la séroagglutination (Romand *et al.*, 1998). L'inadéquation des conjugués avec les anticorps des chamois, bouquetins, chevreuils et renards pourrait expliquer la faible sensibilité de l'ELISA indirect pour ces espèces, mais cela n'est pas en accord avec l'absence d'anticorps spécifiques dans les sérums testés par ELISA par compétition qui s'affranchit du conjugué spécifique.

- La préparation antigénique :

Les différences entre les tests peuvent aussi provenir des préparations antigéniques utilisées dans les kits. En agglutination, des tachyzoïtes entiers sont exposés aux anticorps ; ce test recherche donc des antigènes de surface. Le kit « Biovet », quant à lui utilise des tachyzoïtes soniqués, exposant ainsi des antigènes internes. Enfin, une protéine recombinante est utilisée dans le kit « Intervet ».

- Temps d'incubations et seuil de positivité :

Les protocoles des kits ELISA, calibrés pour les espèces domestiques ne sont pas forcément adaptés aux autres espèces. En effet, le temps d'action des conjugués, déterminé par les délais d'incubation, dépend de l'espèce cible (Hemphill *et al.*, 2000). D'autre part, les seuils de positivité définis chez les bovins, ovins, caprins et chiens n'ont pas été étalonnés pour les espèces sauvages. Ainsi, les seuils de positivité proposés par les fabricants ont été utilisés arbitrairement dans notre travail, sans que l'on sache si ces valeurs sont effectivement valables pour les animaux de l'étude.

De ce fait, nous avons privilégié les résultats obtenus par la séroagglutination puisqu'elle est utilisable sans adaptation particulière chez différentes espèces (Romand *et al.*, 1998 ; Dubey *et al.*, 1999b). La technique est performante puisque Packham *et al.*, (1998) ont rapporté une sensibilité et une spécificité respective de 98% et 99% comparée à l'IFAT. Bien qu'elle soit applicable à différentes espèces, aucune donnée n'est à l'heure actuelle disponible sur les cut-off de ce test appliqués aux espèces de l'étude. Chez les bovins, un titre supérieur ou égale au 1/100 plaide en faveur d'une exposition à *Neospora caninum*. Pour les sérums de ruminants et de renards sauvages, nous avons considéré que le test était suffisamment spécifique pour un

titre supérieur ou égal au 1/40 (Romand *et al.*, 1998). Cette valeur seuil est supérieure à celle de 1/25 proposée pour suggérer l'exposition à *Neospora caninum* chez le cerf à queue blanche (Dubey *et al.*, 1999b) et le renard gris (Lindsay *et al.*, 2001).

La technique d'agglutination utilisée pour la recherche d'anticorps anti-*Neospora* ne détecte que les immunoglobulines de type G ; elle ne permet pas de détecter les anticorps en début d'infection, représentés par des immunoglobulines de type M.

1.2. A propos de la technique d'amplification génique.

Nous avons suivi le protocole décrit par Kaufmann *et al.*, (1996) et Yamage *et al.*, (1996) pour la recherche de parasite dans les fèces et tissus d'animaux. L'efficacité de la technique est manifeste puisque la séquence amplifiée est fortement répétée dans le génome de *Neospora* et n'a pas été retrouvée dans d'autres taxons (Kaufmann *et al.*, 1996 ; Yamage *et al.*, 1996). Ce test est en effet sensible puisqu'il permet de détecter entre 1 et 10 tachyzoïtes dans 150µl de broyat de cerveaux (données du laboratoire non publiées). La technique d'amplification est aussi très spécifique, puisqu'elle ne détecte que l'ADN de *Neospora caninum* (Yamage *et al.*, 1996 ; Hill *et al.*, 2001).

Nous avons pu mettre en évidence un signal intense et reproductible au cours de différentes PCR réalisées sur l'encéphale d'un renard (R35). Une forte homologie a en outre été observée entre la séquence de l'ADN extrait de l'encéphale de ce renard et celle d'une souche autrichienne de *Neospora caninum* lorsqu'elle a été comparée à la banque de donnée informatique (BLAST). Ce fort degrés de similitude entre les deux séquences est un argument en faveur de la spécificité de l'amplification par cette technique. Dix sept autres renards ont fourni des signaux de faibles intensités et inconstants sur des PCR successives. Une faible fluorescence a aussi été observée à 337pb pour 16,7 % des extraits de fèces.

Les résultats des PCR sur les encéphales sont comparables à ceux obtenus par Almeria *et al.*, (2002). Dans cette étude portant sur 122 encéphales de renards, 13 (10,7%) étaient positifs sur certaines des quatre amplifications réalisées. Les signaux étaient de faible intensité et inconstants pour 12 des prélèvements ; un seul renard mâle âgé de trois mois a fourni un signal intense et reproductible.

Ce phénomène est vraisemblablement consécutif à une faible concentration en ADN dans les extraits. Cette hypothèse est renforcée par les résultats obtenus lors de l'amplification des

séquences à différentes concentrations réalisée sur quelques extraits. Pour les renards R2 et 555F nous avons pu obtenir des signaux plus marqués pour des extraits concentrés.

Divers hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette faible concentration en ADN :

- Le rendement d'extraction du kit QIAGEN® :

La technique d'extraction employée a été validée au cours des essais sur des encéphales de bovins naturellement infestés et des oocystes de chien, utilisés comme témoins positifs.

D'autre part, l'ADN extrait à partir d'un des encéphales de renard sauvage avec ce kit a fourni un signal intense. Nous n'avons pas calculé le rendement d'extraction de ce kit, mais ces résultats montrent que cette technique est suffisamment efficace

-L'intervention de DNAses :

La présence de DNAses dans certains prélèvements, en particulier dans les fèces, pourrait aussi être à l'origine d'une altération des acides nucléiques et d'une diminution de la concentration en séquences amplifiables. L'intervention de ces molécules est difficile à mettre en évidence. L'utilisation d'amorces universelles, capables de détecter la présence d'ADN de bactéries saprophytes du tube digestif, dans les fèces est un moyen de contrôle envisageable ; mais cette méthode n'a aucune valeur quantitative dans le temps. L'intervention des DNAses ne pourrait pas être démontrée si la quantité initiale d'ADN recherchée est plus faible que la quantité d'ADN bactérien.

-L'intervention d'inhibiteurs de PCR :

Certaines molécules sont capables d'entraver le bon déroulement de l'amplification. Ainsi, des substances organiques contenues dans les fèces et purifiées avec l'ADN pourraient être à l'origine de l'inhibition de la PCR (Da Silva *et al.*, 1999). L'implication de phénomènes d'inhibition de la PCR a été suspectée, pour le renard R21 pour lequel l'augmentation de la concentration d'ADN s'est traduit par une disparition du signal. Pour détecter ces renards faussement négatifs, il aurait été intéressant d'utiliser un compétiteur de la séquence Nc-5 spécifique de *Neospora caninum* (Liddell *et al.*, 1999b ; Hill *et al.*, 2001).

-Une faible densité parasitaire dans les prélèvements :

Une faible densité parasitaire dans les prélèvements peut expliquer la faiblesse des signaux observés. Une analyse histologique des encéphales aurait été intéressante pour évaluer l'infection. Mais, les échantillons conservés à -80°C pour éviter l'altération de l'ADN n'ont pu être soumis à cet examen du fait de la lyse des cellules induite par une telle température. L'examen microscopique des selles a été réalisé, mais il n'a pas permis d'observer d'oocystes

semblables à ceux de *Neospora*. Ceux-ci en raison du délai des analyses auraient pu souffrir de la durée de stockage.

La méthode PCR est un outil très efficace pour la détection du parasite (Yamaga *et al.*, 1996 ; Hill *et al.*, 2001), mais elle ne permet pas de caractériser la forme parasitaire détectés, la vitalité et leur pouvoir infectieux du parasite . Les signaux de PCR obtenus à partir des extraits de matières fécales pourraient être le fruit d'une excrétion de parasite sous une autre forme que l'oocyste : schizontes ou gamontes, forme quiescente de *Neospora* dans des cellules intestinales desquamantes, ADN de parasite contenu dans des tissus carnés, ingéré, puis véhiculé dans les matières fécales du renard. Le recours à l'infection expérimentale aurait pu parer cette limite de la technique PCR.

2. Les ruminants sauvages comme réservoir de *Neospora caninum*.

Au cours de l'étude présentée, nous avons montré que 31 des 105 des sérums de chevreuils testés ont des anticorps spécifiques de *Neospora* sp. à une dilution sérique supérieure ou égale au 1/40 en agglutination. Les chevreuils positifs avec cette technique proviennent pour l'essentiel de l'AFSSA de Nancy (19/70), de l'Ille-et-Vilaine (5/17) et des Deux-Sèvres (6/10). La séroprévalence observée chez les 17 chevreuils d'Ille-et-Vilaine testés pourrait être le fruit d'une forte prévalence du parasite dans ce département, où près de 50% des vaches ayant avorté sont séropositives en agglutination (Payot, thèse Alfort 2002).

Les modalités de contamination des chevreuils dans les conditions naturelles ne sont pas connues. La transmission verticale est le mode de contamination majeur dans l'espèce bovine. L'infection congénitale a aussi été décrite chez les cervidés (Dubey et Lindsay, 1996). Dans notre étude, l'absence d'association statistique entre la séroprévalence et l'âge ou le sexe des chevreuils suggère que le parasite puisse aussi être transmis *in utero* dans cette espèce (Dubey *et al.*, 1999b).

L'ingestion d'oocystes excrétés dans le milieu extérieur par un hôte définitif est un autre mode de contamination envisageable, cependant aucune étude n'a encore évalué la réceptivité des chevreuils aux oocystes de *Neospora caninum*.

La séroprévalence observée dans les populations de bouquetins (comprise entre 1% et 15%) est inférieure à celle observée dans les populations de chevreuils (comprise entre 20,6% et 38,4%) ; par ailleurs, aucun anticorps n'a été retrouvé chez les chamois par séroagglutination. Ces données suggère que le parasite est moins fréquents dans les hardes de ruminants sauvages vivant dans les Alpes françaises. Peu de données de séroprévalence dans cette

région sont actuellement disponibles. Pourtant, le parasite est présent dans les effectifs bovins des Hautes-Alpes, puisque 24 % des vaches ayant avorté ont des anticorps contre *Neospora caninum* en agglutination (Payot, Thèse Alfort 2002).

Les résultats de séroprévalence chez les chevreuils sont semblables de ceux de l'étude réalisée dans les Alpes italiennes (Ferroglio et Rossi, 2001). Dans ce travail 16 des 43 chevreuils testés sont positifs en agglutination (kit Vetoquinol) à une dilution supérieure au 1/40. A condition que l'échantillon soit représentatif, on peut estimer que la séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* dans la population de chevreuil de cette étude est comprise entre 22 et 52 % ($37 \pm 15\%$). Ces résultats sont proches de ceux que nous avons obtenu dans notre étude puisque la séroprévalence que nous avons estimé dans les populations de chevreuil françaises est comprise entre 20,6 et 38,4 %.

En revanche, la prévalence de l'infection chez les ruminants sauvages provenant des Alpes françaises apparaît inférieure à celle évaluée dans les Alpes italiennes. Ferroglio et Rossi (2001) ont détecté des anticorps anti-*Neospora* par une méthode de séroagglutination sur 29,4% des sérums de chamois, 12,7% des sérums de cerfs élaphe, et 37% des sérums de chevreuils, tous prélevés en Italie. Dans notre étude, aucun anticorps spécifique de *Neospora caninum* n'a été détecté en agglutination chez les chamois et les chevreuils de Savoie et nous avons montré que la prévalence de l'infection chez les bouquetins est comprise entre 1 et 15%. Cette moindre séroprévalence peut être le fruit des méthodes d'agglutination utilisées, qui ne sont pas les mêmes (Institut de Puériculture dans le premier cas, kit Vetoquinol dans le second cas) mais aussi d'une moindre prévalence de *Neospora caninum* dans les sites de prélèvement des Alpes françaises. On ne sait pas si le loup est capable d'excréter des oocystes de *Neospora caninum* au même titre que le chien, mais une plus forte densité de ce canidé sauvage en Italie pourrait expliquer la différence d'exposition des ruminants sauvages à *Neospora* dans ces deux régions.

3. Le rôle du renard dans le cycle de *Neospora caninum*.

3.1. Un rôle d'hôte intermédiaire confirmé.

Bjerkas *et al.* (1984) avait montré que le renard bleu (*Alopex lagopus*) était réceptif dans les conditions expérimentales à l'inoculation de tachyzoïtes de *N. caninum* (Dubey et Lindsay, 1996). Des anticorps ont aussi été retrouvés dans différentes espèces de canidés sauvages (Lindsay *et al.*, 1996b ; Buxton *et al.*, 1997a) : coyote, renard gris, renard roux. Nous avons donc, au cours de cette étude, tenté de savoir si le renard roux (*Vulpes vulpes*) peut dans les conditions naturelles, héberger *Neospora caninum*. Nous avons ainsi mis en évidence, pour la

première fois en France, l'ADN du parasite dans l'encéphale de renards sauvages, et donc confirmé que le renard est un hôte intermédiaire pour *Neospora caninum*. La présence d'ADN parasitaire dans le tissu nerveux a déjà été décrite chez le renard roux en Espagne (Almeria *et al.*, 2002). Dans cette étude, 13 des 122 encéphales testés étaient positifs en PCR. Cette valeur est proche de celle que nous avons obtenue. En effet, 9 des 78 animaux ont fourni un signal à 337pb, dont un présente une forte intensité. Les deux prévalences estimées à partir de ces résultats ($10,7 \pm 5,6$ % dans le premier cas et $11,5 \pm 7,2$ %) ne sont pas significativement différentes. Ces valeurs sont en revanche inférieures à celle obtenue à l'issue de notre étude de séroprévalence menée en France et portant sur 157 renards roux. Cette constatation pourrait révéler un contact passé avec le *N. caninum*, en l'absence d'infection par ce parasite. La prévalence de l'infection a été estimée à $32,8 \pm 8,4$ % par la recherche d'anticorps anti-*Neospora* en agglutination. Cette estimation est supérieure à celles observées jusqu'à maintenant en Europe. En Belgique, Buxton *et al.*, (1997a) ont trouvé que 21 des 123 renards testés avaient des anticorps (titre >1/64 en IFI) spécifiques de *Neospora*. A la lumière de ce résultat, la séroprévalence de l'infection dans la population de renards testés en Belgique peut être estimée à $17 \pm 6,8$ % (intervalle de confiance à 95 %). Les études réalisées, au Royaume-Uni et en Irlande, sur des échantillons de plus faible taille ont révélé une séroprévalence comprise entre 1,4% et 6%, avec la même technique. Les écarts de séroprévalence observés entre les pays européens peuvent être le fruit d'une différence de prévalence de l'infection à *Neospora caninum*. Les divergences peuvent aussi provenir des tests sérologiques qui ne sont pas les mêmes (séroagglutination dans notre étude et IFI dans les autres cas).

