

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE,
AGROALIMENTAIRE ET DE
L'ALIMENTATION DE NANTES
ATLANTIQUE – ONIRIS 2021

PRÉVALENCE ET FACTEURS DE RISQUE DE LA PIROPLASMOSE ÉQUINE – ÉTUDE PROSPECTIVE

THÈSE
pour le diplôme d'État de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement

le 21 Octobre 2021

devant la Faculté de Médecine de Nantes

par

Alexandre, Théo MUZARD

né le 25 / 05 / 1997 à TROYES (10)

JURY

Président	Monsieur Michel BOURIN <i>Professeur à la faculté de médecine de Nantes</i>
Rapporteur	Monsieur Albert AGOULON <i>Maître de Conférences à Oniris</i>
Assesseur	Madame Anne COUROUCE <i>Professeur à Oniris</i>
Membre invité d'honneur	Madame Laurence MALANDRIN <i>Chargée de recherche INRAE</i>

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE,
AGROALIMENTAIRE ET DE
L'ALIMENTATION DE NANTES
ATLANTIQUE – ONIRIS 2021

PRÉVALENCE ET FACTEURS DE RISQUES DE LA PIROPLASMOSE ÉQUINE – ÉTUDE PROSPECTIVE

THÈSE
pour le diplôme d'État de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement

le 21 Octobre 2021

devant la Faculté de Médecine de Nantes

par

Alexandre, Théo MUZARD

né le 25 / 05 / 1997 à TROYES (10)

JURY

Président	Monsieur Michel BOURIN <i>Professeur à la faculté de médecine de Nantes</i>
Rapporteur	Monsieur Albert AGOULON <i>Maître de Conférences à Oniris</i>
Assesseur	Madame Anne COUROUCE <i>Professeur à Oniris</i>
Membre invité d'honneur	Madame Laurence MALANDRIN <i>Chargée de recherche INRAE</i>

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment**Responsable : Hervé POULIQUEN - Adjoint : Emmanuel JAFFRES**

Nutrition et Endocrinologie	Patrick NGUYEN (Pr)
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Martine KAMMERER (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr) Antoine ROSTANG (MCC)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Julie HERVE (MC) Lionel MARTIGNAT (Pr) Grégoire MIGNOT (MC)
Histologie et anatomie pathologique	Jérôme ABADIE (MC) Marie-Anne COLLE (Pr) Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie	Hervé SEBBAG (MC)
Biochimie alimentaire industrielle	Clément CATANEO (MC) Joëlle GRUA (MC) Laurent LE THUAUT (MC) Carole PROST (Pr) Thierry SEROT (Pr) Florence TEXIER (MC)
Microbiotech	Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC) Emmanuel JAFFRES (MC) Mathilde MOSSER (MC) Hervé PREVOST (Pr) Raouf TAREB (MCC)

Département **SAESP** Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique

Responsable : Alain CHAUVIN - Adjoint : Raphaël GUATTEO

Elevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Ségolène CALVEZ (MC) Christine FOURICHON (Pr) Aurélien MADOUASSE (MC) Lucile MARTIN (Pr) Nora NAVARRO-GONZALEZ (MCC)
Infectiologie	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (PR) Carole PEROZ (MC) Nadine RAVINET (MC) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr)
Médecine des animaux d'élevage	Sébastien ASSIE (MC) Catherine BELLOC (Pr) Isabelle BREYTON (MC) Christophe CHARTIER (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Anne RELUN (MC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Eric DROMIGNY (MC HDR) Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Catherine MAGRAS (Pr) Marie-France PILET (Pr) Fanny RENOIS-MEURENS (MC)

Département **DSC** Sciences cliniques

Responsable : Catherine IBISCH - Adjoint : Olivier GAUTHIER	
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MCC)
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Nora BOUHSINA (MCC) Nicolas CHOUIN (MC) Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (MC) Catherine IBISCH (MC) Françoise ROUX (Pr) Odile SENECAAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Djemil BENCHARIF (MC HDR) Lamia BRIAND (MC HDR) Jean-François BRUYAS (Pr) Francis FIENI (Pr)

Département **GPA** Génie des procédés alimentaires

Responsable : Olivier ROUAUD - Adjoint : Sébastien CURET-PLOQUIN

Lionel BOILLEREAUX (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Vanessa JURY (MC) Alain LEBAIL (Pr) Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)	Sébastien CURET PLOQUIN (MC) Dominique DELLA VALLE (MC HDR) Michel HAVET (Pr) Emilie KORBEL (MC) Catherine LOISEL (MC) Olivier ROUAUD (Pr) Eve-Anne NORWOOD (MCC)
---	---

Département **MSC** Management, statistiques et communication

Responsable : Michel SEMENOU - Adjointe : Pascal BARILLOT (MC)

Mathématiques, Statistiques,
Informatique

Véronique CARIOU (MC)
Philippe COURCOUX (MC)
El Mostafa QANNARI (Pr)
Michel SEMENOU (MC)
Chantal THORIN (Pr Ag.)
Evelyne VIGNEAU (Pr)

Economie, gestion

Pascal BARILLOT (MC)
Ibrahima BARRY (MCC)
Florence BEAUGRAND (MC)
Sibylle DUCHAINE (MC)
Sonia EL MAHJOUB (MC)
Jean-Marc FERRANDI (Pr)
Samira ROUSSELIERE (MC)

Langues et communication

Marc BRIDOU (PLPA)
David GUYLER (Ens. cont.)
Shaun MEEHAN (Ens. cont.)
Linda MORRIS (PCEA)
Ian NICHOLSON (Ens. Cont.)

Reproduction et droits d'auteurs

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénoms de l'auteur : Alexandre MUZARD
- Année de soutenance : 2021
- Titre de la thèse : **Prévalence et facteurs de risques de la piroplasmose équine – Etude prospective**
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes.
- Ecole de soutenance : Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation Nantes Atlantique
- Nombre de pages : 207 p.

Remerciements

A Monsieur **Michel BOURIN**,
Professeur à la faculté de médecine de Nantes.

Pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.
Sincères remerciements.

A Monsieur **Albert AGOULON**,
Maître de conférences à Oniris.

Pour m'avoir accompagné durant les deux années de ce projet,
pour son soutien, sa grande disponibilité, sa patience.
Pour toutes ses autres qualités qui ont rendu ce travail si intéressant,
et qui ont permis d'aboutir à ce qu'il est aujourd'hui.
Amitiés, et sincères remerciements.

A Madame **Anne COUROUCE**,
Professeur à Oniris.

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury de thèse.
Sincères remerciements.

A Madame **Laurence MALANDRIN**,
Chargée de recherche INRAE à Oniris.

Pour son immense disponibilité et son aide précieuse au cours de ces 2 années.
Amitiés, et sincères remerciement

A Madame **Maggy JOUGGLIN**, ainsi que l'ensemble de l'**UMR Bio EpAR** pour leur sympathie et leur aide précieuse durant l'ensemble de ce projet.

A l'**ensemble des propriétaires** ayant accepté de participer à ce projet.

A l'**ensemble de mes amis de l'école véto**, sans qui cette thèse aurait été terminée en 2020.

A l'ensemble de ma famille. A commencer par mes parents et mon frère, mais également à toi **Anaïs**, les personnes les plus exceptionnelles qui soient. Vous m'avez toujours soutenu dans mes choix, vous avez toujours été là pour m'aider à réaliser ce qui me tenait à cœur. C'est grâce à vous, et à tout ce que vous avez pu faire pour moi que j'en suis arrivé là aujourd'hui et que j'ai pu atteindre ce rêve. Pour votre soutien et votre amour sans faille dans l'ensemble des moments de ma vie, merci. Mais aussi à tous les autres membres de ma famille, grands-parents, oncles, tantes, cousins et cousines que j'ai la chance d'avoir dans ma vie. Ça n'aurait jamais été possible d'aller si loin sans vous tous.

Je vous aime.

A mes amis de prépa. Dimitri, Tristan, Val, Pierre, Flo, Gus, et tous les autres. Pour ces deux années que vous avez pu rendre si mémorables. Vous avez beau avoir choisi la mauvaise école, ceux qui ont fait vétos, je vous apprécie quand même et je sais qu'on se reverra bientôt.

A mes parrains, les Aérofist. Pour avoir rendu notre entrée en école véto inoubliable, vous êtes une grande bande de malades. A **Toudou, Dino, Jacques, Kek, Duracell, Pasta**, pour m'avoir montré qu'être parrain d'école ça ne s'arrête pas à la fin de la 5^e année. Pour tous ces « pestacles » de lendemain de soirée, pour tous ces bons (ou mauvais) plans dans lesquels vous pouvez nous emmener, pour les stages et avoir appris à travailler sous l'orage, pour les concours de lancer de chaussures, pour les futures saucisses de Georges, pour avoir redéfini le mot « inarrêtable », et surtout parce que vous n'avez aucun respect pour vous-même.

A **mon groupe de débiles préféré**, des gens pas « ouf-ouf » mais qu'on aime quand même...

A **Adèle**, à commencer par tous ces moments si drôles pendant le poulottage. Mais aussi pour le semestre (ou plutôt le mois..) de 4A canine, les retours de soirée pas toujours évidents, les Lenox interminables, les matchs de foot en post-soirée, la participation à l'élaboration des rouflaquettes de dos, et tant d'autres choses qui ont rythmées nos années à l'école et qui rythmeront les prochaines.

A **Perrine**, Terrine, La petite rigolote qui a de la moelle, parce qu'il fallait bien une vendéenne pour la diversité du groupe... Pour supporter des gens comme nous, il en faut de l'énergie, et pourtant tu es toujours là quand on a besoin de toi (#claviculecassée). Tu resteras la seule à qui je donne ma place en rempla d'été, et ça ce n'est pas n'importe quoi !

A **Elo**, la pomme pourrie du groupe, et une des rares ayant eu l'audace de rester à l'école avec moi une année de plus. C'est par ta faute, et grâce tes exploits footballistiques (face auxquels les adversaires étaient décontenancés) qu'a eu lieu l'invention des rouflaquettes de dos, et malgré tout tu restes dans le top de ces remerciements. Bien joué.

A **Madouce**, pour m'avoir embarqué dans l'aventure OHM, pour les roulades champêtres, pour toutes les conneries qu'on a pu faire et pour avoir été la seule à comprendre l'intérêt artistique de la « photo-ception ».

A **Marielle**, parce que tu es quasiment une co-poulotte pour moi. Merci pour tes fantastiques cascades au foot, tes fabuleux remix technos, et surtout pour t'être si bien occuper de mon cher Gaspard cet été !

A **Soso** et **Lolo**, pour immortaliser nos soirées par des milliers de photos, pour réclamer nos sandwiches manquant au Mac Do, pour être les personnes les plus « sans limite » que je connaisse et parce qu'il serait impossible d'imaginer ce groupe sans vous. Et aussi parce que c'est pratique d'avoir des potes qui travaillent en face de moi, pour prendre un café quand on s'ennuie.

A **Vovo**, mon pusty préféré, et le seul à apprécier Fatdog à sa juste valeur.

A **Keke** et **Sandrine**, pour nous avoir fait découvrir le rond-point des ruminants.

A **Marie**, parce que c'est courageux de te part de revenir à chaque fois au milieu de ce groupe d'animaux.

A **Sarah**. Prépare-toi, parce que maintenant on va pouvoir venir faire du ski chez toi !

A **Hugo** et **Maxence**, les petits poulots du groupe, mais au sacré potentiel.

A **Cyril**. Même nos familles se connaissent, on était destinés à se suivre comme ça. Sans toi, les travaux de groupe de TD, les mêmes, les bières, les lendemains de soirée difficiles et tout le reste, auraient été moins drôle. Hâte de te retrouver pour manger du « petit couillu ».

Aux **OHM**, Julien, Tétris, Madouce, Félix et Jonathan. Parce qu'entre la Nuit Veto, les inters et les bars de Nantes, ces concerts avec vous auront été quelques-uns des moments les plus fous de ma vie.

A **Milax**, le gros Scarito, mon éternel partenaire de billard, de mêmes et colloc de tente.

A **Juju**, ingé-son et concepteur de char comme on en fait peu.

A **Jo**, tonton Jojo et ses tutos, notre imitateur officiel d'AC/DC.

A **Féfé**, notre batteur de génie et premier accueillant de soirée (merci le Bocal).

A **Tétris**, l'homme aux mille talents, joueur d'échec, joueur de palet, bassiste, chef d'orchestre, Dr Pioupiou et même mouette à tes heures perdues.

A **Clément, Marius, Margot, Noé, et Elise** pour une année de 5A riche en apéros du vendredi.

A **Dhompsy, Urph, Nico, Inès, Juliette, Dany, Sylvain**, et tous les autres **Chibrogerbes** pour 4 années de poulottage toujours plus exceptionnelles, pour les vacances en Vendée des pus beaux, pour toutes les soirées passées, et les nouvelles à venir.

A **tous mes poulots et poulottes**. Je sais que ça aurait été bien de vous faire des remerciements pour chacun, mais maladroit comme je suis, c'est un coup à en oublier un ou deux... Vous avez rythmés nos poulottages pendant quatre ans et il en faut du courage pour supporter des gens comme nous ! Vous nous avez fait rêver, et je peux juste espérer que vous avez aimé ces moments autant que moi. Et comme a dit un de mes vieux con de parrain, n'oubliez pas que « être parrain d'école, ça ne s'arrête pas à vous pinter la gueule en vous lisant le bréviaire ».

A tous ces inclassables,

Au **Barthénon**, puis au **Negrithon** pour avoir été ma 2^e maison.

A feu **Gaspard** le soiffard et **Ivan** le toucan, pour le pass VIP à l'Ibiza Club.

A **Freddy**, pour être resté Face au jeu.

A **Matthieu Tapin** pour m'avoir ouvert les yeux.

A **Inna**, parce que mes parrains m'en voudront si je ne la cite pas.

A la **Cerv**, et au **Lenox**, pour tout ce que vous m'avez apportez (à savoir de la bière et du saucisson).

L'**Ibiza Club**, pour avoir rythmé mes dernières vacances.

A **Hector**, pour tout.

A tous les animaux qui ont rythmés ma vie ces dernières années, et qui rythmeront les prochaines.

Table des matières

Liste des annexes.....	24
Liste des figures	25
Liste des tableaux.....	27
Liste des abréviations.....	29
<u>INTRODUCTION.....</u>	30
<u>PREMIERE PARTIE : PRÉSENTATION DE LA PIROPLASMOSE ÉQUINE.....</u>	31
I. LES PARASITES	31
I.A. <i>THEILERIA EQUI</i>	31
I.A.1. Classification taxonomique.....	31
I.A.2. Cycle parasitaire et description morphologique.....	32
I.A.2.a. Chez l'hôte définitif : la tique.....	32
I.A.2.b. Chez l'hôte intermédiaire : le cheval	34
I.B. <i>BABESIA CABALLI</i>	37
I.B.1. Classification taxonomique	37
I.B.2. Cycle parasitaire et description morphologique	37
I.B.2.a. Chez l'hôte définitif : la tique.....	37
I.B.2.b. Chez l'hôte intermédiaire : le cheval.....	38
II. LES VECTEURS DE LA MALADIE	40
II.A. LES ESPECES VECTRICES ET LEUR CLASSIFICATION TAXONOMIQUE.....	40
II.B. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET CYCLE BIOLOGIQUE	42
II.B.1. Caractéristiques morphologiques des tiques dures	42
II.B.2. Diagnose de genre des tiques par leurs caractéristiques morphologiques	45
II.B.2.a. <i>Dermacentor</i>	45
II.B.2.b. <i>Rhipicephalus</i>	45
II.B.2.c. <i>Hyalomma</i>	46
II.B.3. Cycle biologique	46
II.B.3.a. Stases du cycle biologique des tiques <i>Ixodidae</i>	46
II.B.3.b. Variabilité dans le nombre d'hôtes	48
II.B.3.c. Variabilité dans le spectre d'hôtes	48

II.C. ÉCOLOGIE DES TIQUES VECTRICES DE LA PIROPLASMOSE EN FRANCE	49
II.C.1. Habitats des tiques vectrices de piroplasmose en France	49
II.C.1.a. Les tiques endophiles	49
II.C.1.b. Les tiques exophiles	49
II.C.2. Saisonnalité de l'activité des tiques vectrices de piroplasmose en France	50
II.C.2.a. Saisonnalité des tiques <i>Dermacentor</i>	50
II.C.2.b. Saisonnalité des tiques <i>Rhipicephalus</i>	50
II.C.2.c. Saisonnalité des tiques <i>Hyalomma</i>	51
II.D. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES TIQUES A PIROPLASMOSE EN FRANCE	51
II.D.1. Distribution des tiques <i>Dermacentor</i> sp.	52
II.D.2. Distribution des tiques <i>Rhipicephalus</i> sp.	53
II.D.3. Distribution des tiques <i>Hyalomma</i> sp.	54
II.D.4. Distribution géographique et activité anthropique.....	55
II.E. AUTRES MODES DE TRANSMISSION DE LA MALADIE.....	56
II.E.1. Transmission iatrogène	56
II.E.2. Transmission transplacentaire	56
II.E.2.a. Transmission transplacentaire de <i>Theileria equi</i>	56
II.E.2.b. Transmission transplacentaire de <i>Babesia caballi</i>	57
II.E.3. Transmission par la semence.....	58
III. ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA PIROPLASMOSE.....	58
III.A. DANS LE MONDE.....	58
III.A.1. Amérique	58
III.A.2. Europe	59
III.A.3. Afrique.....	59
III.A.4. Asie.....	60
III.A.5. Îles océaniques.....	60
III.B. EN FRANCE.....	61
III.B.1. Données épidémiologiques disponibles.....	61
III.B.2. Sous-réseau « Piro-like » du RESPE.....	64

IV. ÉTUDE CLINIQUE	65
IV.A. SIGNES CLINIQUES	65
IV.A.1. Incubation.....	65
IV.A.2. Forme clinique suraiguë.....	65
IV.A.3. Forme clinique aiguë.....	66
IV.A.4. Forme clinique chronique.....	67
IV.A.5. Forme inapparente.....	67
IV.A.6. Complications	68
IV.A.7. Diagnostic différentiel clinique.....	68
 IV.B. PATHOGENIE.....	 70
IV.B.1. Mécanismes pathologiques.....	70
IV.B.2. Mécanismes immunitaires	72
IV.B.2.a. Immunité innée	72
IV.B.2.b. Immunité adaptative	73
IV.B.2.c. Transfert passif d'immunité.....	74
 IV.C. LÉSIONS.....	 75
IV.C.1. Lésions macroscopiques.....	75
IV.C.2. Lésions histopathologiques	75
 IV.D. MODIFICATIONS HEMATO-BIOCHIMIQUES.....	 76
IV.D.1. Modifications hématologiques	76
IV.D.1.a. Modifications de la lignée érythrocytaire.....	76
IV.D.1.b. Modifications des lignées leucocytaires et thrombocytaires.....	76
IV.D.2. Modifications biochimiques.....	77
IV.D.2.a. Modifications de la bilirubine et des paramètres inflammatoires généraux	77
IV.D.2.b. Modifications des protéines sériques	77
IV.D.2.c. Modifications des paramètres hépatiques.....	78
IV.D.2.d. Modifications des paramètres rénaux.....	78
IV.D.2.e. Modifications des paramètres cardiaques et circulatoires.....	79
IV.D.2.f. Modification du profil en oligo-éléments	79
 V. DIAGNOSTIC DE CERTITUDE	 80
V.A. ANCIENNES METHODES.....	80
V.A.1. Transfusion de sang total.....	80
V.A.2. Utilisation de tiques vectrices.....	80

V.B. OBSERVATION DIRECTE DU PARASITE	81
V.B.1. Culture <i>in vitro</i>	81
V.B.2. Étalement sanguin.....	81
V.B.3. Immunofluorescence directe.....	82
V.C. METHODES SEROLOGIQUES.....	82
V.C.1. Fixation du complément	82
V.C.2. Immunofluorescence indirecte : IFI.....	84
V.C.3. ELISA	87
V.D. METHODES GENETIQUES.....	88
V.D.1. Hybridation <i>in situ</i>	88
V.D.2. PCR.....	89
V.D.3. LAMP	90
V.D.4. RPA	92
V.D. CONCLUSION SUR LES METHODES DIAGNOSTIQUES.....	93
VI. TRAITEMENT	94
VI.A. OBJECTIFS DU TRAITEMENT DE LA PIROPLASMOSE	94
VI.B. TRAITEMENT SPECIFIQUE DE LA PIROPLASMOSE	94
VI.B.1. Substances colorantes.....	94
VI.B.1.a. Bleu trypan	94
VI.B.1.b. Euflavine	95
VI.B.2. Dérivés de la naphthaline	95
VI.B.3. Autres antipaludéens	96
VI.B.4. Tétracyclines.....	96
VI.B.5. Diamidines et molécules apparentées.....	96
VI.B.5.a. Diacéturate de diminazène.....	96
VI.B.5.b. Iséthionate de phénamidine	97
VI.B.5.c. Amicarbalide.....	97
VI.B.5.d. Imidocarbe.....	97
VI.B.6. Molécules à l'essai	102
VI.C. TRAITEMENT ET GESTATION	104
VI.C.1. Traitement de la jument gestante.....	104
VI.C.2. Traitement du poulain nouveau-né.....	104

VI.D. TRAITEMENT DE SOUTIEN DES ANIMAUX MALADES	105
VII. PROPHYLAXIE	105
VII.A. PROPHYLAXIE MEDICALE	105
VII.A.1. Prophylaxie médicamenteuse.....	105
VII.A.2. Prophylaxie vaccinale	106
VII.B. PROPHYLAXIE SANITAIRE	106
VII.B.1. Lutte contre les vecteurs.....	106
VII.B.1.a. Lutte écologique	107
VII.B.1.b. Lutte chimique	107
VII.B.1.c. Lutte biologique	108
VII.B.1.d. Extraction manuelle des tiques.....	108
VII.B.2. Réglementation en pays indemne.....	108
CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE.....	109

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE PROSPECTIVE - DÉTERMINATION DE LA PRÉVALENCE ET DES FACTEURS DE RISQUE DE LA PIROPLASMOSE ÉQUINE EN FRANCE..... **110**

I. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	110
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	111
II.A. ANIMAUX INCLUS DANS L'ÉTUDE.....	111
II.A.1. Critères d'inclusion et d'exclusion	111
II.A.2. Nombre d'animaux et origine	112
II.B. VARIABLES EXPLICATIVES DE L'ÉTUDE.....	113
II.B.1. Entrée de l'animal dans l'étude.....	113
II.B.1.a. Attribution d'un numéro de dossier	113
II.B.1.b. Pochettes de documents	113
II.B.1.c. Méthode de recueil des données	113

II.B.2. Données recueillies pour l'étude.....	114
II.B.2.a. Données propres à l'animal.....	114
II.B.2.b. Historique médical de piroplasmose.....	115
II.B.2.c. Déplacements de l'animal.....	116
II.B.2.d. Environnement de vie de l'animal.....	117
II.B.2.e. Les tiques.....	119
II.B.2.f. Les compagnons.....	120
II.B.3. Recueil des données paracliniques.....	120
II.B.4. Recodage de certaines variables.....	121
II.B.4.a. Race, robe et lieu de vie.....	121
II.B.4.b. Autres animaux sauvages observés.....	122
 II.C. ANALYSE MOLECULAIRE DES ECHANTILLONS SANGUINS.....	 122
II.C.1. Récupération et préparation des échantillons sanguins.....	122
II.C.2. Recherche de l'ADN parasitaire par PCR dans les échantillons sanguins.....	123
 II.D. ANALYSE STATISTIQUE.....	 124
II.D.1. Analyse statistique univariée.....	124
II.D.1.a. Analyse statistique univariée des variables qualitatives.....	124
II.D.1.b. Analyse statistique univariée des variables quantitatives.....	124
II.D.2. Analyse statistique multivariée.....	124
 III. RESULTATS.....	 125
III.A. RESULTATS DU QUESTIONNAIRE.....	125
III.A.1. Répartition géographique des chevaux de l'étude.....	125
III.A.2. Description des chevaux.....	127
III.A.3. Description des antécédents de piroplasmose.....	129
III.A.3.a. Technique diagnostique utilisée.....	129
III.A.3.b. Parasite incriminé.....	129
III.A.3.c. Traitement mis en place.....	130
III.A.4. Description des environnements de vie.....	130
III.A.4.a. Description du pâturage.....	130
III.A.4.b. Description des interactions avec la faune sauvage.....	134
III.A.4.c. Description des relations avec les tiques.....	134
III.A.4.d. Description des relations avec d'autres compagnons de pâture.....	135
III.A.4.e. Description des relations avec les animaux domestiques.....	135