Bien qu'aucun seuil de positivité en agglutination n'ait été établi dans l'espèce vulpine, on peut considérer qu'environ un tiers des renards d'Ille-et-Vilaine testés ont été exposés à *Neospora caninum*. Dans ce département, le parasite est largement représenté dans l'espèce bovine puisque la moitié des vaches qui avortent sont séropositives en agglutination (Payot, thèse Alfort 2001). Nous ne pouvons pas établir de liens de cause à effet entre la séroprévalence observée chez le renard roux et la forte prévalence de l'infection des bovins par *Neospora caninum*. Les sérums de renards utilisés dans notre étude ont été prélevés sur des animaux tués à proximité des fermes. A l'image de ce qui est observé chez le chien, les renards ayant des anticorps anti-*Neospora*, en tant qu'hôte intermédiaire, auraient pu se contaminer en ingérant du placenta, des fluides fœtaux ou des avortons bovins infectés par le parasite (Bergeron *et al.*, 2000 ; Dijkstra *et al.*, 2001).

Nous avons montré que les chevreuils étaient des hôtes intermédiaires pour le parasite. Bien que la transmission congénitale n'ait pas été établie dans cette espèce, les produits de la mise

bas ou de l'avortement (placenta ou avortons) est aussi une source potentielle de contamination pour les renards. D'autres voies de contamination ont été proposées sans avoir été démontrées en particulier par la consommation d'oiseaux ou de petits mammifères sauvages (Ould-Amrouch *et al.*, 1999). Les connaissances actuelles sur la réceptivité des oiseaux pour *Neospora* sont encore insuffisantes mais des pigeons domestiques ont pu être infectés expérimentalement (Mc Guire *et al.*, 1999). Une étude récente a mis en évidence la présence d'anticorps anti-*Neospora* chez le lièvre (*Lepus europaeus*) qui est une proie du renard et qui représente ainsi une source potentielle d'exposition à *Neospora* (Ezio et Anna, 2003).

Neospora caninum peut aussi être transmis congénitalement chez l'hôte intermédiaire (transmission verticale). Au même titre que pour le chien, ce mode de contamination a été démontré chez le renard (*Vulpes vulpes*). En effet, des cas de conversion sérologique persistante (anticorps détectables au-delà de 44 jours après la mise bas) ont été observées chez des renardeaux nés de mères infectées expérimentalement. La persistance d'anticorps anti-*Neospora* chez ces jeunes renards s'explique par une transmission verticale (Schaes *et al.*, 2001a), congénitale ou post-natale (ingestion de lait maternel infecté). Bien que la sensibilité des jeunes renards infectés congénitalement ne soit pas connue, *Neospora* pourrait être responsable de morbidité et de mortalité néonatale dans cette espèce. Les jeunes malades seraient alors des sources potentielles de parasite pour les congénères cannibales.

3.2. Un rôle d'hôte définitif encore hypothétique.

Outre son rôle d'hôte intermédiaire, plusieurs publications ont soulevé l'hypothèse selon laquelle le renard pourrait être un hôte définitif pour *Neospora caninum* (Lindsay *et al.*, 2001 ; Dubey, 1999b ; Barling *et al.*, 2000 ; Barling *et al.*, 2001 ; Ould-Amrouch *et al.*, 1999). La présence de carnivores sauvages est un facteur de risque associé à une plus forte séroprévalence dans les troupeaux de bovins (Barling *et al.*, 2000). En effet, le renard est réceptif au parasite et nous avons montré qu'une forte proportion des renards prélevés en Bretagne était exposée à *Neospora caninum*. Il pourrait à ce titre être à l'origine de la contamination orale de bovins par les oocystes qu'il excrèterait dans le milieu extérieur (Barling *et al.*, 2001). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons recherché la trace de ce parasite dans les fèces de renards sauvages capturés en Ille-et-Vilaine.

A l'issue de l'amplification de la séquence Nc5 à partir d'extraits de flottation, 16,7 % des prélèvements de fèces de renards ont fourni des signaux de faible intensité à 337pb. Le séquençage des amplicons a par ailleurs permis d'identifier *Neospora caninum*. Cependant, aucun oocyste n'a été observé par l'examen de ces extraits en microscopie optique. Du fait de

la faiblesse des signaux PCR observés, de leur inconstance, ces résultats doivent être interprétés avec précaution ; d'autant plus que l'excrétion d'oocystes de *Neospora* n'a pas été obtenue après l'infection expérimentale de renards (Schaes *et al.*, 2002).

Peu de données sont actuellement disponibles sur la résistance des oocystes (Dubey, 1999b). Nous ne pouvons exclure leur altération dans les matières fécales des renards de l'étude du fait du délai entre la récolte et le traitement des prélèvements. En effet, ceux-ci ont été conservés à 4°C pendant plusieurs mois ; de telles conditions de stockage pourraient être à l'origine d'une lyse des oocystes et d'une diminution de leur concentration dans les matières fécales.

Les oocystes pourraient aussi être produits en faible quantité chez le renard, comme cela a été décrit chez le chien (Basso *et al.*, 2001). L'excrétion a été principalement observée chez des animaux immunodéprimés (Lindsay *et al.*, 1999a) ou jeunes (McAllister *et al.*, 1998 ; Basso *et al.*, 2001), dont on sait qu'ils sont sensibles à la multiplication des autres espèces de coccidies dans le tractus digestif. Nous n'avons pas pu obtenir les données biologiques (âge, statut sanitaire) des animaux testés. Il pourrait dès lors s'agir d'animaux adultes et sains moins réceptifs à l'infection digestive du parasite. *Neospora caninum* serait dans ces conditions un parasite qui profiterait d'un terrain favorable à sa multiplication pour assurer la phase de reproduction sexuée chez le renard.

Il semblerait que la réponse immunitaire de l'hôte définitif puisse gêner la multiplication de *Neospora* dans le tube digestif, puisque l'excrétion d'oocystes dans les matières fécales n'a été observée que pour des animaux séronégatifs (Hemphill *et al.*, 2000). Le statut sérologique est connu pour sept des renards ayant fourni un signal à l'issue de la PCR. Trois animaux ont un titre en immunoglobulines (IgG) spécifiques de *Neospora* inférieur au 1/20, les quatre autres ont un titre de 1/40 (deux renards) et de 1/80 (deux renards). Chez le chien, la plupart des animaux excréteurs sont séronégatifs (McAllister *et al.*, 1998b ; Lindsay *et al.*, 1999a ; Schaes *et al.*, 2001b), mais des cas de conversion sérologique tardive sont observés chez des chiens qui excrètent des oocystes. On ne sait pas si au cours de sa phase de reproduction sexuée, *Neospora caninum* peut franchir la barrière digestive pour s'enkyster dans le tissu nerveux, comme cela est décrit pour le chat infecté par le toxoplasme. On suppose que l'infection par *Neospora caninum* au cours de sa phase de reproduction (schizogonie et gamogonie) chez l'hôte définitif se limite au tractus digestif, et que la conversion sérologique chez le chien excréteur de oocystes de *Neospora* est due à une infection par ses propres oocystes qu'il produit dans ses matières fécales (Schaes *et al.*, 2001b). Un phénomène similaire pourrait être observé pour le renard et expliquerait les signaux de PCR observés sur

les quatre renards séropositifs (titre en anticorps anti-*Neospora* supérieur ou égal au 1/40). On

Toxoplasma

Neospo caninumra

en Bretagne. Bien que la transmission verticale du parasite ait été mise en évidence dans cette espèce, le renard pourrait se contaminer au même titre que le chien en ingérant des produits carnés d'hôtes intermédiaires infectés. Les produits d'avortement ou de mise bas d'origine bovine sont des sources potentielles de parasite pour ce carnivore. Il pourrait aussi s'infecter au contact de ruminants sauvages qui sont des hôtes intermédiaires pour *Neospora caninum*. En effet, nous avons montré qu'ils sont aussi exposés au parasite puisque 31 des 105 chevreuils et 5 des 63 bouquetins testés ont des anticorps anti-*Neospora* à un titre supérieur ou égal au 1/40. La prévalence de l'infection par *Neospora caninum* chez le chevreuil ($29,5 \pm 8,9 \%$) et le renard ($32,8 \pm 8,4 \%$) est particulièrement importante en Ille-et-Vilaine, au même titre qu'elle l'est dans les élevages bovins de ce département. Cette zone géographique apparaît être un terrain d'étude intéressant pour préciser la biologie de *Neospora caninum*. Des études de prévalence à plus large échelle sur les espèces sauvages dans cette région pourraient apporter des informations supplémentaires utiles à la connaissance de l'épidémiologie de la néosporose.

Récemment, le renard roux s'est révélé être un hôte intermédiaire pour *Neospora caninum*. Nous avons confirmé ce rôle en révélant la présence d'ADN par amplification génique de la séquence Nc5 dans l'encéphale de 9 des 78 de renards sauvages testés. En plus de son rôle d'hôte intermédiaire, le renard pourrait au même titre que le chien être un hôte définitif. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons testé 52 fèces, parmi lesquels 8 ont fourni des signaux de faible intensité à l'issue de la PCR décrite par Hill *et al.*, (2001). Alors qu'aucun oocyste semblable à ceux de *Neospora* n'a été observé, la présence d'ADN dans les matières fécales de certains renards est un argument en faveur d'une infection digestive des animaux. Mais, la technique PCR, utilisée pour sa forte sensibilité ne permet pas de préciser la quantité de parasite, son infectuosité pour les hôtes intermédiaires et la forme sous laquelle l'ADN est véhiculée dans les matières fécales. Des études complémentaires sont nécessaires pour compléter les résultats obtenus dans ce travail. Même si le renard et les ruminants sauvages sont des sources potentielles de parasite, leur impact dans le cycle de *Neospora caninum* n'est pas précisément connu. *Neospora caninum* est un parasite cosmopolite qui peut infecter de nombreux mammifères. D'autres espèces sauvages pourraient ainsi jouer un rôle dans un cycle sylvestre. La réceptivité pour *Neospora caninum* chez le loup, le chacal, et le dingo n'a pas été étudiée ; pourtant ces canidés sauvages pourraient être des hôtes intermédiaires et définitifs au même titre que l'est le chien.

Alors que le cycle de *Neospora caninum* est en partie connu, celui de *Neospora hughesi*, espèce décrite chez le cheval ne l'est pas. On ne sait pas si ce parasite est capable d'infecter

d'autres mammifères, au même titre que *Neospora caninum*; et aucun hôte définitif ne lui est connu à l'heure actuelle. Par ailleurs, on ne sait pas dans quelle mesure les tests sérologiques sont capables de distinguer l'infection par *Neospora caninum* et *Neospora hughesi*. Le rôle de la faune sauvage dans le cycle de cette autre espèce parasitaire n'est pas déterminé. Enfin, la diversité des hôtes intermédiaire (y compris les primates simiens) suggère l'existence d'un éventuel danger pour l'homme (Barr et al., 1996b). L'exposition humaine a été rapportée au cours d'une étude de séroprévalence (Tranas et al., 1999). Mais aucun cas de néosporose humaine n'a été décrit jusqu'à maintenant.

ANNEXES

Annexe 1: Impact de la néosporose bovine dans différents pays hormis l'Europe.

PAYS	ETUDES
USA	<p>-La néosporose serait responsable d'environ 20% des avortements en élevage laitier de Californie (Anderson et al. 1991)</p> <p>-En Californie, 78 à 88% des veaux nés de mères séropositifs sont congénitalement infectés (Paré et al.1996).</p> <p>-Dans l'ouest des Etats-Unis, sur 2585 bovins (55 troupeaux) 24% sont séropositifs en ELISA compétitive. La proportion de séropositifs dans chaque troupeau est comprise entre 3 et 67% (médiane de 19%). (Sanderson et al. 2000)</p>
Costa-Rica	-8,6% des 570 vaches étudiées ont avorté de néosporose (ELISA et IHC). (Perez et al. 1998)
Mexique	- 59 % des 187 sérums issus de 13 élevages laitiers sont positifs. (Garcia Vasquez, et al. 2002)
Brésil	-Séroprévalence de 14,09% (63/447 bovins) à Bahia par IFAT (Gondim et al. 1999)
Nouvelle-Zélande	<p>-Une étude portant sur 320 avortons (Thornton et al. 1991) :</p> <p>-Les avortements à Neospora concernent 7% des gestations.</p> <p>-Dans un élevage, 17 à 30% des avortements sont dus à Neospora.</p> <p>-La néosporose pourrait expliquer jusqu'à 40% des avortements soumis au diagnostic de laboratoire.(Reichel et Drake 1996)</p>
Australie	La séroprévalence évaluée sur 226 animaux est comprise entre 24% et 31% selon les techniques sérologiques employées (Atkinson et al., 2000).
Russie	-39 (9,97%) sérums positifs sur 391 bovins issus de 8 fermes autour de Moscou. (Hemphill et al. 2000)
Thaïland	-6% des 904 sérums de bovin sont positifs en IFAT (Pongsatorn et al. 1999)
Taiwan	-44.9% des 613 bovins (25 troupeaux) testés en IFAT sont séropositifs (Hong-Kean Ooi et al. 2000)
Corée	-4,1% des 438 sérums de bovins natifs du pays sont positifs en IFAT (Kim et al. 2002)
Japon	-Incidence évaluée pour la néosporose=2% (Ogino et al. 1992)
Zimbabwe	-Neospora caninum serait une cause significative d'avortements (Jardine et Last, 1993 ; Jardine et Wells 1995)

Annexe 2 : Impact de la néosporose bovine dans différents pays européens.

PAYS	ETUDES
France	<p>- Enquête sérologique sur 1022 bovins dans l'ouest de la France : 15 à 45% de séropositifs selon le passé pathologique. (Pitel et al., 2001a.)</p> <p>- Enquête sérologique sur des vaches ayant avorté entre mars et août 1996 : 25,7% (dans l'Orne) et 13,7% (en Soane-et-Loire) sont séropositives (Ould-Amrouche et al., 1999).</p>
Royaume-Uni	<p>- 12,5% des avortements au Royaume-Uni sont attribuables à <i>Neospora caninum</i> (Davison et al., 1999)</p> <p>- Une enquête sérologique en Ecosse révèle que la néosporose représente environ 8% des avortements (Trees et al. 1994)</p> <p>- En Ecosse, 15,9% des 547 fœtus avortés étaient séropositifs pour <i>Neospora caninum</i> (Buxton et al., 1997).</p> <p>- En Angleterre, 4,2% des 190 fœtus étudiés sont positifs en immunohistochimie. (Hemphill et al., 2000)</p> <p>- En Irlande, 4,2% des 335 fœtus avortés non autolysés étaient positifs en IHC. La séroprévalence (12,6%) des troupeaux ayant des commémoratifs d'avortement est supérieure à celle (3%) des troupeaux n'ayant pas de commémoratifs d'avortement (Mc Namee et al., 1996)</p> <p>- 34% des avortons bovins soumis à un diagnostic sont victimes de la néosporose (Davison et al., 1999)</p>
Espagne	<p>- Dans le nord du pays, la part des avortements provoqués par <i>Neospora</i> concernent 32 à 57% des fœtus soumis au diagnostic et 33 à 58% des troupeaux impliqués. (Gonzalez et al., 1999)</p> <p>- Dans le nord de l'Espagne la séroprévalence est estimée sur 889 vaches laitières (43 troupeaux) à 30,6% (Mainar-Jaime et al., 1999).</p> <p>- 55,1% des troupeaux allaitants et 83,2% des troupeaux laitiers sont exposés au parasite (Quintanilla-Gozalo et al., 1999)</p> <p>- 31 (38,8 %) des 80 avortons testés pour l'étude sont positifs par au moins une des techniques employé pour la recherche de <i>Neospora</i> (IFAT, ELISA, PCR, Immunohistochimie). (Pereira-Bueno et al., 2003)</p>
Pays-Bas	<p>- <i>Neospora caninum</i> a été retrouvé sur 17% des 2053 fœtus réceptionnés au laboratoire du Service de la Santé Animale à Drachten. (Wouda et al., 1997)</p>
Suède	<p>- 10 vaches sur 35 (28,6%) d'un troupeau laitier avaient des anticorps anti-<i>Neospora caninum</i>. (Holmdahl et al., 1995)</p> <p>- Dans un troupeau laitier fermé, 16 vaches sur 50 (32%) sont séropositives pour <i>Neospora caninum</i> (IFAT>1/640 et DO>0.25 en ELISA) (Bjorkman et al., 1996)</p> <p>- 7% des 378 vaches ayant avortés et issus de 135 élevages laitier sont séropositives (Hemphill et al. 2000)</p>

Annexe 3 : Lésions et manifestations cliniques observées chez les chiens atteints de néosporose clinique.

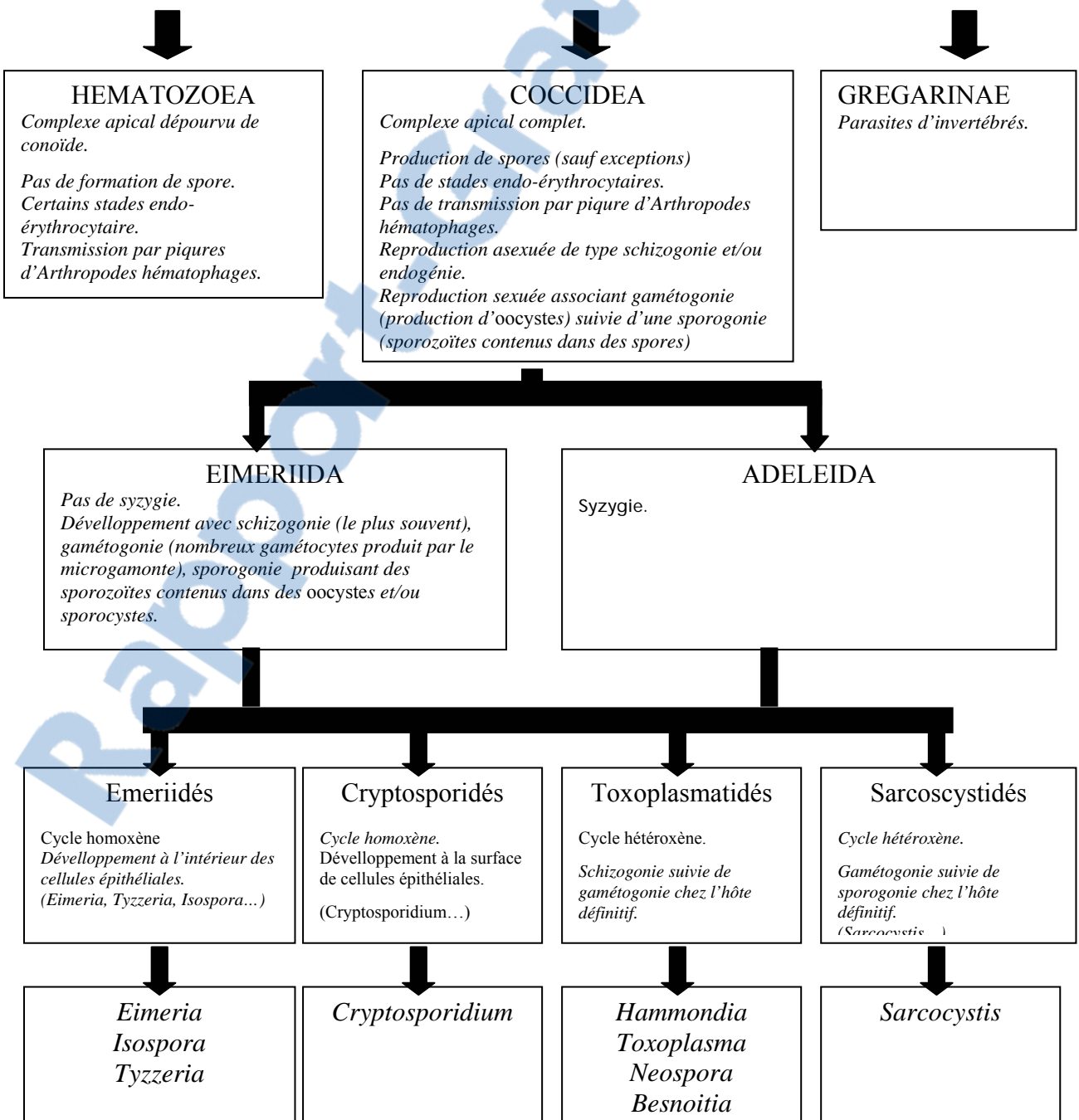
Organes	Lésions	Symptomatologie
Système nerveux.	<ul style="list-style-type: none"> - Polyradiculonévrite (Gasser et al., 1993). - Myélopathie :infiltrat lymphoplasmocytaire. - Méningoencéphalomyélite nécrotique non suppurative multifocale, gliose, démyélinisation, vasculite (Dubey et al., 1990b). 	<ul style="list-style-type: none"> - Parésie progressive des membres postérieurs (plus rarement les antérieurs), le plus souvent spastique, éventuellement flasque. - Diminution des mouvements de la queue, de la sensibilité périnéale, incontinence rectale et vésicale. - Faiblesse ou rigidité cervicale, ataxie locomotrice, paralysie de la mâchoire, tête penchée, nystagmus, anisocorie, crises épileptiformes, troubles du comportement.
Yeux	<ul style="list-style-type: none"> - Rétinite, choréïdite, inflammation des muscles extraoculaires (Dubey et al., 1990b) 	<ul style="list-style-type: none"> - Nystagmus, anisocorie, diminution du réflexe photomoteur.
Appareil locomoteur	<ul style="list-style-type: none"> - Polymyosite diffuse avec infiltrat lymphoplasmocytaire et vasculite. 	<ul style="list-style-type: none"> - Troubles locomoteurs, atrophie musculaire, contracture et fibrose musculaire.
Appareil respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Pleurésie, pneumonie (infiltrat diffus, alvéolaire et interstitiel de cellules inflammatoires) (Greig et al., 1995). 	<ul style="list-style-type: none"> - Insuffisance respiratoire. Radiographie : densification interstitielle et alvéolaire
Appareil cardiovasculaire	<ul style="list-style-type: none"> - Myocardite : foyers nécrotiques disséminés, infiltrat de cellules inflammatoires, fibrose interstitielle. (Odin et al., 1993) 	<ul style="list-style-type: none"> - Mort subite.
Tube digestif et glandes annexes	<ul style="list-style-type: none"> - Hépatite. - Pancréatite (Dubey et al.,1988b) 	<ul style="list-style-type: none"> - Symptômes d'hépatites et de pancréatites
Tégument (Fritz et al.1997)	<ul style="list-style-type: none"> - Dermatite nécrosante, pyogranulomateuse diffuse, associée à une vascularite et un infiltrat cellulaire (macrophages, lymphocytes et polynucléaires) important dans le derme. (Fritz et al., 1997) 	<ul style="list-style-type: none"> - Dermatoses nodulaires avec ou sans atteinte de l'état général.

Annexe 4 : Classification simplifiée de l'embranchement des sporozoaires d'intérêt vétérinaire.

(D'après Bussiéras et Chermette, 1992)

APICOMPLEXA

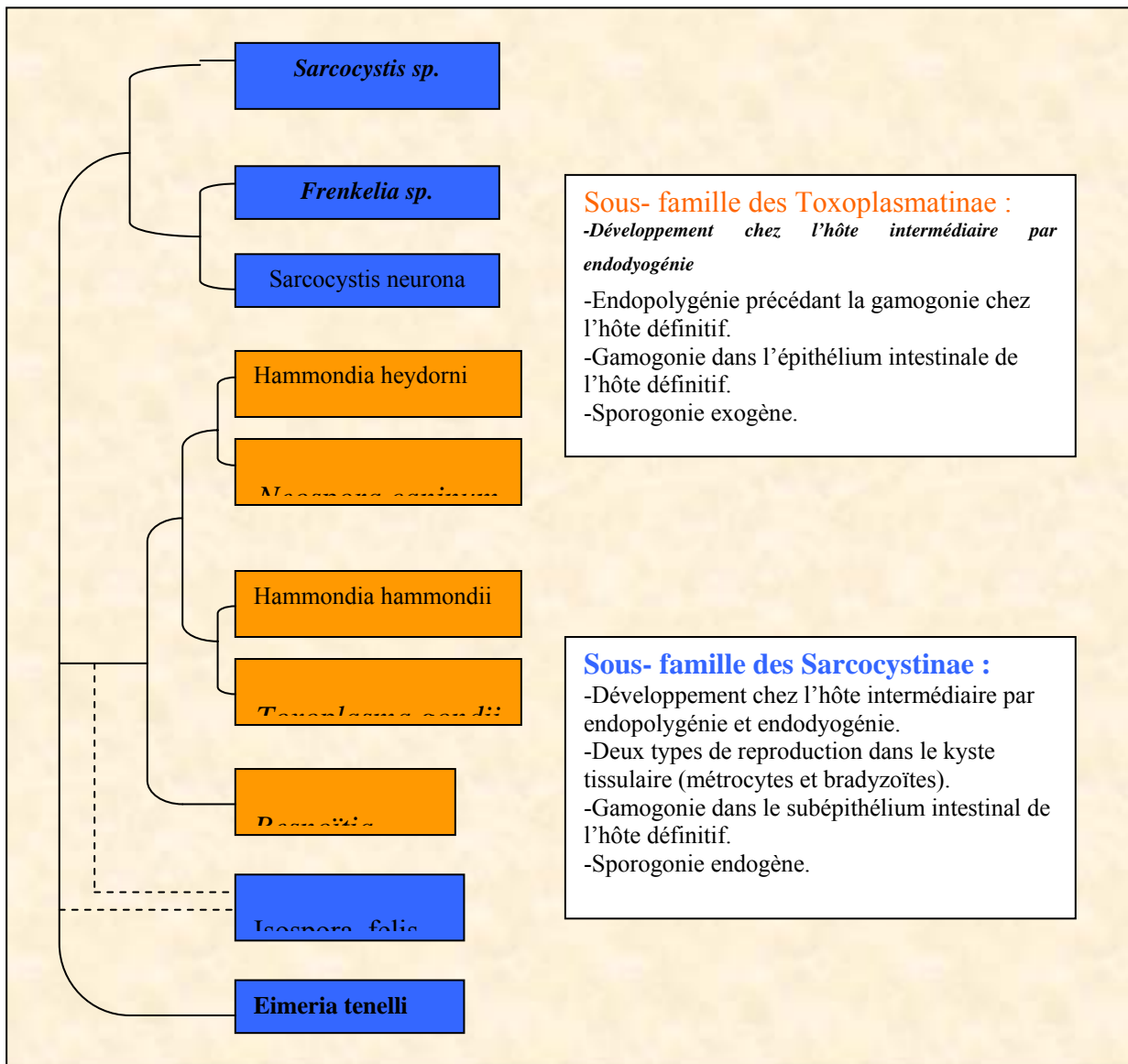
Protozoaire parasite obligatoire à un seul type de noyau, totalement dépourvu d'organites locomoteurs (sauf parfois au stade microgamète) qui présente à certains stades un complexe apical observable uniquement au microscope électronique.