III.B. RESULTATS DES ANALYSES MOLECULAIRES.....	135
III.B.1. Résultats à l'échelle de la France.....	136
III.B.2. Résultats par école	136
III.B.2.a. Nantes	136
III.B.2.b. Maison-Alfort	136
III.B.2.c. Lyon	136
III.B.2.d. Toulouse	137
III.C. APPROCHE STATISTIQUE ET MODELISATION DU RISQUE	137
III.C.1. Analyse univariée à l'échelle de la France	138
III.C.1.a. Données propres aux chevaux	138
III.C.1.b. Antécédents de piroplasmose	141
III.C.1.c. Temps de pâturage	141
III.C.1.d. Caractéristiques des pâtures.....	143
III.C.1.e. Relations avec la faune sauvage	145
III.C.1.f. Observation de tiques	145
III.C.1.g. Compagnons de pâture	146
III.C.1.h. Relations avec les animaux domestiques.....	147
III.C.2. Analyse univariée à l'échelle de l'école de Nantes	148
III.C.3. Etude des corrélations entre variables	150
III.C.3.a. Choix des variables d'intérêt	150
III.C.3.b. Etude des corrélations entre variables	152
III.C.4. Analyse multivariée	153
III.C.4.a. Création d'un modèle explicatif de la positivité des chevaux à <i>Theileria equi</i>	153
III.C.4.b. Essais d'autres modèles	156
III.C.4.c. Conclusion sur l'analyse multivariée.....	157
III.D. APPROCHE DESCRIPTIVE DE LA POSITIVITE A <i>BABESIA CABALLI</i>	157
III.D.1. Description des chevaux positifs à <i>Babesia caballi</i>	157
III.D.2. Antécédents de piroplasmose	157
III.D.3. Description des environnements de vie	158
III.D.4. Description des relations entretenues avec les tiques.....	158
III.D.5. Description des compagnons de pâture	159
III.D.6. Description des relations avec les animaux de compagnie	159
III.E. APPROCHE STATISTIQUE DES RESULTATS D'ANALYSE HEMATO-BIOCHIMIQUES	159
III.E.1. Cadre de l'analyse.....	159
III.E.2. Présentation de la population d'étude et des variables analysées	160
III.E.2.a. Population d'étude	160
III.E.2.b. Paramètres hématologiques mesurés	160
III.E.2.c. Paramètres biochimiques mesurés	160

III.E.3. Présentation des résultats	160
III.E.3.a. Résultats de l'analyse hématologique	160
III.E.3.b. Résultats de l'analyse biochimique.....	161
IV. DISCUSSION.....	162
IV.A. RECRUTEMENT DES PARTICIPANTS A L'ETUDE.....	162
IV.B. CONSTRUCTION DU QUESTIONNAIRE.....	163
IV.C. RESULTATS DES ANALYSES PCR	163
IV.D. REPOSES AU QUESTIONNAIRE	164
IV.E. DEMARCHE STATISTIQUE	166
IV.E.1. Analyse univariée	166
IV.E.2. Etude des corrélations entre variables	167
IV.E.3. Analyse multivariée	167
IV.F. FACTEURS DE RISQUE MIS EN EVIDENCE.....	168
IV.F.1. Pour <i>Theileria equi</i>	168
IV.F.2. Pour <i>Babesia caballi</i>	170
IV.G. ANALYSES HEMATO-BIOCHIMIQUES	170
<u>CONCLUSION.....</u>	<u>172</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>174</u>
<u>ANNEXES.....</u>	<u>186</u>

Liste des annexes

Annexe 1 : Lettre d'information sur le projet.....	186
Annexe 2 : Lettre de consentement éclairé.....	187
Annexe 3 : Questionnaire donné aux participants.....	188
Annexe 4 : Protocole de préparation des échantillons sanguins	193
Annexe 5 : Protocole d'extraction d'ADN	195
Annexe 6 : Protocole de PCR nichée pour la détection des agents de piroplasmose.....	197
Annexe 7 : Résumé des données du questionnaire après codage.....	202
Annexe 8 : Matrice de corrélation des variables d'intérêt.....	204
Annexe 9 : Résumé des réponses au questionnaire des 10 individus positifs à <i>Babesia caballi</i>	205

Liste des figures

Figure 1 : Microgamonte (A) et microgamète (B) de <i>Theileria equi</i> observés au microscope optique après coloration Giemsa. Grossissement x1500	33
Figure 2 : Macrogamète (A) au grossissement x1500 et zygote (B) au grossissement x1700 observés au microscope optique après coloration Giemsa	33
Figure 3 : Sporoblaste de <i>Theileria equi</i> au cours de la sporogonie (A) au grossissement x2000 et après libération des sporozoïtes (B) au grossissement x1800 observé au microscope optique après coloration MGG ..	34
Figure 4 : Macroschizonte (1) et microschantzonte (2) de <i>Theileria equi</i> vus au microscope optique après coloration MGG. Grossissement x2500	35
Figure 5 : Forme intra-érythrocytaire « en croix de Malte » de <i>Theileria equi</i> vue au microscope optique après coloration Diff Quick	35
Figure 6 : Cycle biologique de <i>Theileria equi</i>	36
Figure 7 : Développement intra-érythrocytaire de <i>Babesia caballi</i> dans les érythrocytes de cheval, observé en microscopie optique au grossissement x2000 après coloration Giemsa	38
Figure 8 : Cycle biologique de <i>Babesia caballi</i>	39
Figure 9 : Schéma du capitulum (ou gnathosome) d'une tique <i>Dermacentor marginatus</i>	43
Figure 10 : Schéma de l'anatomie d'une tique mâle <i>Dermacentor marginatus</i>	44
Figure 11 : Schéma de l'anatomie d'une tique femelle <i>Dermacentor marginatus</i>	44
Figure 12 : Photo de tiques <i>Dermacentor reticulatus</i> (gauche) et <i>Dermacentor marginatus</i> (droite)	45
Figure 13 : Photo de tiques <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (gauche) et <i>Rhipicephalus bursa</i> (droite)	46
Figure 14 : Photo d'une tique <i>Hyalomma marginatum</i>	46
Figures 15 (A) : Distribution géographique de <i>Dermacentor reticulatus</i> en Mai 2020 en France métropolitaine.	52
Figure 16 (B) : Distribution géographique de <i>Dermacentor marginatus</i> en France métropolitaine	52
Figure 17 : Distribution de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (A) en Mai 2020 et <i>Rhipicephalus bursa</i> (B) en Janvier 2019 en France métropolitaine	53
Figure 18 : Distribution géographique de <i>Hyalomma lusitanicum</i> (A) et <i>Hyalomma marginatum</i> (B) en Mai 2020 en France métropolitaine	54
Figure 19 : Distribution géographique globale de la piroplasmose équine dans le monde.....	61
Figure 20 : Répartition géographique de la séroprévalence à <i>Babesia caballi</i> en France sur les périodes 1974-1989 (A), 1981-1996 (B) et 1997-2005 (C)	62
Figure 21 : Répartition géographique de la séroprévalence à <i>Theileria equi</i> en France sur les périodes 1974-1989 (A), 1981-1996 (B) et 1997-2005 (C).....	63

Figure 22 : Physiopathologie de l'anémie hémolytique lors de piroplasmose équine.....	71
Figure 23 : Profil électrophorétique des protéines sériques de 3 chevaux	78
Figure 24 : Principe général du test de fixation du complément	83
Figure 25 : Principe général du test d'immunofluorescence indirecte	85
Figure 26 : Observation microscopique d'une réaction positive au test d'immunofluorescence indirecte	86
Figure 27 : Principe général de la technique d'ELISA par compétition.....	87
Figure 28 : Principe général de la PCR.....	90
Figure 29 : Principe général de la technique LAMP.....	91
Figure 30 : Principe général de la technique RPA.....	92
Figure 31 : Structure chimique de l'imidocarbe.....	98
Figure 32 : Concentration plasmatique en imidocarbe dipropionate au cours du temps après une injection intramusculaire de 2,4 mg/kg	101
Figure 33 : Répartition des chevaux de l'étude selon leur école d'origine	112
Figure 34 : Répartition géographique de la population d'étude.....	126
Figure 35 : Distribution des âges de la population d'étude (gauche) et répartition des individus selon leur sexe (droite).....	127
Figure 36 : Répartition des individus de l'étude selon leur race (gauche) et leur robe (droite).....	128
Figure 37 : Répartition des individus de l'étude selon leur département d'origine	128
Figure 38 : Répartition des individus en fonction du temps passé au pré chaque jour	131
Figure 39 : Répartition des individus en fonction du type de pâtures fréquentées	132
Figure 40 : Répartition des individus en fonction de la hauteur d'herbe des pâtures fréquentées (A) et de l'hétérogénéité des pâtures (B).....	132
Figure 41 : Répartition des individus en fonction du type de bordure.....	133
Figure 42 : Répartition des individus en fonction de l'humidité des pâtures qu'ils fréquentent	133
Figure 43 : Taux de positivité à <i>Theileria equi</i> et <i>Babesia caballi</i>	137
Figure 44 : Vérification graphique de l'adéquation du modèle 1	155

Liste des tableaux

Tableau I : Classification taxonomique actuelle de <i>Theileria equi</i>	32
Tableau II : Classification taxonomique actuelle de <i>Babesia caballi</i>	37
Tableau III : Espèces de tiques ayant un rôle suspecté ou confirmé dans la transmission de <i>Babesia caballi</i> ou <i>Theileria equi</i>	42
Tableau IV : Diagnostic différentiel des affections « Piro-like ».....	69
Tableau V : Interprétation des résultat du test de fixation du complément	84
Tableau VI : Posologie du CARBESIA® pour le traitement de <i>Babesia caballi</i>	100
Tableau VII : Posologie du CARBESIA® pour le traitement de <i>Theileria equi</i>	100
Tableau VIII : Substances anti-piroplasmes équins testées in vitro entre 1990 et 2019.....	103
Tableau IX : Lien entre utilisation du cheval, déplacements à risque et positivité à <i>Theileria equi</i>	138
Tableau X : Lien entre âge, taille et positivité à <i>Theileria equi</i>	139
Tableau XI : Lien entre sexe, race, robe, département et école d'origine et positivité à <i>Theileria equi</i>	139
Tableau XII : Lien entre les départements 31 et 56 et la positivité à <i>Theileria equi</i>	140
Tableau XIII : Répartition des chevaux ONC entre Lyon et les autres écoles	141
Tableau XIV : Lien entre positivité antérieure à la piroplasmose et positivité aujourd'hui à <i>Theileria equi</i>	141
Tableau XV : Lien entre temps de pâturage à chaque saison et positivité à <i>Theileria equi</i> (quantitatif)	142
Tableau XVI : Lien entre temps de pâturage à chaque saison et positivité à <i>Theileria equi</i> (qualitatif)	142
Tableau XVII : Lien entre les caractéristiques des pâtures et positivité à <i>Theileria equi</i>	143
Tableau XVIII : Lien entre observation d'animaux sauvages dans les pâtures et positivité à <i>Theileria equi</i>	145
Tableau XIX : Lien entre observation de tiques et positivité à <i>Theileria equi</i>	145
Tableau XX : Lien entre le fait de pâturer en groupe à chaque saison et la positivité à <i>Theileria equi</i>	146
Tableau XXI : Lien entre la fréquentation d'animaux domestiques, de leurs tiques et la positivité à <i>Theileria equi</i>	147
Tableau XXII : Liens entre les variables influentes (p-values significatives ou tendances) et la positivité à <i>Theileria equi</i> à l'échelle de l'école de Nantes.....	149
Tableau XXIII : Choix des variables retenues pour la suite de notre étude	151
Tableau XXIV : Résultats obtenus après application du premier modèle à notre population d'étude	154
Tableau XXV : Estimation des individus mal classés par le modèle testé	156

Tableau XXVI : Paramètres hématologiques ayant montré un lien statistique avec la positivité à <i>Theileria equi</i>	161
Tableau XXVII : Paramètres biochimiques ayant montré un lien statistique (significatif ou tendance) avec la positivité à <i>Theileria equi</i>	161
Tableau XXVIII : Evolution de la positivité à <i>Theileria equi</i> et <i>Babesia caballi</i> à l'échelle de la France	164

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AMM : Autorisation de mise sur le marché
ASAT : Aspartate amino transférases
CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée
CK : Créatinine kinases
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
GGT : Gamma glutamyl transférases
IC₉₅ : Intervalle de confiance à 95%
IFI : Immunofluorescence indirecte
Ig : Immunoglobuline
IGN : Institut national de l'information géographique et forestière
LAMP : Loop-mediated isothermal amplification
PAL : Phosphatases alcalines
PCR : Polymerase chain reaction
RPA : Recombinase polymerase amplification
TCMH : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
USDA : United States Department of Agriculture
VGM : Volume globulaire moyen

Introduction

La piroplasmose équine est une hémoparasitose causée par *Babesia caballi* et *Theileria equi*. Ces deux parasites sanguins présents chez les Equidés sont proches des *Plasmodium* sp. et présents chez les différentes espèces du genre *Equus* (chevaux, ânes et zèbres) et leurs hybrides (mule et mulet).