	Caractéristiques morphologiques.	Caractéristiques biologiques	Pouvoir pathogène
<i>Eimeria</i>	Oocystes sporulés à 4 sporocystes renfermant 2 sporozoïtes Oocyste de forme et de taille variable selon les espèces.	Cycle homoxène. Succession de schizogonies, de gamétogonie, fécondation et production d'oocystes chez l'hôte. Développement endogène en général dans les cellules de l'épithélium intestinal (à un étage variable selon l'espèce parasitaire), parfois épithélium des canaux biliaires ou des tubes urinaires.	Agent de coccidioses des mammifères et des oiseaux.
<i>Isospora</i>	Oocystes sporulés à 2 sporocystes et 8 sporozoïtes. Oocystes ovoïdes à paroi épaisse émis non sporulés.	Coccidies monoxènes. Schizogonie dans les entérocytes. Sporogonie dans le milieu extérieur. Cycle avec le chien comme hôte définitif et avec un hôte intermédiaire parathénique varié.	Syndrome entérique chez le chien.
<i>Tyzzeria</i> (<i>T. peritiosa</i>)	Oocystes sporulés à 8 sporozoïtes nus, de forme élipsoïde (10-13X9-11µm)	Cycle homoxène	Coccidiose du canard
<i>Cryptosporidium</i> (<i>C. parvum</i>)	Ookytes (5X4,5µm) à 4 sporozoïtes nus et vermiformes. Présence de reliquat ookystal	Cycle homoxène, schizogonie, gamétogonie, et sporogonie à la surface des cellules épithéliales (tube digestif le plus souvent). Oocystes rejetés sporulés.	Coccidiose des mammifères : entérite chez les jeunes (chiot, veau...) et les adultes immunodéprimés.
<i>Toxoplasma</i> (<i>T. gondii</i>)	Oocystes sporulés à 2 sporocystes et 8 sporozoïtes Tachyzoïtes et kystes à bradyzoïtes dans des tissus variés.	Cycle hétéroxène Hôte intermédiaire : vertébrés à sang chaud Hôte définitif : chat	Coccidiose digestive du chat. Toxoplasmose des mammifères et oiseaux.
<i>Neospora</i> (<i>N. caninum</i>)	Oocystes sporulés à 2 sporocystes et 8 sporozoïtes	Cycle hétéroxène	Agent de néosporose chez les bovins et les chiens
<i>Besnoitia</i> (<i>B. besnoiti</i>)	sporulés à 2 sporocystes et 8 sporozoïtes	Cycle hétéroxène obligatoire Chez l'HD (chat) cycle coccidien intestinal. Chez l'HD (bovins), tachyzoïtes dans les cellules endothéliales vasculaires et kystes à bradyzoïtes dans les fibroblastes.	Agent de la besnoitose bovine
<i>Hammondia</i>	Oocystes sporulés à 2 sporocystes et 8 sporozoïtes Kystes à bradyzoïtes à paroi mince	Cycle hétéroxène obligatoire Chez l'HI (rongeurs, ruminants...) tachyzoïtes dans les cellules lymphoïdes, kystes à bradyzoïtes dans les muscles squelettiques et le myocarde Chez l'HD (carnivores) cycle coccidien intestinal.	Agent de coccidiose digestive chez les carnivores
<i>Sarcocystis</i>	Oocystes à 2 sporocystes (11-20 X 8-16µm) et 8 sporozoïtes. En voie de libération, les deux sporocystes prennent une forme d'halète.	Cycle dixène. Gamétogonie, formation d'oocystes et sporulation dans le tube digestif de l'hôte définitif carnivore. Oocystes sporulés ou sporocystes contenant 4 sporozoïtes rejetés dans les matières fécales. Schizogonies dans les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins suivies de la formation de kystes cloisonnés dans les muscles ou le système nerveux de l'hôte intermédiaire.	Agent de coccidiose digestive chez les carnivores Agent de sarcosporidiose chez les herbivores (bovins, équins)

Annexe 6 : Caractères phénotypiques des espèces courantes des genres *Neospora*, *Hammondia* et *Toxoplasma*.
(Mugdrige et al. 1999)

CARACTERISTIQUES	<i>NEOSPORA CANINUM</i>	<i>HAMMONDIA HEYDORNI</i>	<i>HAMMONDIA HAMMONDI</i>	<i>TOXOPLASMA GONDII</i>
Distribution géographique	Probablement mondiale	Probablement mondiale	Probablement mondiale	Mondiale
Hôtes				
Hôtes définitifs	Chien	Carnivores	Félidés	Félidés
Hôte intermédiaire	Nombreux mammifères	Nombreux mammifères	Nombreux mammifères	Mammifères et oiseaux
Type de cycle	Probablement hétéroxène obligatoire	Probablement hétéroxène obligatoire	Hétéroxène obligatoire	Hétéroxène facultatif
Développement				
Dans l'hôte définitif	?	Endopolygénie et gamogonie	Endopolygénie et gamogonie	Endodyogénie, endopolygénie et gamogonie
Dans l'environnement	Sporogonie	Sporogonie	Sporogonie	Sporogonie
Dans l'hôte intermédiaire	Endodyogénie	Endodyogénie	Endodyogénie	Endodyogénie
Voie de transmission				
De l'hôte définitif vers l'hôte intermédiaire	Sous forme d'oocystes	Sous forme d'oocystes	Sous forme d'oocystes	Sous forme d'oocystes
De l'hôte intermédiaire vers l'hôte définitif	Sous forme de kystes tissulaires	Sous forme de kystes tissulaires	Sous forme de kystes tissulaires	Sous forme de kystes tissulaires ou de tachyzoïtes
De l'hôte définitif vers l'hôte définitif	?	Pas de transmission	Pas de transmission	Sous forme d'oocystes
De l'hôte intermédiaire vers l'hôte intermédiaire	?	?	Pas de transmission	Sous forme de kystes tissulaires ou de tachyzoïtes
Transmission vertical chez l'hôte intermédiaire	Présente	?	?	Présente
Oocystes	« Disporous », tétrazoïque	« Disporous », tétrazoïque	« Disporous », tétrazoïque	« Disporous », tétrazoïque
Taille des oocystes non sporulés (µm)	10.5-12.5X10.5-12	10-14X9-13	11-13X10.5-12.5	11-14X9.5-11
Taille des sporocystes (µm)	7.5-9.5X5.5-6.5	5.5-9.5X4.5-6	8-11X6-7.5	8-9.5X5-6.5
Kystes tissulaires				
Localisation	Système nerveux central	Encéphale	Muscles striés, encéphale	Nombreux tissus
Taille en µm dans le système nerveux central	Supérieur à 107 µm	Au moins 20 µm	Supérieur à 25µm (encéphale); plus de 400µm (muscles)	Supérieur à 50µm (encéphale); plus de 100µm (muscles)
Épaisseur de la paroi du kyste (µm)	1-4	?	< 0.5	< 0.5
Septum	Absent	Absent	Absent	Absent
Taille des bradyzoïtes (µm)	6-8 X 1-2	?	4-7 X 2	7-8 X 1.5
Tachyzoïtes chez l'hôte naturel				
Localisation	Nombreux types cellulaires	?	Cellules lymphoïdes	Nombreux types cellulaires
Taille (µm)	3-7 X 1-5	?	?	3.5-7 X 2-4
Vacuole parasitophore	Absente ou présente	?	?	Présente
Tachyzoïtes en culture cellulaire				
Vacuole parasitophore	Présente	Présente	Présente	Présente
Mode de multiplication	Endodyogénie	Endodyogénie	Endodyogénie	Endodyogénie
Rhoptries antérieures au noyau	8-18	6-12	<10	4-8
Rhoptries postérieures au noyau	Peu nombreux	6-12	Absent	Absent
Micronèmes antérieurs au noyau	Nombreux (>150)	?	Peu nombreux	Peu nombreux
Micronèmes postérieurs au noyau	Peu nombreux	?	Absent	Absent
Micropores	Rare	?	Présents fréquemment	Présents fréquemment
Pathogénicité	Pathogène	?	?	Pathogène
Cause majeure d'avortement	Chez les bovins	?	?	Chez les ovins et les caprins
Immunité croisée	?	?	Avec <i>Toxoplasma gondii</i>	Avec <i>Hammondia hammondi</i>



Annexe 7 : Relation phylogénique des coccidies Eimeriidae obtenue à partir de l'analyse de la séquence du gène 28S rRNA (Mugridge 2002). (D'après Tenter et al., 2002)

Annexe 8 : Avantages et limites des différentes techniques de diagnostic direct
(D'après Pittel et al., 2001c)

Technique	Avantages	Inconvénients	Prélèvements	Modalité de transport
Histologie	<ul style="list-style-type: none"> - Technique de référence - Visualisation de foyers de nécrose entourés de cellules inflammatoires. - Eventuellement observation de tachyzoïtes ou de kystes tissulaires. - Coût modéré 	<ul style="list-style-type: none"> - Très difficile si autolyse. - Demande une habitude de lecture - Nécessité de plusieurs coupes 	<ul style="list-style-type: none"> - Encéphale - Cœur - muscles squelettiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Formol - Liquide de Bouin
Immunohistochimie	<ul style="list-style-type: none"> - Distinction de <i>Neospora</i> des autres Apicomplexa - Visualisation des lésions et du parasite - Utilisable chez les fœtus momifiés. 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficile si autolyse - Qualité de l'anticorps - Demande habitude de lecture - Nécessité de plusieurs coupes 	<ul style="list-style-type: none"> - Encéphale - Cœur 	<ul style="list-style-type: none"> - Formol - Liquide de Bouin
PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Détection d'ADN à partir de nombreux tissus. - Grande sensibilité et spécificité - Compatible avec un début d'autolyse 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite un matériel spécialisé au laboratoire - Pas de visualisation des lésions 	<ul style="list-style-type: none"> - Encéphale - Cœur 	<ul style="list-style-type: none"> - Frais ou congelé sous couvert du froid.
Culture/inoculation	<ul style="list-style-type: none"> - Permet l'isolement du parasite et sa caractérisation - Mise en évidence de son pouvoir pathogène. 	<ul style="list-style-type: none"> - Long, coûteux. - Pas applicable en diagnostic de routine mais utilisée en recherche. 	<ul style="list-style-type: none"> - Encéphales, cœur, muscles 	<ul style="list-style-type: none"> - Frais, sous couvert du froid

Annexe 8' : Avantages et limites des différentes techniques de diagnostic indirect. (D'après Pittel et al., 2001c)

Technique	Avantages	Limites	Prélèvements
IFI	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode sérologique de référence - Rapide et peu coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> - Lecture subjective, nécessitant une certaine expérience - Seuil non standardisé 	<ul style="list-style-type: none"> - Sérum
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - Automatisation possible - Diversité des kits. - Réalisable sur lait 	<ul style="list-style-type: none"> - Seuil non standardisé. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sérum
DAT	<ul style="list-style-type: none"> - Spécifique et très sensible - utilisable sur différentes espèces. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessité d'un nombre important de tachyzoïtes 	<ul style="list-style-type: none"> - Sérum
Western Blot	<ul style="list-style-type: none"> - Très spécifique et sensible - Permet de décrire l'intensité de la réponse pour différentes protéine antigénique 	<ul style="list-style-type: none"> - Long, coûteux, uniquement utilisé pour la recherche. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sérum - Fluides foetaux

Lyse protéique et libération de l'ADN.

- 180 μ L de tampon de lyse (ATL) + 20 μ L de protéinase K
- Incubation (T=56°C, 5 heures au bain marie)
- Centrifugation brève
- 200 μ L de tampon AL (lyse de la protéinase K)
- Incubation 70°C, 10 minutes.



Précipitation de l'ADN dans les colonnes.

- Centrifugation brève + 200 μ L d'éthanol
- Vortex, centrifugation brève,
- Placer dans des colonnes
- Centrifugation 6000 g (8000 rpm), 1 minute.

Premier lavage

- 500 μ L de tampon AW1
- Centrifugation 6000 g (8000 rpm), 1 minute.

Deuxième lavage

- 500 μ L de tampon AW2
- Centrifugation 20000 g (14000 rpm), 3 minutes.

Elution de l'ADN purifié

- Placer les colonnes sur des cryotubes
- 200 μ L de tampon d'élution (AE)
- Incubation 1 minute
- Centrifugation 6000 g, 1 minute

Stockage

- Conservation à -20°C

Annexe 9 : Protocole d'extraction de l'ADN de tissus nerveux et de fèces, utilisé pour l'étude expérimentale (Kit QIAGEN®).

	<i>Nombre de prélèvements testés</i>	<i>Origine des sérums</i>	
		<i>Nombre</i>	<i>Site d'origine</i>
<i>Chamois</i>	100	79	RNF Beauges (73)
		17	Beaufort (73)
		1	Bessans (PNV) (73)
		1	ONC Montriond (73)
		1	Mont Cenis (73)
		1	Thorens Glière (73)
<i>Bouquetins</i>	65	4 1	Aussor (73)
		15 1	Modane (73)
		2	Saint-Martin-la-Porte (73)
		3 1	Bonneval (73)
		11 1	Tignes (73)
		2	Bessans (73)
		4 1	Sassieres (73)
		1	Hermillon (73)
		16 1	Parc Naturel du Queyras (5)
7	PN Vanoise (73)		
<i>Chevreaux</i>	106	70 19	AFSSA Nancy (54)
		10 6	Réserve de Chizé (79)
		4	Bassurel (48)
		3	Mont Cenis (73)
		2	Modane (73)
		17 5	Ille et Vilaine (35)
<i>Biche</i>	1		Ille et Vilaine (35)
<i>Sanglier</i>	5		Ille et Vilaine (35)
<i>Renards</i>	115		Ille et Vilaine (35)
	42		Ille et Vilaine (35)

**Annexe 11 : Nombre d'animaux testés (positifs en néosporose)
dans les différentes espèces en fonction de l'années de**

Année de prélèvement	Chamois	Bouquetins	Chevreaux
1996	1		3
1997	5	10 (1)	22 (12)
1998	22	23 (1)	4
1999	12	13 (2)	60 (14)
2000	18	11 (2)	
2001	43	4	
2002		6	17 (5)

**Annexe 12 : Nombre d'animaux testés (positifs en néosporose)
dans les différentes espèces en fonction de leur âge.**

	Chevreaux	Chamois	Bouquetins
Mâles	45 (14)	24	25 (2)
Femelles	43 (11)	76	38 (4)
?	18 (6)	0	2
Total	106	100	65
Sexe Ratio	1.05	0.32	0,66

AGE	CHAMOIS	BOUQUETINS	CHEVREUILS
2 MOIS	1		
3 MOIS	2		
10 MOIS		2	
13 MOIS	2		
< 1 AN			11 7
1AN	8	1	13 6
2	19	6	2
2.5	2		
3	7	8 2	3 1
3.5	2		
4	6	9	
5	12	9	1 1
5.5	1		
6	7	5	2 1
6.5	3		
7	7	1	
8	9	1	2 1
8.5	2		
9	1	5 1	
9.5	1		
10	2	2	
11		2	
12	2	2	
13		2	
14		2 1	
15		1	
16			
17	1		
JEUNES			19 1
ADULTES			33 7
?	1	6 1	21 6
TOTAL	100	64	107

Chevreaux	-89 (GAP)	0	89	0	89
-----------	-----------	---	----	---	----

Annexe 14 : Résultats de la recherche d'anticorps anti-*Neospora* par les techniques ELISA indirecte et ELISA compétitive, chez les ruminants

Animaux	Nombre	INTERVET		VMRD	
		POS	NEG	POS	NEG
	-17 (Ouest)	0	17	0	17
Bouquetins	65	0	65	1	64
Chamois	100	0	100	1	99
Biche	1	0	1	0	1
Sanglier	5	0	5	0	5

Annexe 15 : Statut sérologique des ruminants, à l'égard de Neospora caninum en agglutination. Analyses réalisées par l'Institut de puériculture-Paris.