Ils sont transmis par de nombreuses espèces de tiques, faisant de cette parasitose à transmission vectorielle l'une des plus répandues au monde. En effet, il est considéré que près de 90% des chevaux vivent dans une région endémique de piroplasmose équine. Si tous les continents du monde sont touchés par cette maladie, sa distribution ainsi que sa saisonnalité peuvent se superposer à celles de ses tiques vectrices. En France, les tiques appartenant aux genres *Dermacentor*, *Rhipicephalus* et *Hyalomma* sont responsables de sa transmission.

La piroplasmose est une maladie aux signes peu spécifiques. Le tableau clinique se résumera le plus souvent à un cheval faible, ictérique, présentant un syndrome d'anémie hémolytique, et une pigmenturie parfois spectaculaire. Les formes cliniquement inapparentes sont elles aussi fréquentes.

Le diagnostic devra englober les informations cliniques et épidémiologiques disponibles. Si un diagnostic de certitude est souhaité, la méthode choisie devra l'être en fonction de la situation. En effet, plusieurs méthodes diagnostiques existent : des méthodes moléculaires très spécifiques et très sensibles mettant en évidence l'ADN du parasite, qu'il soit vivant ou non (PCR, LAMP), des méthodes sérologiques montrant la réaction immunitaire de l'animal après quelques jours à semaines post-infection (ELISA, IFI, etc.) et ayant une valeur réglementaire lors d'échanges internationaux.

Le traitement sera à la fois spécifique par l'utilisation d'un piroplasmicide, l'imidocarbe dipropionate, et symptomatique par la gestion des signes cliniques : réhydratation, transfusion ou encore thérapie anti-inflammatoire.

La prophylaxie de la piroplasmose équine passera presque exclusivement par la lutte contre les vecteurs (molécules acaricides, lutte écologique) et les exigences réglementaires des pays indemnes (importation après test négatif, déclaration obligatoire des cas autochtones, isolement ou abattage des cas déclarés, etc.).

PREMIERE PARTIE : PRÉSENTATION DE LA PIROPLASMOSE ÉQUINE

I. Les parasites

Jusqu'au début du XXe siècle, la piroplasmose équine était encore désignée de diverses manières : « biliary fever », « bilious fever », « anthrax fever » ou encore « equine malaria » [172]. C'est en 1901 que Laveran [106] décrit pour la première fois *Theileria equi*. Sa ressemblance morphologique avec d'autres hémoparasites déjà décrits dans d'autres espèces, en particulier les bovins, amènera Laveran à le nommer *Piroplasma equi*. En 1904, Koch met en évidence l'existence de deux parasites, qu'il suppose alors à l'origine de deux maladies distinctes [98]. C'est en 1912 que Nuttal et Strickland les désignent sous les dénominations de *Babesia caballi* et *Babesia equi* [128].

I.A. *Theileria equi*

I.A.1. Classification taxonomique

Nommé en 1912 *Babesia equi* de par ses caractéristiques morphologiques, biologiques et épidémiologiques, il est reclassé au sein du genre *Theileria*, et renommé *Theileria equi* en 1998 [118]. Plusieurs arguments justifient cette nouvelle classification :

- Taille inférieure aux autres *Babesia* sp. [118],
- Cycle biologique différent, avec une phase pré-érythrocytaire [118] [121],
- Absence de transmission transovarienne du parasite chez la tique vectrice, une caractéristique biologique propre aux *Babesia* sensu stricto [171] [189],
- Études moléculaires et génétiques [37] [90].

Tableau I : Classification taxonomique actuelle de *Theileria equi*. [180]

Règne	<i>Protista</i>
Sous-règne	<i>Protozoa</i>
Phylum	<i>Apicomplexa</i>
Classe	<i>Haematozoa (Aconoidasida)</i>
Ordre	<i>Piroplasmida</i>
Famille	<i>Theileriidae</i>
Genre	<i>Theileria</i>

I.A.2. Cycle parasitaire et description morphologique

I.A.2.a. Chez l'hôte définitif : la tique [118] [188] [189]

Hôte définitif du parasite, la tique sera l'individu au sein duquel *T. equi* effectuera :

- La gamogonie : phase de reproduction sexuée à l'origine du zygote,
- La sporogonie : phase de formation des sporozoïtes, forme infectante du cheval.

Après le repas de sang, les mérozoïtes ainsi que les érythrocytes ingérés sont détruits dans le tube digestif de la tique. Seuls les gamétocytes, formes précurseurs des gamètes, perdurent et poursuivent le cycle du parasite. Après 48-72 h, ces gamétocytes vont commencer à croître pour atteindre 3-4 μm , et devenir multi-nucléés. Des protrusions cytoplasmiques filiformes vont ensuite apparaître. Cette cellule multinucléée mesurant 5-6 μm , avec des protrusions cytoplasmiques filiformes, sera le microgamonte, également appelé corps rayonné (cf. Figure 1-A). Celui-ci va se diviser en plusieurs cellules mononucléées de 3-5 μm , avec 2 à 6 extensions cytoplasmiques filiformes : les microgamètes (cf. Figure 1-B). Simultanément, d'autres gamétocytes vont quant à eux rester dans leur état initial, sous forme annulaire de 1,5-2,5 μm . Ce sont les macrogamètes (cf. Figure 2-A).

Entre 4 et 6 jours après le repas de sang, microgamète et macrogamète vont fusionner pour donner naissance à un zygote (cf. Figure 2-B) qui colonisera les cellules intestinales de la tique. Le zygote formé va croître et donner un kinète de 11-18 μm de longueur. Celui-ci persistera dans les cellules intestinales de la tique, ainsi que dans l'hémolymphe, le temps du

prochain repas de sang et de la métamorphose. C'est la transmission, ou persistance, transstadiale. [189]

Après mue de la tique, il y a migration et pénétration des acini salivaires de type III de la tique par des kinètes, où le cycle se poursuivra. Il y aura tout d'abord la formation de sporontes, qui donneront par la suite des sporoblastes, cellules multinucléées de 6-15 μm (cf. Figures 3-A et 3-B). Ces sporoblastes seront à l'origine des sporozoïtes, cellules mononucléées de 3-4 μm . [188]

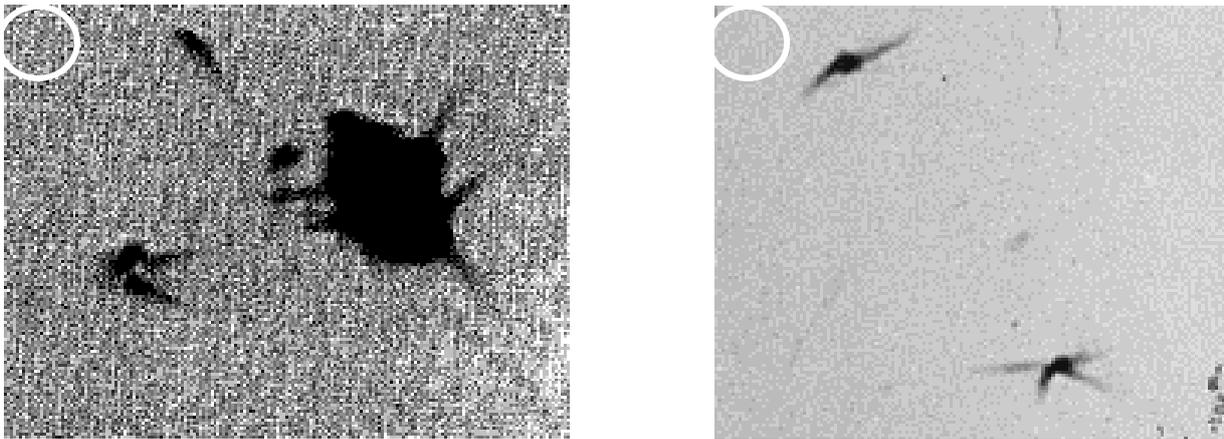


Figure 1 : Microgamonte (A) et microgamète (B) de *Theileria equi* observés au microscope optique après coloration Giemsa. Grossissement x1500 [118] [189]

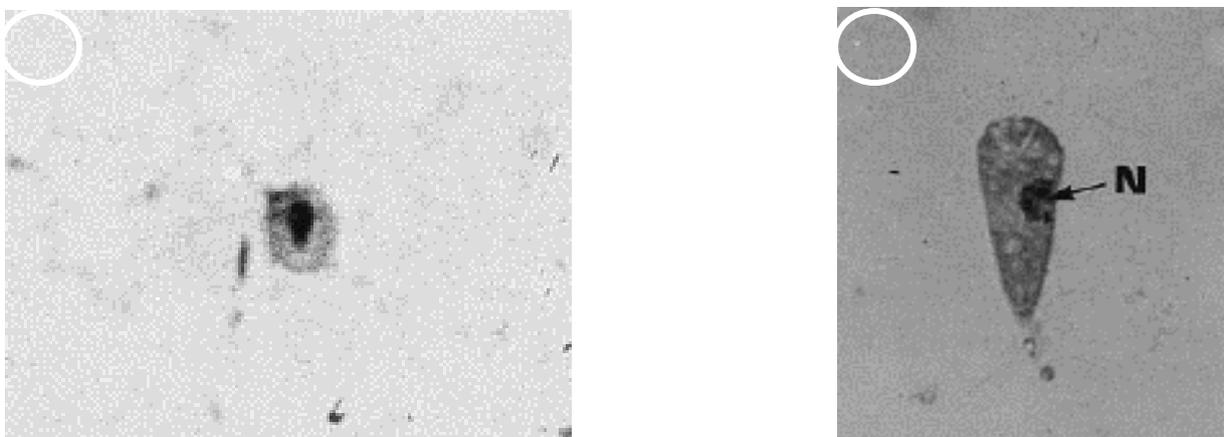


Figure 2 : Macrogamète (A) au grossissement x1500 et zygote (B) au grossissement x1700 observés au microscope optique après coloration Giemsa. [118]

N=Noyau

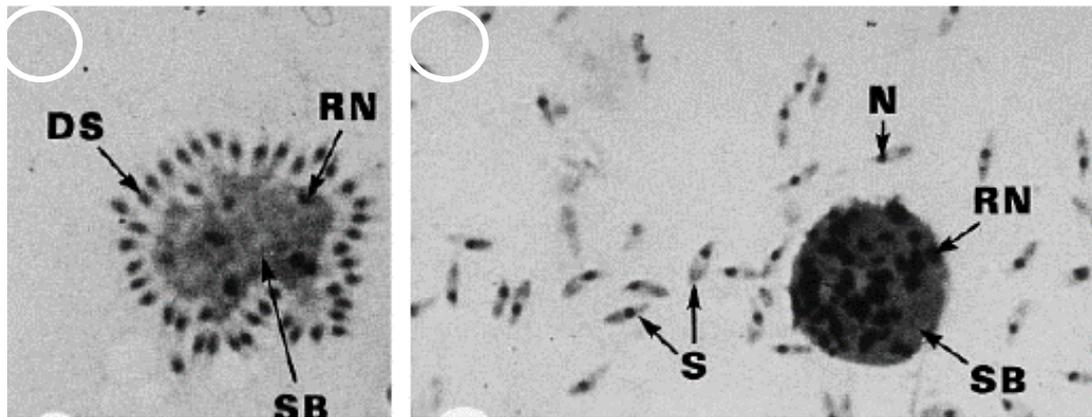


Figure 3 : Sporoblaste de *Theileria equi* au cours de la sporogonie (A) au grossissement x2000 et après libération des sporozoïtes (B) au grossissement x1800 observé au microscope optique après coloration MGG. [118]

DS = Sporozoïte en développement ; N = Noyau du sporozoïte ;
RN = noyau résiduel ; S = Sporozoïtes ; SB = Sporoblaste ;

I.A.2.b. Chez l'hôte intermédiaire : le cheval [118] [121] [146] [184]

Chez le cheval, hôte intermédiaire de *Theileria equi*, aura lieu une autre phase de multiplication asexuée, appelée schizogonie ou mérogonie. C'est lors d'un repas de sang que la tique infectera l'équidé. Rapidement, les sporozoïtes infecteront les cellules mononuclées du sang périphérique du cheval. Si pendant longtemps, il était admis que la phase pré-érythrocytaire de *Theileria equi* se déroulait au sein des lymphocytes du cheval, une étude de 2013 a montré que les autres cellules mononuclées du sang périphérique, à savoir les monocytes et macrophages, avaient un rôle dans l'infection [146]. En effet, bien que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages peuvent tous être infectés *in vitro*, cette étude démontre que des chevaux immunodéprimés en lymphocytes peuvent développer la maladie. Chez ces animaux, des parasites sont retrouvés au stade intra-érythrocytaire, ce qui signifie que même sans lymphocytes, le cycle parasitaire peut se poursuivre [146]. Après pénétration d'une cellule réceptive, la formation de macroschizontes (phase de multiplication nucléaire, cf. Figure 4-1) et de microschantosites (phase finale de formation des mérozoïtes, cf. Figure 4-2) donnera naissance aux mérozoïtes, forme infectante des érythrocytes. Jusqu'à 200 mérozoïtes de 1,5-2 μm de diamètre peuvent être formés par cellule infectée.