	< 20	20	40	80	100	200	400	Total
Chevreaux Savoie	47	16	8	8	8	2	0	89
	52,8 %	18,0 %	9,0 %	9,0 %	9,0 %	2,2 %	0 %	100 %
Chevreaux (35)	8	3	4	0	0	0	1	16
	50 %	18,7 %	25,0 %	0 %	0 %	0 %	6,3 %	100 %
Total chevreuil	55	19	12	8	8	2	1	105
	52,4 %	18,1 %	11,4 %	7,6 %	7,6 %	1,9 %	0,9 %	99,9 %
Chamois	100	0	0	0	0	0	0	100
	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	100 %
Bouquetins	55	3	4	0	1	0	0	63
	87,3 %	4,8 %	6,3 %	0 %	1,6 %	0 %	0 %	100 %
Biche	1	0	0	0	0	0	0	1
	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	100 %

Annexe 16 : Résultats sérologiques anti-*Neospora* des renards testés par ELISA direct (Biovet) et ELISA par compétition (VMRD).

Lots testés	VMRD			BIOVET		
	Nombre de sérums	NEG	POS	Nombre de sérums	NEG	POS
115 renards (35)	113	98	15	113	112	1
	100 %	86,7 %	13,3 %	100 %	99,1%	0,9%
42 renards (35)	42	27	15	42	39	3
	100%	64,3%	35,7%	100%	92,9%	7,1%
157 renards (35)	155	125	30	155	151	4
	100%	80,6 %	19,4%	100%	97,4%	2,6%

Annexe 17 : Résultats de l'agglutination anti-*Neospora* réalisée sur les sérums de renards sauvages.

Lots testés	Dilutions	Agglutination							
		h	<20	20	40	80	100	200	400
115 renards (35)	Nombre brut	26	56	9	2	8	13	0	1
	% des 115 sérums	22,6	48,7	7,8	1,7	7,0	11,3	0	0,9
	% des 89 sérums non hémolysés	0	62,9	10,1	2,2	9,0	14,6	0	1,1
42 renards (35)	Nombre brut	6	15	4	12	4	0	1	0
	% des 42 renards	14,3	35,7	9,5	28,6	9,5	0	2,4	0
	% des 36 sérums non hémolysés.	0	41,6	11,1	33,3	11,1	0	2,8	0
TOTAL (157 renards)	Total brut	32	71	13	14	12	13	1	1
	% des 157 renards	20,4	45,2	8,3	8,9	7,6	8,3	0,6	0,6
	% des 125 sérums non hémolysés	0	56,8	10,4	11,2	9,6	10,4	0,8	0,8

Annexe 18 : Analyse de la concordance entre les deux techniques sérologiques (agglutination et ELISA par caompétition) appliquées aux sérums de renards

		AGGLUTINATION			
		Positifs (≥1/40)	Négatifs (>1/40)	hémolysés	Total
ELISA PAR COMPETITION	Positifs	13	13	4	30
	Négatifs	26	69	28	123
	Total	39	82	32	153

		AGGLUTINATION			
		Positifs (>1/40)	Négatifs (≤1/40)	hémolysés	Total
	Positifs	4	0	0	4
	Négatifs	35	82	32	149

	Total	39	82	32	153
--	-------	----	----	----	-----

Annexe 20 : Analyse de la concordance entre les deux techniques sérologiques (ELISA indirecte et ELISA par compétition) appliquées aux

		ELISA INDIRECT		
		Positifs	Négatifs	Total
ELISA PAR COMPÉTITION	Positifs	4	26	30
	Négatifs	1	122	118
	Total	5	148	153

Annexe 21 : Analyse de la concordance entre les deux techniques sérologiques (agglutination et ELISA par compétition) appliquées aux sérums de chevreuils. P=70,5%

		AGGLUTINATION		
		Positifs ($\geq 1/40$)	Négatifs ($< 1/40$)	Total
ELISA PAR COMPÉTITION	Positifs	0	0	0
	Négatifs	31	74	105
	Total	31	74	105

		AGGLUTINATION		
		Positifs ($\geq 1/40$)	Négatifs ($< 1/40$)	Total
ELISA INDIRE CT	Positifs	0	0	0
	Négatifs	31	74	105

	Total	31	74	105
--	-------	-----------	-----------	------------

Annexe 23 : Analyse de la concordance entre les deux techniques sérologiques (ELISA indirecte et ELISA par compétition) appliquées aux sérums de chevreuils. P=100%

		ELISA INDIRECT		
		Positifs	Négatifs	Total
ELISA PAR COMPÉTITION	Positifs	0	0	0
	Négatifs	0	107	107
	Total	0	107	107

Annexe 24 : Analyse de la concordance entre les deux techniques sérologiques (agglutination et ELISA par compétition) appliquées aux sérums de bouquetins. P=92,1%

		AGGLUTINATION		
		Positifs ($\geq 1/40$)	Négatifs ($< 1/40$)	Total
ELISA PAR COMPÉTITION	Positifs	1	0	1
	Négatifs	5	57	62
	Total	6	57	63

		AGGLUTINATION		
		Positifs ($\geq 1/40$)	Négatifs ($< 1/40$)	Total
ELISA INDIRE CT	Positifs	0	0	0
	Négatifs	5	58	63

	Total	5	58	63
--	-------	---	----	----

Annexe 26 : Analyse de la concordance entre les deux techniques sérologiques (ELISA indirecte et ELISA par compétition) appliquées aux sérums de bouquetins. P=98,5%

		ELISA INDIRECT		
		<i>Positifs</i>	Négatifs	Total
ELISA PAR COMPÉTITION	Positifs	0	1	1
	<i>Négatifs</i>	0	64	64
	Total	0	65	65

-BIBLIOGRAPHIE-

- Almeria S., Ferrer D., Pabon M., Castella J., Manas S. (2002) Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, **107**, 287-294.
- Anderson M.L., Blanchard P.C., Barr B. C., Dubey J. P., Hoffman R. L., Conrad P. A. (1991) Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal American Veterinary Medical Association*, **198** (2), 241-244.
- Anderson M.L., Palmer C.W., Thurmond M.C., Picanso J.P., Blanchard P.C., Breitmeyer R.E., Layton A.W., McAllister M., Daft B., Kinde H., Read D.H., Dubey J.P., Conrad P.A., Barr B.C. (1995) Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal American Veterinary Medical Association*, **207** (9), 1206-1210.
- Anderson M.L., Andrianarivo A.G., Conrad P.A. (2000). Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, **60-61**, 417-431.
- Ashford R.W. (1977) The fox, *Vulpes vulpes* as a final host for *Sarcocystis* of sheep. *Ann. Tropical Medical Parasitology*, **71**, 29-34.
- Atkinson R., Harper P.A.W., Ryce C., Morrison D.A., Ellis J.T. (1999) Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, **118**, 363-370.
- Baker D.G., Morishita T.Y., Brooks D.L., Shen S.K., Lindsay D.S., Dubey J.P. (1995) Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*, **81**(5), 783-785.
- Barber J.S. (1998) Néosporose canine. *Waltham Focus*, **8**(1), 25-29.
- Barber J.S., Trees A. J. (1996) Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Veterinary Record*, 139, 439-443.**
- Barber J.S., Holmdahl J.M., Owen M.R., Guy F., Uggla A., Trees A.J. (1995) Characterization of the first European Isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology*, **111**, 563-568.
- Barber J.S., van Ham L., Polis L., Trees A.J. (1997a) Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. *Journal of Small Animal Practice*, **38**, 15-16.
- Barber J.S., Gasser R.B., Ellis J., Reichel M.P., McMillan D., Trees A.J. (1997b) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *Journal of Parasitology*, **83**(6), 1056-1058.
- Barling K.S., Scherman M., Peterson M.J., Thompson J.A., McNeill J.W. (2000) Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *Journal American Veterinary Medical Association*, **217** (9), 1361-1365.
- Barling K.S., McNeill J.W., Paschal J.C., McCollum III F.T., Craig T.M., Adams L.G., Thompson J.A. (2001) Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, **52**, 53-61.
- Barr B.C., Anderson M.L., Dubey J.P., Conrad P.A. (1991) *Neospora*-like protozoal infections associated with bovin abortions. *Veterinary Pathology*, **28**, 110-106.

- Barr B.C., Anderson M.L., Woods L.W., Dubey J.P., Conrad P.A. (1992) *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, **4**, 365-367.
- Barr B.C., Conrad P.A., Breitmeyer R., Sverlow K., Anderson M.L., Reynolds J., Chauvet A.E., Dubey J.P., Ardans A.A. (1993) Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses : Four cases (1990-1992). *Journal of American Veterinary Medical Association*, **102**, 113-117.
- Barr B.C., Rowe J.D., Sverlow K.W., BonDurant R.H., Adams A.A., Gliver N.N., Conrad P.A. (1994) Experimental reproduction of bovin fetal *Neospora* infection and death with a bovin *Neospora* isolate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **6**, 207-215.
- Barr B.C., Conrad P.A., Sverlow K.W., Tarantal A.F., Hendrick A.G. (1994b) Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in nonhuman primate. *Laboratory Investigation*, **71**(2), 236-242.
- Barr B.C., Anderson M.L., Sverlow K.W., Conrad P.A. (1995) Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Veterinary Record*, **137**, 611-613.
- Bartels C.J.M., Wouda W., Shukken Y.H. (1999) Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, **52**, 247-252.
- Basso W., Venturini L., Venturini M.C., Hill D.E., Kwok O.C.H., Schen S.K., Dubey J.P. (2001a) First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *Journal of Parasitology*, **87**(3), 612-618.
- Basso W., Venturini L., Venturini M.C., Moore P., Rambeau M., Unzaga J.M., Campero C., Bacigalupe D., Dubey J.P. (2001b) Prevalence of *Neospora caninum*

- Björkman C., Lunden A., Holmdahl J., Barber J., Trees A.J., Uggla A. (1994) *Neospora caninum* in dogs : detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*, **16**, 643-648.
- Björkman C., Johansson O., Stenlund S., Holmdahl O.J.M., Uggla A. (1996) *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **208**(9), 1441-1444.
- Björkman C., Holmdahl O.J.M., Uggla A. (1997) An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Veterinary Parasitology*, **68**, 251-260.
- Björkman C., Naslund K., Stenlund S., Maley S.W., Buxton D., Uggla A. (1999) An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **11**(1), 41-44.
- Björkman C., Alenius S., Emanuelsson U., Uggla A. (2000) *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Veterinary Journal*, **159**, 201-206.**
- Björkman C., McAllister M.M., Frossling J., Naslund K., Leung F., Uggla A. (2003) Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **15**(1), 3-7.
- Bourdoiseau G. (2000) *Parasitologie clinique du chien*. Creteil : Nouvelles Editions Veterinaires et Alimentaires, 456p.
- Brindlay P.J., Gazinelli R.T., Denkers E.Y., et al. (1993) Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and surface antigen gene polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **48**, 447-456.
- Bussi eras J. et Chermette R. (1992) *Protozoologie vétérinaire*, 2nd ed. Maisons Alfort : Service de parasitologie de l'ENVA., 186p
- Buxton D., Brebner J., Wright S., Maley S.W., Thomson K.M., Millard K. (1996) Decoquinate and the control of experimental ovine toxoplasmosis. *Veterinary Record*, **138**(18), 434-436.
- Buxton D., Maley S.W., Pastoret P.P., Brochier B., Innes E.A. (1997a) Examination of red foxes (*Vulpes Vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Record*, **141** (12), 308-309.
- Buxton D., Caldwell G.L., Maley S.W., Markis J., Innes E.A. (1997b) Neosporosis and bovine abortion in Scotland. *Veterinary Record*, **141**(25), 649-651.
- Buxton D., Maley S.W., Wright S., Thomson K.M., Rae A.G., Innes E.A. (1998) The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *Journal of Comparative Pathology*, **118**, 267-279.
- Buxton D., McAllister M.M., Dubey J.P. (2002) The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitology*, **18**(12), 546-552.
- Chartier Ch., Baudry C., Losson B., De Meerscham F., Romand S., Thulliez P. (2000) La néosporose chez la chèvre : résultat de deux enquêtes sérologiques dans l'ouest de la France. *Le Point Vétérinaire*, **31** (209), 433-437.
- Cheadle M.A., Lindsay D.S., Blagburn B.L., (1999) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Veterinary Parasitology*, **85**, 325-330.
- Cheadle MA, Spencer JA, Blagburn BL. (1999) Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in nondomestic felids from southern Africa. *Journal of Zoological Wild Medecine*, **30**(2), 248-251.
- Cheadle M.A., Lindsay D.S., Row S., Dykstra C.C., Wiliams M.A., Spencer J.A., Toivo-Kinnucan M.A., Lenz S.D., Newton J.C. (1999c) Prevalence of antibodies to *Neospora sp.* in horses from Alabama and characterisation of an isolate recovered from a naturally infected horse. *International Journal of Parasitology*, **29**(10), 1537-1543.
- Chermette R., Marquer A. (2000) *Neospora caninum* : un nouveau parasite ? *Le Point Vétérinaire*, **31** (208), 285-290.