Les mérozoïtes formés vont infecter les érythrocytes de l'hôte, et commencer à se diviser au sein de ceux-ci. C'est suite à ces divisions qu'il sera possible d'observer les différentes formes caractéristiques de *Theileria equi* : ronde, ovale, rectiligne, punctiforme, piriforme ou encore en « croix de Malte », correspondant à l'arrangement de quatre mérozoïtes (cf. Figure 5). Cette dernière est la forme la plus caractéristique, bien qu'elle soit rarement observée.

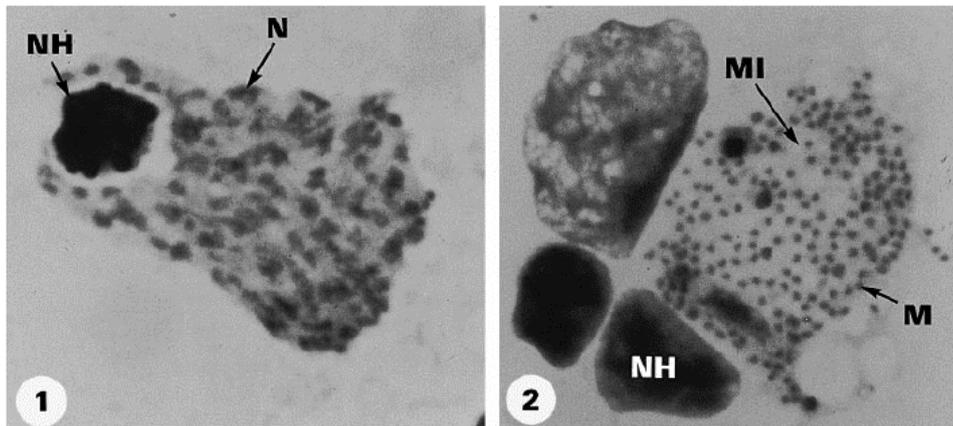


Figure 4 : Macroschizonte (1) et microschorizonte (2) de *Theileria equi* vus au microscope optique après coloration MGG. Grossissement x2500 [118]

M = Mérozoïte ; MI = Microschorizonte ;
 N = Noyau ; NH = Noyau de la cellule hôte

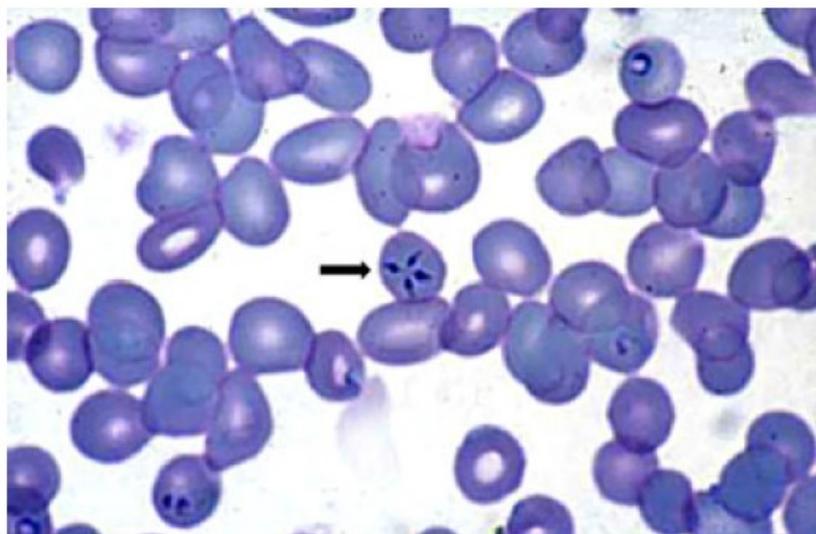


Figure 5 : Forme intra-érythrocytaire « en croix de Malte » de *Theileria equi* vue au microscope optique après coloration Diff Quick. [182]

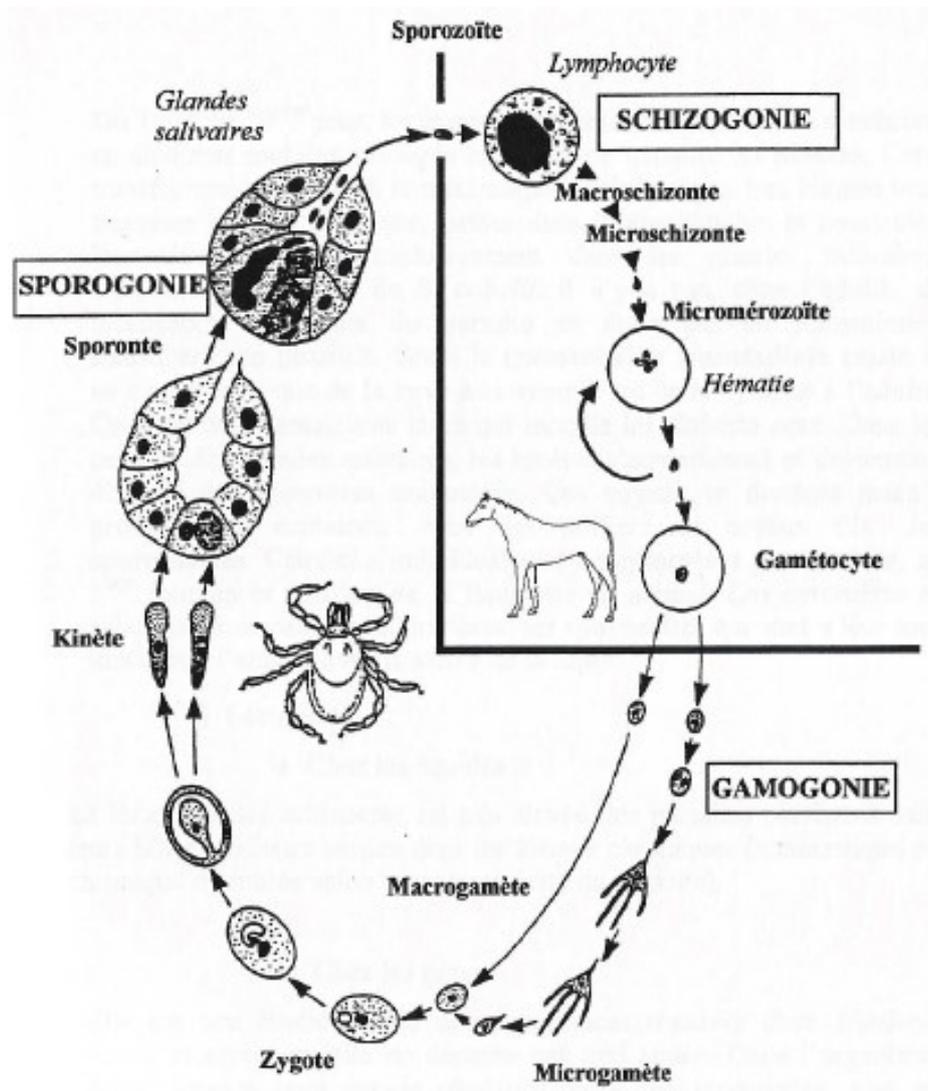


Figure 6 : Cycle biologique de *Theileria equi*. [119]

I.B. *Babesia caballi*

I.B.1. Classification taxonomique

C'est suite aux études de Koch en 1905, confirmées par Nuttal en 1910, que *Piroplasma* (syn *Babesia*) *caballi* est décrit distinctement de *Piroplasma* (syn *Babesia*) *equi* [128]. Les caractéristiques morphologiques et biologiques de ce parasite, correspondant à ceux décrit par Babès en 1888, font qu'il sera classé dans le genre *Babesia*.

Tableau II : Classification taxonomique actuelle de *Babesia caballi*. [180]

Règne	<i>Protista</i>
Sous-règne	<i>Protozoa</i>
Phylum	<i>Apicomplexa</i>
Classe	<i>Haematozoa</i> (syn <i>Aconoidasida</i>)
Ordre	<i>Piroplasmida</i>
Famille	<i>Babesiidae</i>
Genre	<i>Babesia</i>

I.B.2. Cycle parasitaire et description morphologique

I.B.2.a. Chez l'hôte définitif : la tique [49] [103] [171]

De manière similaire à *Theileria equi*, c'est lors du repas de sang que le parasite sera ingéré par la tique, hôte définitif de *Babesia caballi*. Elle sera l'hôte de la gamogonie et de la sporogonie. Les mérozoïtes ainsi que les érythrocytes ingérés seront détruits dans le tube digestif de la tique, et seuls les gamontes persisteront. Après la gamogonie, les corps rayonnés, ou gamètes, fusionneront pour donner naissance à un zygote mobile, ou ookinète. Celui-ci pénétrera diverses cellules de la tique (ovocyte, fibre musculaire, cellule hémolympatique, ...), dans lesquelles il se multipliera. Cette multiplication asexuée, ou sporogonie, donnera naissance à de nombreux sporokinètes mobiles, qui à leur tour infecteront d'autres cellules de la tique.

Certains sporokinètes continueront les cycles de multiplication, alors que d'autres entreront dans une phase de quiescence. Les sporokinètes quiescents contenus dans les ovocytes de la tique seront transmis à l'individu de génération n+1 : c'est la transmission transovarienne, caractéristique des *Babesia sensu stricto*. Chez ce nouvel individu, alors que certains sporokinètes persisteront à l'état quiescent, d'autres termineront leur maturation dans les acini salivaires. Ils seront alors transmis à un équidé lors d'un repas de sang sous forme de sporozoïte, de manière identique à *Theileria equi*. Les sporokinètes restés quiescents persisteront par transmission transstadiale. Ainsi, larves, nymphes et adultes des générations suivantes pourront transmettre le parasite.

I.B.2.b. Chez l'hôte intermédiaire : le cheval [53] [92] [167]

Après le repas de sang infectant, les sporozoïtes transmis vont directement infecter les érythrocytes de l'équidé. Ils vont alors rapidement grossir et s'arrondir pour former des trophozoïtes. Ces trophozoïtes vont se diviser en mérozoïtes par fission binaire, prenant les formes caractéristiques suivantes, observables en microscopie optique : bigéminée, sphérique, annulaire, pléomorphique, etc (cf. Figure 7). L'érythrocyte sera alors détruit, libérant les mérozoïtes qui pourront infecter une nouvelle cellule et perpétuer le cycle.

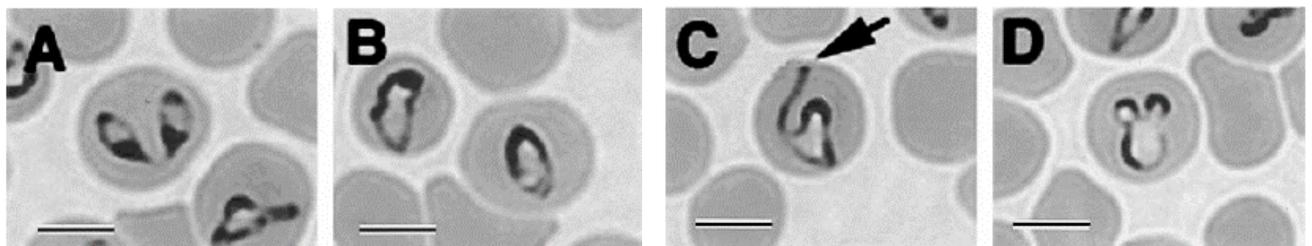


Figure 7 : Développement intra-érythrocytaire de *Babesia caballi* dans les érythrocytes de cheval, observé en microscopie optique au grossissement x2000 après coloration Giemsa. [92]

- A : forme bigéminée
- B : forme sphérique
- C : forme pléomorphique
- D : forme en début de division cellulaire

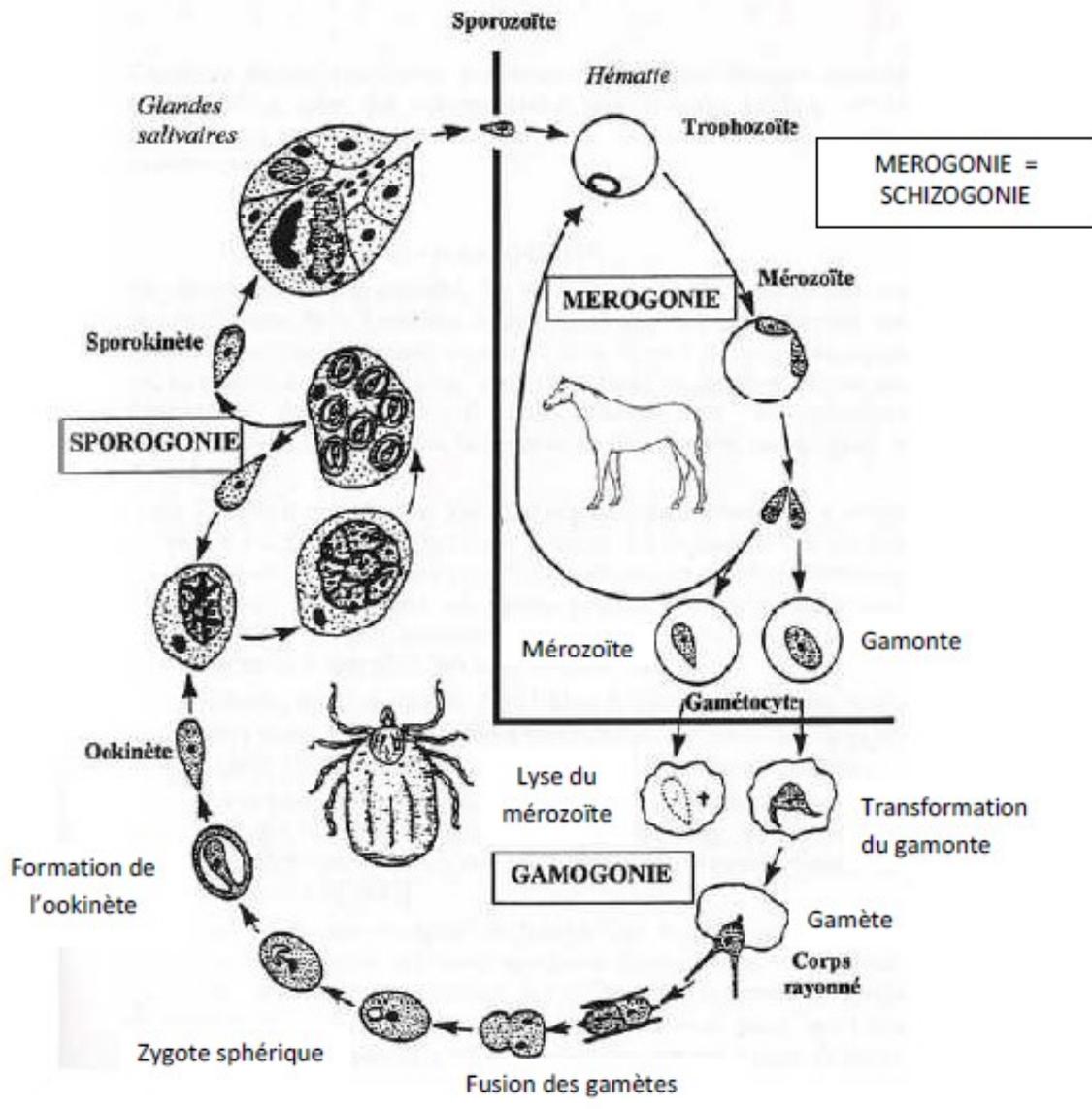


Figure 8 : Cycle biologique de *Babesia caballi*. [119]

II. Les vecteurs de la maladie

II.A. Les espèces vectrices et leur classification taxonomique

De nombreuses espèces de tiques, appartenant à plusieurs genres, ont été mises en évidence comme capables de transmettre les parasites responsables de piroplasmose. Toutes appartiennent à la famille des tiques dures, les *Ixodidae*. Au fur et à mesure des années et des études, le nombre d'espèces dont le rôle dans la transmission de la maladie a été confirmé ou suspecté a augmenté. Si historiquement, les genres *Rhipicephalus*, *Dermacentor* et *Hyalomma* sont ceux impliqués dans la transmission des parasites [49] [188], d'autres genres ont été plus récemment suspectés ou confirmés comme ayant un rôle : *Haemaphysalis*, *Amblyomma* [133] [161] [188].

Tableau III : Classification taxonomique des tiques impliquées dans la transmission de la piroplasmose équine. [16] [25]

Règne	<i>Animalia</i>
Phylum	<i>Arthropoda</i>
Classe	<i>Arachnida</i>
Sous-classe	<i>Acari</i>
Super-ordre	<i>Anactinotrichidea</i> (= parasitoforme)
Ordre	<i>Ixodida</i>
Famille	<i>Ixodidae</i>
Genre	<i>Amblyomma</i> <i>Dermacentor</i> <i>Haemaphysalis</i> <i>Hyalomma</i> <i>Rhipicephalus</i>

Ce sont aujourd'hui une trentaine d'espèces de tiques qui sont considérées comme jouant un rôle, potentiel ou confirmé, dans la transmission de la maladie. Ce nombre n'est pas fixé, et peut varier en fonction de divers paramètres. En effet, environ 700 espèces de tiques dures *Ixodidae* sont décrites de par le monde [72], ainsi le nombre de vecteurs impliqués dans la transmission de la piroplasmose équine peut évoluer soit par la mise en évidence de nouvelles espèces de tiques, soit par l'objectivation du rôle de transmission d'espèces déjà connues [42] [161].

Dermacentor marginatus est une espèce de tique d'une importance majeure en France. C'est aussi une espèce dont la taxonomie est discutée. Considérée comme une espèce à part entière par certains auteurs, elle est parfois considérée synonyme de *Dermacentor reticulatus*. De même, *Dermacentor niveus* est parfois considéré comme conspécifique de *D. marginatus* [72] [82] [161].

Les tiques du genre *Hyalomma* sp. ont également été l'objet de discussions et modifications taxonomiques. *Hyalomma excavatum* a longtemps été considérée comme une sous-espèce de *Hya. anatolicum*. *Hyalomma detritum* est conspécifique de *Hya. scupense*. De même, *Hya. turanicum* était autrefois classée comme sous-espèce de *Hya. marginatum* [161].

Il a été montré expérimentalement en 2007 que les tiques de l'espèce *Haemaphysalis longicornis* ont la capacité d'assurer le cycle du parasite *Theileria equi* et sa transmission transstadiale [86]. Aucune étude n'a cependant été réalisée en conditions naturelles avec des équidés. Les tiques *Hae. punctata*, présentes en France, pourraient alors être une source potentielle de transmission du parasite, bien que cela n'ait pas été prouvé.

En 2010, une étude met en évidence que *Ixodes ricinus* est capable de maintenir *Theileria equi* par transmission transstadiale [87]. Aucune étude cependant ne montre la capacité d'*I. ricinus* à transmettre les piroplasmes à des équidés, ou de jouer un réel rôle épidémiologique dans la prévalence de la maladie. En revanche, une étude de 2017 semble de son côté montrer qu'*I. ricinus* ne serait pas un vecteur compétent pour la piroplasmose équine en conditions naturelles [3].

Parmi toutes les espèces de tiques, toutes ne sont pas présentes en France métropolitaine. Seules les espèces trouvées en France feront l'objet de notre étude (cf. Tableau III).

Tableau III : Espèces de tiques ayant un rôle suspecté ou confirmé dans la transmission de *Babesia caballi* ou *Theileria equi*. [83] [161]

Les espèces en **rouge** sont celles ayant un rôle suspecté ou confirmé dans la transmission de la piroplasmose en France.

Espèce	Parasite transmis	Espèce	Parasite transmis
<i>Dermacentor</i>		<i>Amblyomma</i>	
<i>D. albipictus</i>	<i>B. caballi</i>	<i>A. cajennense</i> (<i>A. mixtum</i>)	<i>T. equi</i>
<i>D. marginatus</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>	<i>Hyalomma</i>	
<i>D. nitens</i>	<i>B. caballi</i>	<i>Hya. aegyptium</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>
<i>D. niveus</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>	<i>Hya. anatolicum</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>
<i>D. nuttali</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>	<i>Hya. detritum</i>	<i>T. equi</i>
<i>D. pictus</i>	<i>B. caballi</i>	<i>Hya. dromedarii</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>
<i>D. reticulatus</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>	<i>Hya. excavatum</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>
<i>D. silvarum</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>	<i>Hya. lusitanicum</i>	<i>T. equi</i>
<i>D. variabilis</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>	<i>Hya. marginatum</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>
<i>Rhipicephalus</i>		<i>Hya. plumbeum</i>	<i>B. caballi</i>
<i>R. annulatus</i>	<i>B. caballi</i>	<i>Hya. scupense</i>	<i>T. equi</i>
<i>R. bursa</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>	<i>Hya. truncatum</i>	<i>B. caballi</i>
<i>R. evertsi</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>	<i>Hya. turanicum</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>
<i>R. microplus</i>	<i>T. equi</i>	<i>Hya. uralense</i>	<i>T. equi</i>
<i>R. mimeticus</i>	<i>T. equi</i>	<i>Hya. volgense</i>	<i>B. caballi</i>
<i>R. pulchellus</i>	<i>T. equi</i>	<i>Haemaphysalis</i>	
<i>R. sanguineus</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>	<i>Hae. longicornis</i>	<i>T. equi / B. caballi</i>
<i>R. turanicus</i>	<i>T. equi</i>		

II.B. Description morphologique et cycle biologique

II.B.1. Caractéristiques morphologiques des tiques dures [16][48]

Les tiques possèdent un corps globuleux, aplati ventro-dorsalement, de 2-20 mm de longueur quand elles sont non gorgées. Après le repas de sang, elles prennent une forme plus arrondie et peuvent mesurer jusqu'à 30 mm de longueur, multipliant leur poids par 100 [16]. Ce corps est divisé en 2 parties : le capitulum ou gnathosome, portant les pièces buccales ; et le corps ou idiosome, portant les pattes. Les adultes et les nymphes possèdent 4 paires de pattes, tandis que les larves n'en possèdent que 3. Ces pattes sont articulées, et possèdent 5 segments.

Le gnathosome ou capitulum, encore appelé rostre, antérieur, porte les pièces buccales, ainsi que des éléments sensoriels de la tique (cf. Figure 9). Il peut prendre différentes formes (triangulaire, rectangulaire, trapézoïde, ...). On distingue les tiques longirostres (rostre plus long que large) et brévirostrès (rostre globalement carré). On y trouve :

- deux chélicères, organes pairs dentelés, dorsaux, permettant la dilacération des tissus de son hôte,
- un hypostome, organe unique denticulé, ventral, permettant l'ancrage de la tique,
- deux palpes, latéraux, comportant 3 segments.

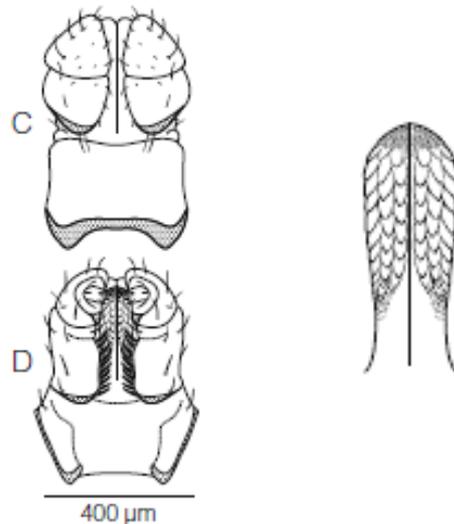


Figure 9 : Schéma du capitulum (ou gnathosome) d'une tique *Dermacentor marginatus*. [81]
Gauche : vue dorsale (C) et ventrale (D) de l'ensemble du capitulum
Droite : Hypostome en vue ventrale

Sur l'idiosome on trouve une plaque chitineuse recouvrant, partiellement ou totalement, la partie dorsale de l'individu : le scutum [125] (cf. Figures 10 et 11). Chez les femelles, ainsi que chez les stades immatures, ce scutum ne couvre qu'une partie réduite du corps, permettant un repas sanguin important et une dilatation notable du corps. Chez l'adulte mâle, ce scutum couvre l'intégralité du corps, ne permettant qu'une très légère dilatation en cas de repas de sang [164]. Ventralement, on trouve les pattes, s'insérant chacune sur une hanche, ou coxa, et possédant 5 articulations se terminant par une paire de griffes. Chez les tiques dures, ces hanches sont situées antérieurement et latéralement sur l'idiosome. On trouve latéralement juste en arrière de la hanche IV les stigmates, par paire. Il s'agit de l'abouchement du système respiratoire de la tique. On trouve en position ventrale le pore génital (ou gonopore), et postérieurement le pore anal. Enfin, il est possible de trouver sur l'ensemble du corps des soies, à visée sensorielle.