- Cole R.A., Lindsay D.S., Blagburn B.L., Dubey J.P. (1995) Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *Journal of Parasitology*, **81**(5), 730-732.
- Collery P.M. (1995) *Neospora* encephalomyelitis in a calf. *The Veterinary Record*, **8**, 1995.
- Conrad P.A., Sverlow K., Anderson M., Rowe J., BonDurant R., Tuter G., Breitemeyer R., Palmer C., Thurmond M., Ardans A., Dubey J.P., Duhamel G., Barr B. (1993) Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **5**, 572-578.
- Corbellini L.G., Colodel E.M., Driemeier D. (2001) Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, **13**(5), 416-419.
- Crawshaw W.M., Brocklehurst S. (2003) Abortion epidemic in a dairy herd associated with horizontally transmitted *Neospora caninum* infection. *Veterinary Record*, **112**(4), 269-276.
- Cuddon P., Lin D.-S., Bowman D.D., Lindsay D.S., Miller T.K., Duncan I.D., deLahunta A., Cummings J., Suter M., Cooper B., King J.M., Dubey J.P. (1992) *Neospora caninum* infection in English springer spaniel littermates. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **6**(6), 325-332.
- Da Silva A.J., Bornay-Llinares F.J., Moura I.N.S., Slemenda S.B., Tuttle J.L., Pienazek N.J. (1999) Fast and reliable extraction protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Molecular Diagnosis*, **4**, 57-64.
- Davis S.W., Dubey J.P. (1995) Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocysts shedding in cats. *Journal of Parasitology*, **81**, 883-886.
- Davison H.C., Otter A., Trees A.J. (1999) Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*, **29**, 1683-1689.
- De Marez T., Lidell S., Dubey J.P., Jenkins M.C., Gasbarre L. (1999) Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs : humoral and cellular immune responses. *International journal for parasitology*, **29**, 1647-1657.
- Dijkstra Th., Eysker M., Shares G., Conraths F.J., Wouda W., Barkema H.W. (2001) Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, **31**, 747-752.
- Dijkstra T, Barkema H.W., Bjorkman C., Wouda W. (2002) A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. *Veterinary Parasitology*, **109**(3-4), 203-211.
- Dubey J.P. (1990) *Neospora caninum*: A look at a new *Toxoplasma*-like parasite of dogs and other animals. *The Compendium*, **12** (5), 653-663.
- Dubey J.P. (1999a) Neosporosis-the first decade of research. *International Journal for Parasitology*, **29**, 1485-1488.
- Dubey J.P. (1999b) Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, **84**, 349-367.
- Dubey J.P., Lindsay D.S. (1989a) Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *American journal of Veterinary Research*, **50** (9), 1578-1579.
- Dubey J.P., Lindsay D.S. (1989b) Fatal *Neospora caninum* infection in kittens. *Journal of Parasitology*, **75**(1), 148-151.
- Dubey J.P., Lindsay D.S. (1989c) Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *Journal of parasitology*, **75**(5), 765-771.
- Dubey J.P., Lindsay D.S. (1990) Neosporosis in dogs. *Veterinary Parasitology*, **36**, 147-151.

- Dubey J.P., Lindsay D.S. (1993) Neosporosis. *Parasitology Today*, **9** (12), 452-458.
- Dubey J.P., Lindsay D.S. (1996) A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, **67**, 1-59.
- Dubey J.P., Carpenter J.L., Speer C.A., Topper M.J., Uggla A. (1988a) Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **192**, 1269-1285.
- Dubey J.P., Hattel A.L., Lindsay D.S., Topper M.J. (1988b) Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs : Isolation of causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **193** (10), 1259-1263.
- Dubey J.P., Hartley W.J., Lindsay D.S., Toppert M.J. (1990a) Fatal Congenital *Neospora caninum* Infection in a Lamb. *Journal of Parasitology*, **76** (1), 127-130.
- Dubey J.P., Higgins R. J., Smith J. H., O'Toole T. D. (1990b) *Neospora caninum* encephalomyelitis in a British dog. *Veterinary Record*, **126**, 193-194.
- Dubey J.P., Koestner A., Piper R.C. (1990c) Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **197** (7), 857-860.
- Dubey J.P., Miller S., Lindsay D.S., Topper M.J. (1990d) *Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. *Journal Veterinary Diagnostis Investigation*, **2**, 66-69.
- Dubey JP, Lindsay DS, Lipscomb TP. (1990e) Neosporosis in cats. *Veterinary Pathology*, **27**(5), 335-339.
- Dubey J.P., Acland H.M., Hamir A.N. (1992a) *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. *Journal of Parasitology*, **78**, 532-534.
- Dubey J.P., Lindsay D.S., Anderson M.L. Davis S.W., Shen S.K. (1992b) Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **201**(5), 709-713.
- Dubey J.P., Janovitz E.B., Skowronek A.J. (1992c) Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. *Veterinary Parasitology*, **43**, 137-141.
- Dubey J.P., Hamir A.N., Shen S.K., Thulliez P., Rupprecht C.E. (1993) Experimental *Toxoplasma gondii* infection in raccoons (*Procyon lotor*). *Journal of Parasitology*, **79**, 548-552.
- Dubey J.P., Lindsay D.S., Adams D.S., Gay J.M., Baszler T.V., Blagburn B.L., Thulliez P. (1996a) Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research*, **57** (3), 329-336.
- Dubey J.P., Morales J.A., Villalobos P., Lindsay D.S., Blagburn B.L., Topper M.J. (1996b) Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **208** (2), 263-265.
- Dubey J.P., Rigoulet J., Lagouret P., George C., Longeart P., LeNet J.L. (1996c) Fatal Transplacental Neosporosis in a Deer (*Cervus eldi siamensis*). *Journal of Parasitology*, **82** (2), 338-339.
- Dubey J.P., Romand S., Hilali M., Kwok O.C.H., Thulliez P. (1998) Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *International Journal for Parasitology*, **28**, 527-529.
- Dubey J.P., Romand S., Thulliez P., Kwok O.C.H., Shen S.K., Gamble H.R. (1999a) Prevalence of Antibodies to *Neospora caninum* in Horses in North America. *Journal of Parasitology*, **85** (5), 968-969.
- Dubey J.P., Hollis K., Romand S., Thulliez P., Kwok O.C.H., Hungerford L., Anchor C., Etter D. (1999b) High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginitus*). *International Journal for Parasitology*, **29**, 1709-1711.

- Dubey J.P., Barr B.C., Barta J.R., Bjerkas I., *et al.* (2002a) Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal of Parasitology*, **32**, 929-946.
- Dubey J.P., Hill D.E., Lindsay D.S., Jenkins M.C., Uggla A., Speer C.A. (2002b) *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species. *Trends in Parasitology*, **18**(2), 66-69.
- Dubey J.P., Lindsay D.S., Hill D., Romand S., Thulliez P., Kwok O.C., Silva J.C., Oliveira-Camargo M.C., Gennari S.M. (2002c) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* sera of domestic cats from Brazil. *Journal of Parasitology*, **88**(6), 1251-1252.
- Ellis J. (1998) Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International Journal of Parasitology*, **28**, 1053-1060.
- Ellis J., Luton K., Baverstock P.R., Brindley P.J., Nimo K.A., Johnson A.M. (1994) The phylogeny of *Neospora caninum*. *Molecular Biochemical Parasitology*, **64**, 303-311.
- Ellis J., McMillan D., Croan D., Reddaclif L., Harper P.A.W. (1997) Detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* DNA by single tube nested PCR. *Journal of Microbiology Methodology*, **30**, 237.
- Ellis J.T., Morrison D.A., Liddell S., Jenkins M.C., Mohammed O.B., Ryce C., Dubey J.P. (1998a) The genus *Hammondia* is paraphyletic. *Parasitology*, **118**, 357-362.
- Ellis J.T., Amoyal G., Ryce C., *et al.* (1998b) Comparison of the large subunit ribosomal DNA of *Neospora* and *Toxoplasma* and development of a new genetic marker for their differentiation based on the D2 domain. *Molecular and Cellular Probes*, **12**, 1-13.
- England I.V., Waldeland H., Andresen O. *Et al.* (1998) Foetal loss in dairy goats: an epidemiological study in 22 herds. *Small Ruminant Research*, **30**, 37-48.
- Entzeroth R., Scholtysch E., Grevel E. (1978) The roe deer intermediate host of different coccidia. *Naturwissenschaften*, **65**, 395.
- Ezio F., Anna T. (2003) Antibodies to *Neospora caninum* in European brown hare (*Lepus europaeus*). *Veterinary Parasitology*, **115**(1), 75-78.
- Ferroglio E., Rossi L. (2001) Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in wild ruminants from Italian Alps. *Veterinary Record*, **148**(24), 754-755.
- Fioretti D.P., Rossignoli L., Ricci G., Moretti A., Pasquali P., Polidoni G.A. (2000) *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and serological follow up. *Journal of Veterinary Medicine*, **47**, 47-53.
- French NP., Clancy D., Davison H.C., Trees A.J. (1999) Mathematical model of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *International Journal for Parasitology*, **29**(10), 1691-1704.
- Fritz D., Geoge C., Dubey J.P. (1997) *Neospora caninum*: Associated nodular dermatitis in a middle-aged dog. *Canine Practice*, **22** (4), 21-24.
- Frossling J., Bonnett B., Lindberg A., Bjorkman C. (2003) Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. *Preventive Veterinary Medicine*, **57**(3), 141-153.
- Fujii T.U., Kasai N., Nishi S.M., Dubey J.P., Gennari S.N. (2001) Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from southern regio of Brazil, *Veterinary Parasitology*, **99**(4), 331-334.
- Garcia-Vasquez Z., Cruz-Vasquez C., Medina-Espinoza L., Garcia-Tapia D., Chavarria-Martinez B. (2002) Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology*, **106**(2), 115-120.
- Gasser R.B., Edwards G., Cole R.A. (1993) Neosporosis in a dog. *Australian Veterinary Practitioner*, **23**, 190-193.

- Gennari S.M., Yai L.E., D'Auria S.N., Cardoso S.M., Kwok O.C., Jenkins M.C., Dubey J.P. (2002) Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **106**(2), 177-179.
- Gjerde B. (1983) Shedding of Hammondia deydorny-like oocysts by foxes fed muscular tissue of reindeer (*Rangifer tarandus*). *Acta Veterinaria Scandinia.*, 24(2), 241-243.
- Gondim L.F., Sartor I.F., Hasegawa M., Yamane I. (1999) Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 86(1), 71-75.
- Gondim L.F., Gao L., McAllister M.M. (2002) Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *Journal of Parasitology*, **88**(6), 1159-1163.
- Gonzalez L., Buxton D., Atxaerandio R., Aduriz G., Maley S., Marco J.C., Cuervo L.A. (1999) Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Veterinary Record*, **144**(6), 145-150.
- Gottstein B., Eperon S., Dai W.J., Cannas A., Hemphill A., Greif G. (2001) Efficacy of toltrazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitology Research*, **87**(1), 43-48.
- Graham D.A., Calvert V., Whyte M., Marks J. (1999) Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. *The Veterinary Record*, **144**, 672-673.
- Gray Mary.L., Harmon Barry.G., Les Sales, Dubey J.P. (1996) Visceral neosporosis in a 10-year-old horses. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, **8**, 130-133.
- Greif G. (2000) Immunity to coccidiosis after treatment with toltrazuril. *Parasitology Research*, **86**(10), 787-790.
- Greig B., Rossow D. K., Collins J.E., Dubey J.P. (1995) *Neospora caninum* pneumonia in an adult dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **206** (7), 1000-1001.
- Guarino A, Fusco G., Savini G, Di Francesco G., Gringoli G. (2000) Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Veterinary Parasitology*, **92**(1-2), 15-21.
- Hamir A.N., Tornquist S.J., Gerros T.C., Topper M.J., Dubey J.P. (1998) *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. *Veterinary Parasitology*, **79**, 269-274.
- Hemphill A. (1999) The host-parasite relationship in neosporosis. *Advances in Parasitology*, **43**, 48-104.
- Hemphill A., Gottstein B., Conraths F.J., De Meerschman F., Ellis J.T., Innes E.A., McAllister M.M., Ortega-Mora L.M., Tenter A.M., Trees A.J., Uggla A., Williams D.J.L., Wouda W. (2000) A European perspective on *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, **30**, 877-924.
- Hietala S.K., Thurmond M.C. (1999) Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *International Journal for Parasitology*, **29**, 1669-1676.
- Hilali M., Romand S., Thulliez P., Kwok O.C., Dubey J.P. (1998) Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels of Egypt. *Veterinary Parasitology*, **75**(2-3), 269-271.
- Hill D.E., Liddell S., Jenkins M.C., Dubey J.P. (2001) Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology*, **87**(2), 395-398.
- Ho M.S.Y., Barr B.C., Rowe et al. (1997) Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *Journal of Parasitology*, **83**, 508-514.