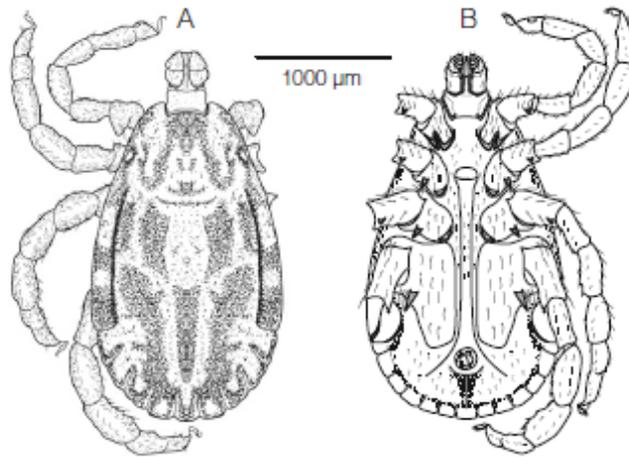


Figure 10 : Schéma de l'anatomie d'une tique mâle *Dermacentor marginatus*. [81]
A : vue dorsale ; B : vue ventrale

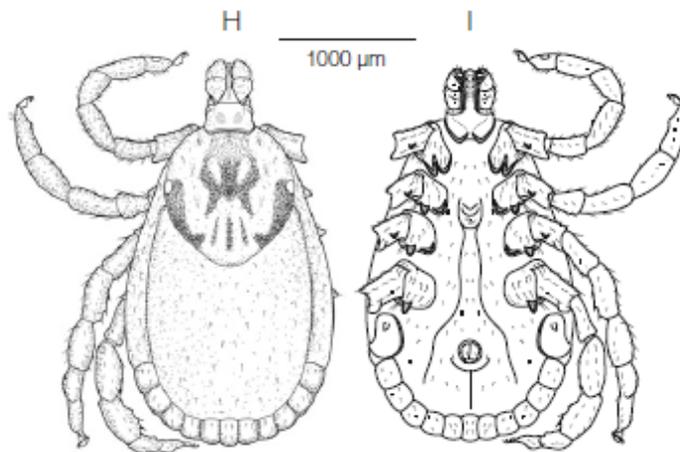


Figure 11 : Schéma de l'anatomie d'une tique femelle *Dermacentor marginatus*. [81]
H : vue dorsale ; I : vue ventrale

La classification des tiques se faisant en partie par les caractéristiques morphologiques, ce sont tous ces éléments qui permettront la différenciation des espèces entre elles, lors du prélèvement et de l'observation d'une tique :

- La taille et forme du rostre,
- La présence d'ocelles (yeux),
- La taille et forme du scutum,
- La forme du sillon contournant l'anus
- La forme des stigmates,
- La forme des hanches,

- La présence d'épines sur les hanches.

II.B.2. Diagnose de genre des tiques par leurs caractéristiques morphologiques

Les tiques se divisent en 2 sous-familles : les prostriata, avec un sillon bien visible contournant le pore anal par l'avant, et les métastriata, avec un sillon plus ou moins visible selon les espèces et contournant le pore anal par l'arrière. Les espèces d'intérêt dans notre étude sont toutes métastriata [29] [48] [58].

II.B.2.a. *Dermacentor*

- Tique métastriata
- Brévirostre avec capitulum rectangulaire
- Deuxième article des pédipalpes élargi
- Présence d'ocelles
- Scutum festonné chez le mâle
- Stigmates ovalaires ou en virgule
- Hanche I bifide
- Chez les mâles la hanche IV est de taille très augmentée.



Figure 12 : Photo de tiques *Dermacentor reticulatus* (gauche) et *Dermacentor marginatus* (droite). [138]

II.B.2.b. *Rhipicephalus*

- Tique métastriata
- Brévirostre avec capitulum hexagonal
- Deuxième article des pédipalpes élargi
- Présence d'ocelles
- Hanche I bifide
- Scutum festonné chez le mâle
- Stigmates en virgule
- Absence d'écussons ventraux chez le mâle



Figure 13 : Photo de tiques *Rhipicephalus sanguineus* (gauche) et *Rhipicephalus bursa* (droite). [138]

II.B.2.c. *Hyalomma*

- Tique méastriata
- Longirostre avec capitulum rectangulaire
- Deuxième article des pédipalpes long
- Présence d'ocelles
- Ecussons ventraux chez le mâle
- Stigmates ovalaires ou en virgule



Figure 14 : Photo d'une tique *Hyalomma marginatum*. [138]

II.B.3. Cycle biologique

II.B.3.a. Stases du cycle biologique des tiques *Ixodidae*

Le cycle biologique des tiques *Ixodidae* consiste en 4 stases : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte. Mise à part l'œuf, chaque stase fera l'objet d'un unique repas de sang.

Après une embryogenèse de 20 à 50 jours, les œufs éclosent, donnant naissance à une larve d'environ 1 mm de longueur. Cette larve recherche un hôte de manière passive : son corps reste généralement immobile, et ses pattes sont étendues au passage d'un hôte, lui permettant de s'accrocher à celui-ci. Après ce premier repas de sang, la larve tombe et commence alors sa

métamorphose. La durée de cette première métamorphose est variable selon les espèces et les conditions climatiques : elle durera entre 2 et 8 semaines.

La nymphe née de cette métamorphose mesure 2-4 mm de longueur. Comme la larve, la recherche d'un hôte sera généralement passive. Une fois fixée, elle effectuera un nouveau repas de sang, puis tombera de son hôte. Débutera alors une seconde métamorphose, plus longue que la première, pouvant durer jusqu'à 25 semaines.

Une fois adulte, la tique recherchera un nouvel hôte, de manière passive ou active. Les femelles effectueront un repas de sang en quantité importante, nécessaire à la reproduction. Chez les mâles adultes, les tiques méastriata effectueront un petit repas de sang, tandis que les prostriata n'en effectueront pas du tout. La reproduction pourra s'effectuer sur l'hôte pour les tiques méastriata, les mâles étant sexuellement immatures avant le repas de sang. Après fécondation, la femelle pond entre quelques centaines et plusieurs milliers d'œufs. Le mâle meurt après l'accouplement. Quelques jours après la ponte, la femelle meurt à son tour [16] [134].

La durée totale du cycle est variable, mais globalement longue dans cette famille. Un cycle moyen d'*I. ricinus*, par exemple, s'effectuera sur 2 à 4 ans. Pour *I. uriae*, le cycle peut durer jusqu'à 6 ans. Chez *Dermacentor*, ce cycle s'effectue généralement sur un an. Plusieurs facteurs vont influencer la durée de ces cycles. Tout d'abord, il est possible de découper la vie des tiques en deux phases : une phase de repas sur un hôte, et une phase de recherche d'hôte ou de métamorphose dans l'environnement. C'est cette dernière qui joue un rôle majeur dans l'allongement du cycle de vie de la tique. Les périodes de recherche passive d'un hôte aux stades larvaire et nymphal peuvent durer plus ou moins longtemps en fonction de la présence d'hôtes, de la spécificité d'hôte, de l'espèce de tique, des conditions climatiques, etc. [29] [134]. Les larves et les nymphes peuvent jeûner plusieurs mois, et cette période peut s'allonger à plus d'un an pour les adultes [4].

Les conditions climatiques influent également sur les durées de métamorphose. Les conditions d'humidité permanente trouvées dans les pays équatoriaux permettent un développement continu toute l'année, ainsi que des métamorphoses courtes (quelques jours en climat favorable). En climat tempéré comme en France, le froid de l'hiver ainsi que la sécheresse de l'été ralentissent considérablement les cycles (quelques mois de métamorphose en hiver). Enfin, d'autres facteurs comme la photopériode influent sur la durée des métamorphoses [27] [185]. Ainsi en climat tropical *R. sanguineus* peut produire entre 2,5 et 4 générations par an, tandis qu'en Europe cette espèce semble ne produire qu'une génération par an [29].

II.B.3.b. Variabilité dans le nombre d'hôtes [16] [134] [161]

La majorité des tiques *Ixodidae* réaliseront leur cycle comme décrit précédemment, en changeant d'hôte après chaque métamorphose. On appelle cela un cycle triphasique.

Il existe quelques espèces pour lesquelles le nombre d'hôtes nécessaires à l'accomplissement de leur cycle n'est que de 2. La métamorphose de la larve en nymphe se fera alors sur un hôte. Ainsi, le repas de sang de la larve et celui de la nymphe seront sur ce même hôte. La tique tombera ensuite pour devenir adulte et rechercher un nouvel hôte. Le cycle est alors dit diphasique. C'est le cas pour quelques espèces comme *Hya. detritum*, *R. bursa*, et d'autres encore. Il faut cependant noter que le caractère diphasique n'est pas systématiquement obligatoire, et que certaines espèces seront capables d'effectuer leur cycle sur 2 ou 3 hôtes selon les conditions dans lesquelles elles se trouvent.

Enfin, certaines espèces réaliseront un cycle monophasique, dans lequel elles passeront toute leur vie sur le même hôte, dont elles se nourriront. C'est le cas pour *R. annulatus* ou *R. microplus* par exemple. De même que pour les espèces au cycle diphasique, certaines seront capables d'avoir un cycle mono- ou diphasique selon les conditions dans lesquelles elles se trouvent.

II.B.3.c. Variabilité dans le spectre d'hôtes [4] [88] [134]

Nous pouvons là aussi distinguer plusieurs groupes de tiques. Que le cycle soit mono-, di- ou triphasique, la spécificité d'hôte ou préférence trophique varie en fonction des espèces. On parlera de tiques monotropes lorsque les hôtes parasités sont de la même espèce, ou d'espèces proches. Ce sera le cas des tiques au cycle monophasique.

La majorité des tiques sont ditropes. Les larves et les nymphes parasiteront de petits vertébrés comme des rongeurs, tandis que les adultes parasiteront de plus grands vertébrés (animaux domestiques, de troupeau, chevaux, etc.).

Enfin, les tiques comme *Ixodes*, capables de parasiter des espèces très diverses de vertébrés (grands, petits, oiseaux, reptiles...) avec des préférences distinctes à chaque stade, sont appelées télotropes.

Ce spectre d'hôte aura une grande importance dans la diffusion d'une maladie. Une tique, bien que théoriquement compétente pour être vectrice d'un agent pathogène, ne sera un vecteur efficace que dans la mesure où elle parasite un hôte réceptif à ce même agent pathogène.

II.C. Écologie des tiques vectrices de la piroplasmose en France

II.C.1. Habitats des tiques vectrices de piroplasmose en France

On distingue :

- Les tiques endophiles, vivant dans un environnement relativement restreint, proches de leurs hôtes (terriers, grottes, caves, abris, nids, etc.),
- Les tiques exophiles, vivant en milieu ouvert dans l'environnement, sur la végétation.

Pour un certain nombre d'espèces, les larves et/ou nymphes seront endophiles et les adultes exophiles.

II.C.1.a. Les tiques endophiles [6]

Le mode de vie endophile assure un environnement généralement stable en température et humidité. En revanche, les tiques endophiles sont très dépendantes de la présence d'hôtes dans ce même milieu. Ainsi, ce seront principalement les hôtes qui rythmeront leur cycle de vie. Un environnement très fréquenté toute l'année permettra des cycles continus et relativement courts. A l'inverse, un environnement peu fréquenté, ou à la fréquentation saisonnière, contraindra les tiques à des attentes longues.