- Hoar B.R., Ribble C.S., Spitzer C.C., Spitzer P.G., Janzen E.D. (1996) Investigation of pregnancy losses in beef cattle herds associated with *Neospora sp.* infection. *Canadian Veterinary Journal*, **37**, 364-366.
- Hobson J.C., Duffield T.F., Kelton D., Lissemore K., Hietala S.K., Leslie K.E., McEwen B., Cramer G., Peregrine A.S. (2002) *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, **221**(8), 1160-1164.
- Holmdahl O.J., Bjorkman C., Uggla A. (1995) A case of *Neospora*-associated bovine abortion in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinia*, **36**(2), 279-281.
- Hong-Kean Ooi, Chiu-chen Huang, Chen-Hsiung Yang, Shu-Hwae Lee (2000) Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. *Veterinary Parasitology*, **90**, 47-55.
- Huong L.T.T., Ljungström B.-L., Uggla A., Björkman C. (1998) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Veterinary Parasitology*, **75**, 53-57.
- Innes E.A., Adrianarivo A.G., Björkman C., Williams D.J.L., Conrad P.A. (2002) Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology*, **18**(11), 497-504.
- Jakubek E.B., Bröjer C., Regnersen C., Uggla A., Schares G., Bjorkman C. (2001) Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*, **102**, 167-172.
- Jardine J.E., Last R.D. (1993) *Neospora caninum* in aborted twin calves. *Journal of South African Veterinary Association*, **64**(2), 101-102.
- Jardine J.E., Wells B.H. (1995) Bovine neosporosis in Zimbabwe. *British Veterinary Journal*, **151**, 71.
- Jenkins M.C., Wouda W., Dubey J.P. (1997) Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after neosporosis-induced abortion. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, **7**, 270-274.
- Jenkins M.C. (2001) Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, **101**, 291-310.
- Jenkins M., Baszler T., Bjorkman C., Schares G., Williams D. (2002) Diagnosis and seroepidemiology of neosporosis associated bovine abortion. *International Journal of Parasitology*, **32**(5), 631-636.
- Jensen L., Jensen T.K., Lind P., Henriksen S.A., Uggla A., Bille-Hansen V. (1998) Experimental porcine neosporosis. *Acta Pathology Microbiology and Immunology Scandia*, **106**, 475-482.
- Jolley W.R., McAllister M.M., McGuire A.M., Wills R.A. (1999) Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. *Veterinary Parasitology*, **82**, 251-257.
- Journel C., Chatagnon G., Martin D., Richard A., Tainturier D. (2001) Prévention des avortements et des infections fœtales dues à *Neospora caninum* chez les génisses : Essais de traitement pendant toute la gestation avec du decoquinat à la posologie de 2 mg/kg/jour. In : *Comptes rendus des Journées Bovines Nantaises*. Nantes, 11 octobre 2001. Nantes : J.B.N., 12-16.
- Kaufmann H., Yamage M., Roditi L., Dobbelaera D., Dubey J.P., Holmdahl O.J.M., Trees A., Gottstein B. (1996) Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol. Cell. Probes*, **10**, 289-297.
- Kim J.H., Lee J.K., Hwang E.K., Kim D.Y. (2002) Prevalence of Antibodies to *Neospora caninum* in Korean Native Beef Cattle. *Journal of Veterinary Medicine Science*, **64**(10), 941-943.
- Kim J.T., Park J.Y., Seo H.S., Oh H.G., Noh J.W., Kim J.H., Kim D.Y., Youn H.J. (2002) In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, **103**(1-2), 53-63.
- Khan I.A., Schwartzman J.D., Fonseca S., Kasper L.H. (1997) *Neospora caninum* : Role for immune cytokines in host immunity. *Experimental Parasitology*, **85**, 24-34.

Klein F., Hietala SK, Berthet H., Very P., Gradinaru D. (1997) *Neospora caninum* : enquête sérologique sur les avortements des bovins normands et charolais. *Le Point Vétérinaire*, **28**(183), 1283-1286.

Kritzner S., Sager H., Blum J., Krebber R., Greif G., Gottstein B. (2002) An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril- sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 1(4), [<http://www.ann-clinmicrob.com/content/1/1/4>]

Lally N.C., Jenkins M.C., Dubey J.P. (1996a) Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an ELISA for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **3**, 275-279.

Lally N.C., Jenkins M.C., Dubey J.P. (1996b) Development of a Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. *Molecular Biochemical Parasitology*, **75**, 169-178.

Landmann J.K., Jillella D., O'Donoghue P.J., McGowan M.R. (2002) Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *Australia Veterinary Journal*, **80**(8), 502-503.

Liddell Susan, Jenkins Mark C., Dubey J.P. (1999a) Vertical transmission of *Neospora caninum* in Balb/c mice determined by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Parasitology*, **85** (3), 550-555.

Liddell Susan, Jenkins Mark C., Dubey J.P. (1999b) A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, **29**, 1583-1587.

Lindsay D. S., Dubey J.P. (1989a) *Neospora caninum* (Protozoa : Apicomplexa) infections in Mice. *Journal of Parasitology*, **75** (5), 772-779.

Lindsay D. S., Dubey J.P. (1989b) Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American Journal of Veterinary Research*, **50** (11), 1981-1983.

Lindsay D. S., Dubey J.P. (1989c) In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *Journal of Parasitology*, **75**(1), 163-165.

Lindsay D.S., Dubey J.P. (1990) Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa : Apicomplexa). *Journal of Parasitology*, **75**(3), 410-413.

Lindsay D. S., Dubey J.P. (2000) Canine neosporosis. *Journal of veterinary parasitology*, **14** (1), 1-11.

Lindsay D.S., Blagburn B., Dubey J.P. (1992) Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *Journal of Parasitology*, **78**(1), 70-72.

Lindsay D.S., Speer C.A., Toivio-Kinnucan M.A., Dubey J.P., Blagburn B.L. (1993) Use of infected cultured cells to compare ultrastructure features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *American Journal of Veterinary Research*, **54** (1), 103-106.

Lindsay D.S., Rippey N.S., Sartin T.A., Dubey J.P., Blagburn B.L. (1995) Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research*, **56** (9), 1176-1180.

Lindsay D. S., Dubey J.P., Byron L.B. (1996a) Finding the cause of parasite-induced abortions in cattle. *Veterinary Medicine*, janvier 1996, 64-71.

Lindsay DS, Kelly EJ, McKnown RD, Stein FJ, Plozer J, Herman J, Blagburn BL, Dubey JP. (1996b) Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*, **82**(4), 657-659.

- Lindsay D.S., Butler J.M., Blagburn B.L. (1997) Efficacy of decoquinate against *Neospora caninum* tachyzoites in cell cultures. *Veterinary Parasitology*, **68**, 35-40.
- Lindsay D. S., Dubey J.P., Duncan R.B. (1999a) Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, **82**, 327-333.
- Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP (1999b) A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *International Journal for Parasitology* **29**, 1521-1523.
- Lindsay D.S., Weston J.L., Little S.E. (2001) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from south Carolina. *Veterinary Parasitology*, **97**, 159-164.
- Lindsay D.S., Little S.E., Davison W.R. (2002) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*, from the southern United States. *Journal of Parasitology*, **88**(2), 415-417.
- Lunden A, Marks J, Maley SW, Innes EA (1998) Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunology*, **20**, 519-526.
- Mainar-jaime R.C., Thurmond M.C., Berzal-Herranz B., Hietala S.K. (1999) Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Veterinary Record*, **145**, 72-75.
- Marquer A., Chermette R. (2000) La néosporose chez les bovins. *Le Point Vétérinaire*, **31** (208), 293-298.
- Marsh A. E., Barr B.C., Sverlow K., Ho M., Dubey J.P., Conrad Patricia A. (1995) Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. *Journal of Parasitology*, **81** (4), 530-535.
- Marsh AE, Barr BC, Packham AE, Conrad PA 1998 Description of a new *Neospora* species. *Journal of Parasitology*, **84**, 983-991.**
- McAllister M.M. (1999) Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. *Parasitology Today*, **15** (6), 216-217.
- McAllister Milton (2000) *Neospora caninum* : its oocysts and its identity :an opinion. *Parasitology Research*, **86**, 860.
- McAllister M.M., McGuire A.M., Jolley W.R., Lindsay D.S., Trees A.J., Stobart R.H. (1996) Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Veterinary Parasitology*, **33**, 647-655.
- McAllister MM, Jolley WR, Wills RA, Lindsay DS, Mc Guire AM, Tranas JD (1998a) Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research*, **59**(4), 441-444.
- McAllister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A., McGuire A.M. (1998b) Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal of Parasitology*, **28**, 1473-1478.
- McAllister Milton, Wills Rebecca A., McGuire Angella M., Jolley William.R., Tranas Jennifer D., Williams Elizabeth S., Lindsay David S., Björkman Camilla., Belden E. Lee (1999) Ingestion of *Neospora caninum* tissue cysts by *Mustela* species. *International Journal for Parasitology*, **29**, 1531-1536.
- McAllister Milton, Bjorkman Camilla, Anderson-Sprecher Richard, Rogers DG. (2000) Evidence of point source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows, *Journal of American Veterinary Medicine Association*, **217**(6), 881-887.
- McGuire A.M., McAllister M., Wills R.A., Tranas J.D. (1999) Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, **29**, 1525-1529.
- McNamee P.T., Trees A.J., GUY F., Moffet D., Kilpertrick D. (1996) Diagnosis and prevalence of neosporosis in cattle in Northern Ireland. *Veterinary Record*, **138**(17), 419-420.

- Mehlhorn H., Heydorn Alfred O. (2000) *Neospora caninum* : Is it really different from *Hammondia heydorni* or is it strain of *Toxoplasma gondii* ? An opinion. *Parasitology Research*, **86**, 169-178.
- Moen A.R., Wouda W, Mul MF, Graat EAM, Werven T. (1998) Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology*, **49**, 1301-1309.
- Moskwa B., Cabaj W., Pastusiak K., Bien J., Wojdan J., Sloniewski K. (2003) The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows.[en ligne] In : *COST 854* [http://www.bfav.de/organisation/ifed/cost854/cost854_6html]
- Mugridge N.B., Morrison D.A., Jonhson A.M., Tenter A.M. (1999) Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. *International Journal of Parasitology*, **29**, 1545-1556.
- Müller N., Zimmermann V., Hentrich B., Gottstein B. (1996) Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**, 2850-2852.
- Müller N., Vonlaufen N., Gianinazzi C., Leib S.L., Hemphill A. (2002) Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**(1), 252-255.
- Nietfeld J.C., Dubey J.P., Anderson M.L., Libal M.C., Yaeger M.J., Neiger R.D. (1992) *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **4**, 223-226.
- Odin M., Dubey J.P. (1993) Sudden death associated with *Neospora caninum* myocarditis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **203** (6), 831-833.
- Ogino H., Watanabe S., Agawa H., Narita M., Haritani M., Kawashima K. (1992) Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. *Journal of Comparative Pathology*, **107**, 231-237.
- Ortuno A., Castella J., Almeria S. (2002) Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Spain. *Journal of Parasitology*, **88**(6), 1263-1266.
- Otter A., Wilson B.W. (1997) Bovine abortion outbreaks associated with *Neospora* and other infectious agents. *Veterinary Record*, **141**, 659-660.
- Ould-Amrouche A., Klein F., Osdoit C., et al. (1999) Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Veterinary Research*, **30**, 531-538.
- Owen M.R., Clarkson M.J., Trees A.J. (1998) Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by polymerase chain reaction. *Veterinary Record*, **142**, 445-448.
- Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, Loomis EF, Rowe JD, Anderson ML, Marsh AE, Cray C, Barr BC (1998) A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent antibody test, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Diagnosis Laboratory Immunology*, **5**, 567-573.
- Paré J., Hietala S.K., Thurmond M.C. (1995a) Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **7**, 273-275.
- Paré J., Hietala S.K., Thurmond M.C. (1995b) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **7**, 352-359.
- Paré J., Thurmond M. C., Hietala S. K. (1996) Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Canine Journal of Veterinary Research*, **60**, 133-139.

- Paré J., Thurmond M. C., Hietala S. K. (1997) *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *Journal of Parasitology*, **83** (1), 82-87.
- Paré J., Fecteau G., Fortin M., Marsolais G. (1998) Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **213**, 1595-1598.
- Parish S.M., Maag-Miller L., Besser T.E., Weidner J.P., McElwain T., Knowles D.P., Leathers C.W. (1987) Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **191** (12), 1599-1600.
- Payne S., Ellis J. (1996) Detection of *Neospora caninum* DNA by Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Parasitology*, **26**, 347-351.
- Payot F. (2001) Epidémiologie de la néosporose bovine en France et au Québec ; évaluation des moyens de lutte. Thèse de Médecine Vétérinaire, Alfort, n°076, 96p.
- Pereira-Bueno J., Quintanilla-Gozalo A., Pérez-Pérez V., Espi-Felgueroso A., Alvarez-Garcia G., Collantes-Fernandez E., Ortega-Mora L.M. (2003) Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, **111**, 143-152.
- Perez E., Gonzalez O., Dolz G., Morales J.A., Barr B., Conrad P.A. (1998) First report of bovine neosporosis in dairy cattle in Costa Rica. *Veterinary Record*, **142**, 520-521.
- Peters M., Wohlsein P., Knieriem A., Schares G. (2001) *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). *Veterinary Parasitology*, **97**(2), 153-157.
- Pitel P.H., Fortier G. (2002) Néosporose et reproduction : Actualités. In : *Comptes rendus des Journées de la Société Française de Buiâtrie*. La Défense, 29-31 Octobre 2002. Paris : S.F.B., 233-241.
- Pitel P.-H., Pronost S., Legendre M.-F., Chatagnon G., Tainturier D., Fortier G. (2000) Infection des bovins par *Neospora caninum* : deux années d'observations dans l'ouest de la France. *Le Point Vétérinaire*, **31**(205), 145-150.
- Pitel P.-H., Pronost S., Chatagnon G., Tainturier D., Fortier G., Ballet J.-J. (2001a) Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France : detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. *Veterinary Parasitology*, **102**, 269-277.
- Pitel P.H., Pronost S., Romand S., Thulliez P., Fortier G., Ballet J.J. (2001b) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France. *Equine Veterinary Journal*, **33** (2), 205-207.
- Pitel P.H., Pronost S., Hary C., Legendre M.F., Ballet J.J., Fortier G. (2001c) Diagnostic de la néosporose bovine. In : *Comptes rendus de la Journée Bovine Nantaise*. Nantes, 11 octobre 2001, 1-7.
- Pitel P.H., Lindsay D.S., Caure S., Romand S., Pronost S., Gargala G., Mitchell S.M., Hary C., Thulliez P., Fortier G., Ballet J.J. (2003) Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Neospora caninum* by serum antibodies in healthy French horses from two farms with previous equine protozoal myeloencephalitis-like cases. *Veterinary Parasitology*, **111**(1), 1-7.
- Pluye A. (1999) Un cas de néosporose chez un chiot. *Pratique Médicale et Chirurgicale des Animaux de Compagnie*, **34**, 597-602.
- Pongsatorn Suteeraparp, Satis Pholpark, Manvika Pholpark, Apirom Charoenchai, Tasanee Chompoochan, Itsuro Yamane, Yoshihito Kasshiwazaki (1999). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and associated abortion in dairy cattle from central Thailand. *Veterinary Parasitology*, **86**, 49-57.
- Pronost S., Pitel P.-H., Foucher N., Collobert C., Fortier G. (2000) La néosporose équine. *Le Point Vétérinaire*, **31**(208), 299-304.
- Quinn H., Ellis J., Smith N. (2002) *Neospora caninum* : a cause of immune-mediated failure of pregnancy ? *Trends Parasitology*, **18**(9), 391.

- Quintanilla-Gonzalo A., Pereira-Bueno J., Tabares E., Innes E.A., Gonzalez-Paniello R., Ortega-Mora L.M. (1999) Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *International Journal of Parasitology*, **29**(8), 1201-1208.
- Rasmussen K., Jensen A.L. (1996) Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. *Veterinary Parasitology*, **62**, 345-349.
- Robert F. (1996) Neosporose: bilan des connaissances actuelles sur cette parasitose de découverte récente. *Revue Française des Laboratoires*, **285**, 29-34.
- Romand S, Thulliez P., Dubey J.P., (1998) Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research*, **84**, 50-53.
- Romero J.J., Perrez E., Dolz G., Frankena K. (2002) Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of twenty specialised Costa Rican dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, **53**(4), 263-273.
- Sager H., Gloor M., Björkman C., Kritznier S., Gottstein B. (2003) Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. *Veterinary Parasitology*, **112**, 1-10.
- Sanderson M.W., Gay J.M., Baszler T.V. (2000) *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Veterinary Parasitology*, **90**, 15-24.
- Sawada M., Park C., Kondo H., Morita T., Shimada A, Yamane L., Umenura T. (1998) Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *Journal of Veterinary Medicine Science*, **60**, 853-854.
- Schares G., Conraths F.J., Reichel M.P. (1999) Bovine neosporosis :comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *International Journal for Parasitology*, **29**, 1659-1667.
- Schares G., Wenzel U., Müller T., Conraths F.J. (2001a) Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*). *International Journal for Parasitology*, **31**, 418-423.
- Schares G., Heydorn A.O., Cüppers A., Conraths F.J., Mehlhorn H. (2001b) Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. *Parasitological Research*, **87**, 873-877.
- Schares G., Heydorn A. O., Cüppers A., Mehlhorn H., Geue L., Peters M., Conraths F.J. (2002) In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. *Parasitological Research*, **88**, 44-52.
- Schilling D., Singer D., Diller H. (1986) Guide des mammifères d'Europe. *Lausanne : Delachaux et Niestlé S.A.*, 280p.
- Schivaprasad H.L., Ely R., Dubey J.P. (1989) A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Veterinary Parasitology*, **34**, 145-148.
- Simpson V.R., Monies R.J., Riley P., Cromey D.S. (1997) Foxes and neosporosis. *Veterinary Record*, **141** (19), 503.
- Slapeta J.R., Modry D., Kyselova I., Horejs R., Lukes J., Koudela B. (2002) Dog shedding oocysts of *Neospora caninum* : PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Veterinary Parasitology*, **109**, 157-167.
- Speer C.A., Dubey J.P. (1989) Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *Journal of Protozoology*, **36** (5), 458-463.
- Speer C.A., Dubey J.P., McAllister M.M., Blixt J.A. (1999) Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International Journal of Parasitology*, **29**, 1509-1519.
- Spencer J.A., Witherow A.K., Blagburn B.L. (2000) A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. *Journal of Parasitology*, **86**(6), 1366-1368.

- Stenlund S., Kindahl H., Magnusson U., Ugglå A., Björkman C. (1999) Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, **85**, 227-234.
- Stenlund S., Björkman C., Holmdahl J., Kindahl H., Ugglå A. (1997) Characterisation of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitological Research*, **83**, 214-219.
- Tenter A.M., Barta J.R., Beveridge I., Duszynski W., Melhorn H., Morrison D.A., Thompson R.C.A., Conrad P.A. (2002) The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology*, **32**, 595-616.
- Thisted J.P., Dubey J.P. (1989) Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **1**, 205-209.
- Thornton R.N., Thompson E.J., Dubey J.P. (1991) *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, **39**, 129-133.
- Thurmond M.C., Hietala S. (1995) Strategies to control *Neospora* infection in cattle. *The Bovine Practitioner*, **29**, 29-32.
- Thurmond M.C., Hietala S. (1997a) Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **210**(5), 672-674.
- Thurmond M.C., Hietala S. (1997b) Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *American Journal Veterinary Research*, **58**, 1381-1385.
- Thurmond M.C., Anderson Mark L., Blanchard Patricia C. (1995) Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. *Journal of Parasitology*, **81**(3), 364-367.
- Tranas J., Heinzen R.A., Weiss L.M., McAllister M.M. (1999) Serological Evidence of Human Infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **6** (5), 765-767.
- Trees A.J., Guy F., Low J.C., Roberts L., Buxton D., Dubey J.P. (1994) Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. *Veterinary Record*, **134**, 405-407.
- Trees A.J., Davison H.C., Innes E.A., Wastling J.M. (1999) Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, **29**, 1195-1200.
- Trees A., McAllister M., Guy C., McGarry J., Smith R., Williams D. (2002) *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Veterinary Parasitology*, **109**(1-2), 147.
- Ugglå A., Stenlund S., Holmdahl O.J.M., Jakubek E.-B., Thebo P., Kindahl H., Björkman C. (1998) Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *International Journal for Parasitology*, **28**, 1467-1472.
- Williams D.J.L., McGarry J., Guy F., Barber J., Trees A.J. (1997) Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Veterinary Record*, **140**, 328-331.
- Williams D.J., Guy C.S., McGarry J.W., Guy F., Tasker L., Smith R.F., MacEachern K., Cripps P.J., Kelly D.F., Trees A.J. (2000) *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, **121**(Pt4), 347-358.
- Williams J.H., Espie I., van Wilpe E., Matthee A. (2002) Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. *Journal of Scientific African Veterinary Association*, **73**(1), 38-43.
- Wolfe A., Hogan S., Maguire D., Fitzpatrick C., Vaughan L., Wall D., Hayden T.J., Mulcahy G. (2001) Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. *Veterinary Record*, **149**, 759-763.
- Woods L.W., Anderson M.L., Swift P.K., Sverlow K.W. (1994) Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*), *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **6**, 508-510.

Wouda W. (2000) Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: A review. *The Veterinary Quarterly*, 22(2), 71-74.

Wouda W., Moen A.R., Visser I.J.R., van Knapen F. (1997) Bovine fetal neosporosis : a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart and liver. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9, 180-185.

Wouda W., Dijkstra Th., Kramer A.M.H., Van Maanen C., Brinkhof J.M.A. (1999a) Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, 29, 1677-1682.

Wouda W., Bartels C.J.M., Moen A.R. (1999b) Characteristics of *Neospora caninum* associated abortions storms in dairy herds in The Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, 52, 233-245.

Wu J.T.Y., Dreger S., Chow E.Y.W., Bowlby E.E. (2002) Validation of 2 commercial *Neospora caninum* antibody enzyme likeed immunosorbent essays. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 66, 264-271.

Yaeger M.J., Shawd-Wessels S., Leslie-Steen P. (1994) *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6, 506-508.

Yamage M., Flechtner O., Gottsein B. (1996) *Neospora caninum* :specific oligonucleotide primers for the detection of brain 'cysts' DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Parasitology*, 82, 272-279.

TITRE : INFECTION A *NEOSPORA CANINUM* DANS LA FAUNE SAUVAGE FRANÇAISE.

Nom et Prenom : LELEU Anthony

RESUME :

Neospora caninum est une coccidie responsable d'avortements chez les bovins. L'infection a aussi été décrite chez d'autres espèces de mammifères domestiques (le chien, le mouton, la chèvre et le cheval) et sauvages (le cerf, le chevreuil, le chamois, le renard et le coyote). Après avoir dressé le bilan des connaissances actuelles nécessaires à la compréhension de la biologie de ce parasite, l'auteur présente une étude visant à évaluer la prévalence de l'infection par *N. caninum*, en France, dans des populations de chamois (*Rupicapra rupicapra*), de bouquetins (*Capra ibex*), de chevreuils (*Capreolus capreolus*) et de renards roux (*Vulpes vulpes*). Des anticorps anti-*Neospora* ont été recherchés dans les sérums de 274 ruminants et de 157 renards au moyen de techniques de séroagglutination et d'ELISA indirect et par compétition (kits commercialisés). Cette étude a aussi été entreprise pour savoir si le renard roux peut dans les conditions naturelles être un hôte intermédiaire ou définitif pour *N. caninum*. Le parasite a été recherché dans les prélèvements de matières fécales (52 animaux), d'encéphales (78 animaux) et de fœtus (provenant de 17 femelles) de renards sauvages chassés en Bretagne. Un examen coprologique après enrichissement par la méthode de flottation au sucrose a été réalisé pour rechercher les oocystes coccidiens dans les matières fécales des renards. Une technique d'amplification génique (PCR) de la région Nc5, spécifique de *Neospora*, a été employée pour rechercher le parasite dans les fèces, les encéphales et les fœtus. A l'issue de l'étude de séroprévalence, nous avons privilégié les résultats obtenus par la séroagglutination. Avec cette technique, 31 des 105 chevreuils, 5 des 63 bouquetins et 41 des 157 renards ont des anticorps à un titre supérieur ou égal au 1/40 (seuil de positivité choisi). En revanche, aucun anticorps anti-*N. caninum* n'a été détecté chez les chamois. Dans la seconde étude, aucun oocyste n'a été observé à l'examen coprologique des matières fécales, mais l'ADN de *N. caninum* a été amplifié pour 9 (11,5 %) des 78 encéphales et 8 (15,4 %) des 52 prélèvements de fèces de renards sauvages. Aucun des prélèvements de fœtus n'a fourni de signal en PCR. L'intensité des signaux des échantillons positifs est relativement faible, à l'exception d'un encéphale pour lequel le séquençage de l'ADN amplifié a révélé une forte similitude avec la séquence de l'ADN de *N. caninum*. Ces résultats indiquent que la prévalence de l'infection par *N. caninum* dans les populations de chevreuils ($29,5 \pm 8,9\%$) et de renards roux ($32,8 \pm 8,4\%$) est élevée en France, en particulier en Bretagne. Nous avons d'autre part confirmé que le renard roux est un hôte intermédiaire pour le parasite (signal PCR intense et séquençage de l'ADN). Nous avons aussi mis en évidence la présence d'ADN dans les matières fécales de renards sauvages, mais sans pouvoir affirmer que le renard excrète des oocystes et qu'il est hôte définitif pour *N. caninum*. L'infection latente des chevreuils et des renards roux indique que ces animaux pourraient jouer un rôle dans l'épidémiologie de la néosporose en France.

Mots-clés : *Neospora caninum*, renard roux, ruminants sauvages, cycle évolutif, France, séroprévalence, PCR.

JURY :

Président Pr

Directeur Pr CHERMETTE

Assesseur M. MAILLARD

Invités Dr P.H. PITEL et Dr G. FORTIER

Adresse de l'auteur :

Anthony LELEU

10 La haute rue

76490 Saint Nicolas de la haie.

TITLE : NEOSPORA CANINUM INFECTION AMONG WILD FAUNA IN FRANCE

SURNAME: LELEU

Given name : Anthony

SUMMARY :

Neospora caninum is a coccidian parasite which is liable for abortion in cattle. The infection has also been related in other domestic (dog, sheep, goat and horse) or wild (deer, roe deer, chamois, fox and coyote) mammals. After reviewing the present knowledge indispensable to understand the biology of this parasite, the author presents a study which was undertaken to evaluate, in France, the prevalence of *N. caninum* infection in wild populations of chamois (*Rupricapra rupricapra*), alpine ibex (*Capra ibex*), roe deer (*Capreolus capreolus*), and red foxes (*Vulpes vulpes*). Serum samples from 274 wild ruminants and 157 red foxes were examined for *N. caninum* antibodies using a Direct Agglutination Test (DAT), and indirect and competitive ELISAs (marketing kits). This study was also undertaken to determine if red foxes are natural intermediate or definitive hosts for *N. caninum*. Faecal samples (52 animals), brain tissues samples (78 animals) and foetuses (from 17 vixens) from red foxes hunted in french Brittany were examined. Faeces collected were examined for coccidian oocysts using sucrose flotation. For PCR-based diagnosis of *N. caninum* in brain tissues, faecal samples and foetuses, the specific genomic Nc5 region was selected as the target sequence for DNA amplification. Results of DAT was chosen to evaluate the seroprevalence to *N. caninum*. Antibodies were found in 31 of 105 roe deer sera, 5 of 63 ibex sera and in 41 of 157 fox sera, at the 1:40 dilution (cut-off chosen). None of the chamois had antibodies to *N. caninum* detectable by DAT. No oocysts compatible with *N. caninum* were found in faecal samples, but 9 (11,5%) of the 78 brain tissues samples and 8 (15,4%) of the 52 faecal samples were positive by PCR for *N. caninum*. All the foetuses were negative by PCR. Signal intensitie of all positive samples was relatively weak with the exception of one brain sample, that also showed a high similarity with the isolate designed as *N. caninum* when the Nc5 region of amplified DNA was sequenced. These results indicate that *N. caninum* infection is fairly common in red foxes ($32,8 \pm 8,4\%$) and roe deers ($29,5 \pm 8,9\%$), in France, especially in Britain. They also confirmed that red foxes can act as intermediate host for *N. caninum*. Although *N. caninum* DNA was find in faecal samples, we failed to demonstrate that red foxes is a definitif host for the parasite (no oocyst found). A widespread latent infection of red foxes and roe deer in Brittany indicates that these animals could play a role in the epidemiology of neosporosis in this area.

KEYS WORDS : *Neospora caninum*, red foxes, wild ruminants, life cycle, France, seroprevalence, PCR.

JURY :

President Pr

Director Pr CHERMETTE

Assessor M. MAILLARD

Guest Dr P.H. PITEL et Dr G. FORTIER

Author's Address :

Anthony LELEU

10 La haute rue

76490 Saint Nicolas de la haie.