II.C.1.b. Les tiques exophiles

Cela concerne la majorité des tiques dures et par conséquent les tiques d'intérêt de cette étude. Le mode de vie exophile est beaucoup plus dépendant des conditions climatiques. On trouve ces tiques dans des environnements très variés [16]. Bien que sensibles à la sécheresse, elles s'adaptent à leur environnement en se déplaçant dans la végétation, trouvant des zones plus humides. Il existe aussi chez les tiques dures la sécrétion d'une substance hygroscopique, capable d'absorber l'humidité de l'air par leurs glandes salivaires, permettant ainsi une résistance à la dessiccation [156]. Les tiques parasitent le plus souvent leurs hôtes en s'accrochant à ce qui est à leur portée. Chez le cheval, cela concernera le plus souvent la crinière ou à la queue. La hauteur des végétaux sur lesquels elles se tiendront déterminera donc le type d'hôtes qu'elles parasiteront. C'est pourquoi les larves et nymphes parasitent généralement les petits mammifères, car elles sont proches du sol, tandis que les adultes, plus actifs et évoluant plus haut dans la végétation, pourront parasiter de plus grands animaux. La densité de la végétation

est un facteur ayant aussi un fort impact sur la présence de foyers de tiques. C'est pourquoi les boisements, bosquets, et haies sont en France des lieux particulièrement favorables au développement des tiques, plus encore si des animaux hôtes vivent à proximité [6] [16] [29].

II.C.2. Saisonnalité de l'activité des tiques vectrices de piroplasmose en France

Il est possible de décrire une saisonnalité de l'activité des tiques. Le profil d'activité sera caractéristique de chaque espèce et de chaque stase. Il sera fonction de la température, de l'humidité, de la présence des hôtes, de la photopériode, etc. L'environnement géographique dans lequel vivra la population de tiques définira ainsi différents profils d'activité, y compris au sein d'une même espèce [68] [102].

II.C.2.a. Saisonnalité des tiques *Dermacentor*

Les tiques *D. marginatus* adultes ont une activité biphasique. La majeure partie de cette activité se situe au printemps, entre fin Janvier et début Mai. Un deuxième pic d'activité arrive en automne, entre Septembre et Octobre. Dans leurs territoires les plus au Sud, une activité reste possible durant l'hiver. Les larves et les nymphes ont une activité estivale [29] [81].

Les tiques *D. reticulatus* adultes ont une activité durant presque toute l'année, s'étalant de la fin de l'été à la fin du printemps voire au début de l'été suivant. Le pic d'activité se situe en moyenne en Mars-Avril. Dans leurs territoires les plus au Nord, où le climat est plus froid, le pic d'activité sera décalé sur Avril-Mai. Par ailleurs, dans ces territoires, les adultes seront aussi actifs durant les mois d'été. Un deuxième pic d'activité, non systématique, a lieu en automne. En hiver, la neige et les températures trop basses ralentissent voire interrompent leur cycle. Les larves et les nymphes ont quant à elles une activité estivale [29] [58] [68] [115].

II.C.2.b. Saisonnalité des tiques *Rhipicephalus*

L'activité des tiques *R. sanguineus* adultes se situe majoritairement au printemps, de Mars à Juin. L'été, les températures importantes et la sécheresse ralentissent le cycle de développement, de même que les températures basses d'hiver. En effet, des températures ambiantes inférieures à 10°C ou supérieures à 35°C induisent un ralentissement, voire un arrêt de développement [46]. Un deuxième pic d'activité automnal est fréquent. En été, les larves et nymphes restent actives, et peuvent être rencontrées jusqu'à l'automne [65] [66] [110].

Rhipicephalus bursa a une activité saisonnière estivale, s'étendant du printemps à l'automne, avec un pic en Juin-Juillet. Les stades pré-imaginaux seront actifs durant l'automne [59] [175].

Les adultes *R. turanicus* sont retrouvés durant le printemps, de Mars à Juin. Les stades pré-imaginaux sont quant à eux actifs plus tard, durant les mois d'été [65].

II.C.2.c. Saisonnalité des tiques *Hyalomma*

Les tiques *Hya. lusitanicum* adultes présentent une activité durant presque toute l'année. Deux pics d'activités restent cependant remarquables, du printemps au début de l'été, avec un pic en Mai-Juin ; et en automne, jusqu'en Novembre. Les stades larvaire et nymphal sont quant à eux retrouvés de Mai-Juin jusqu'à Septembre.

Les tiques *Hya. marginatum* adultes ont une activité du début du printemps à la fin de l'automne, de Mars à Novembre, avec un pic au printemps en Avril-Mai. Les stades larvaire et nymphal sont actifs du début de l'été à l'automne, de Mai-Juin à Octobre [58] [71] [174].

II.D. Distribution géographique des tiques à piroplasmose en France

Les cartes de distribution géographique suivantes, pour *D. reticulatus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *Hya. marginatum* et *Hya. lusitanicum* prennent toutes pour source le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies (ECDC). Elles présentent toutes la même légende, à savoir :

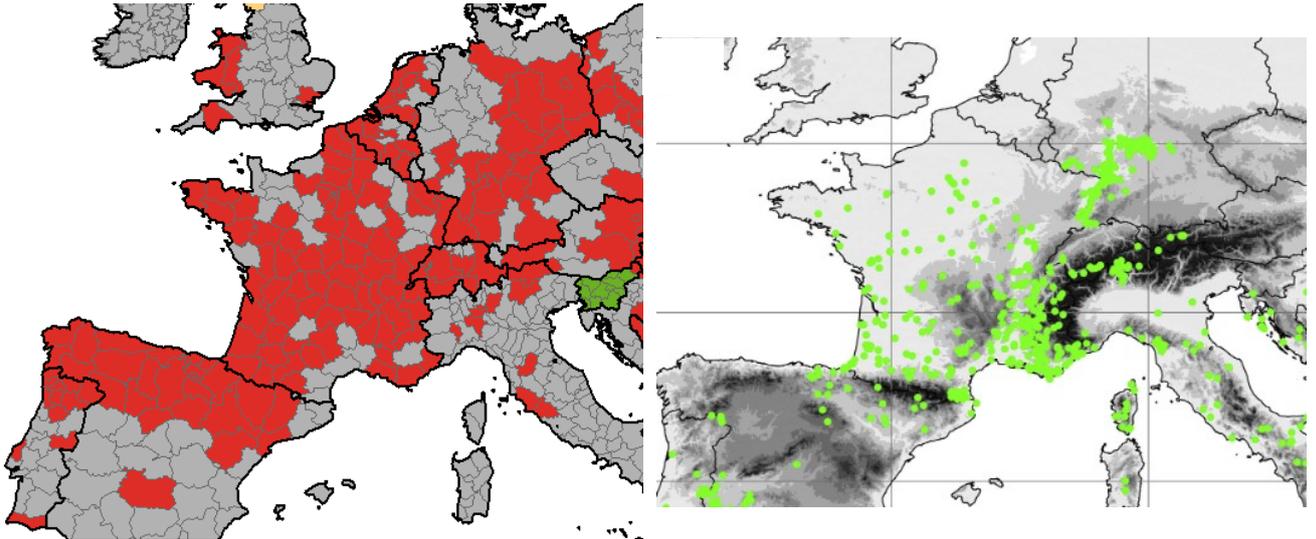
Rouge : Présence confirmée de l'espèce dans le département,

Vert : Absence confirmée, l'espèce n'a jamais été rapportée dans le département et des études de terrain ont été effectuées au cours des 5 dernières années sur la distribution de cette espèce,

Jaune : Introduction, l'espèce a été introduite dans le département mais aucune étude n'a rapporté qu'elle s'était effectivement établie,

Gris : Absence d'étude ou de données.

II.D.1. Distribution des tiques *Dermacentor* sp.



Figures 15 (A) : Distribution géographique de *Dermacentor reticulatus* en Mai 2020 en France métropolitaine. [61]

Figure 16 (B) : Distribution géographique de *Dermacentor marginatus* en France métropolitaine. [155]

Dermacentor reticulatus et *D. marginatus* sont les espèces d'intérêt pour la piroplasmose dont la distribution en France est la plus large. *D. marginatus* est retrouvée plus fréquemment dans la partie sud du territoire. C'est une espèce plutôt thermophile, d'où sa présence fréquente sur le pourtour méditerranéen. Au Nord, son territoire s'arrête aux alentours de la Bretagne et du Nord de la France, où le climat est trop froid [29] [31] [58] (cf. Figure 16).

Dermacentor reticulatus possède une aire de distribution s'étendant plus loin au Nord. C'est une espèce moins thermophile, colonisant ainsi des territoires au climat plus froid que *D. marginatus*. On peut en effet retrouver cette espèce dans le Nord de la France, en Belgique, et jusque dans les pays baltes [61], ce qui n'est pas le cas de *D. marginatus* [155] (cf. Figure 15). Elle n'est cependant pas retrouvée dans des milieux trop secs ou trop en altitude [29] [58].

II.D.2. Distribution des tiques *Rhipicephalus* sp.

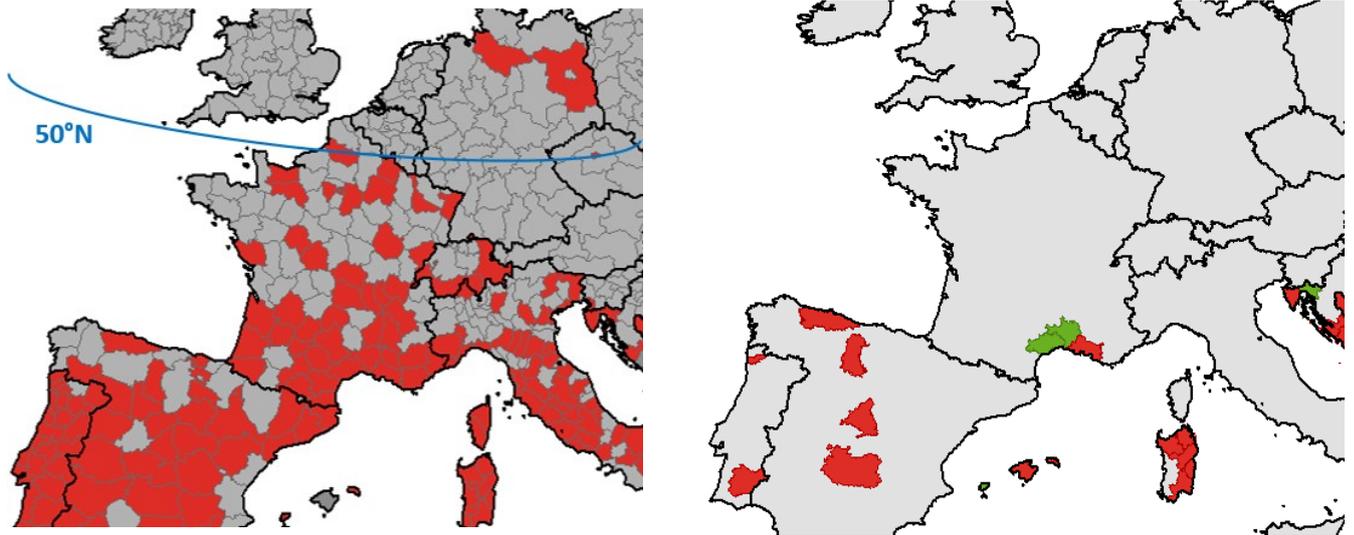


Figure 17 : Distribution de *Rhipicephalus sanguineus* (A) en Mai 2020 et *Rhipicephalus bursa* (B) en Janvier 2019 en France métropolitaine. [61]

Les tiques *Rhipicephalus* sont retrouvées plus au Sud que les *Dermacentor*. *Rhipicephalus sanguineus* est fréquemment rencontrée dans le bassin méditerranéen, appréciant les milieux chauds, humides et les hivers doux [61] (cf. Figure 17-A). On considère que sa distribution géographique dans le monde se situe en 50° N et 35° S [58]. En France, cela correspond au Sud de la latitude passant au Nord d'Amiens. Il reste cependant possible de trouver des micropopulations plus ou moins durables plus au Nord, dans des milieux plus froids, suite aux déplacements des hôtes de la tique.

Rhipicephalus bursa semble être moins fréquente en France, rapportée presque exclusivement dans la moitié Sud de la France, sur le pourtour méditerranéen [58] [62] [67] [105] [108] (cf. Figure 17-B).

Rhipicephalus turanicus, espèce proche de *R. sanguineus*, possède une distribution similaire. C'est une tique du bassin méditerranéen dont la présence se fait plus rare en remontant au Nord [29] [47] [58].

II.D.3. Distribution des tiques *Hyalomma* sp.

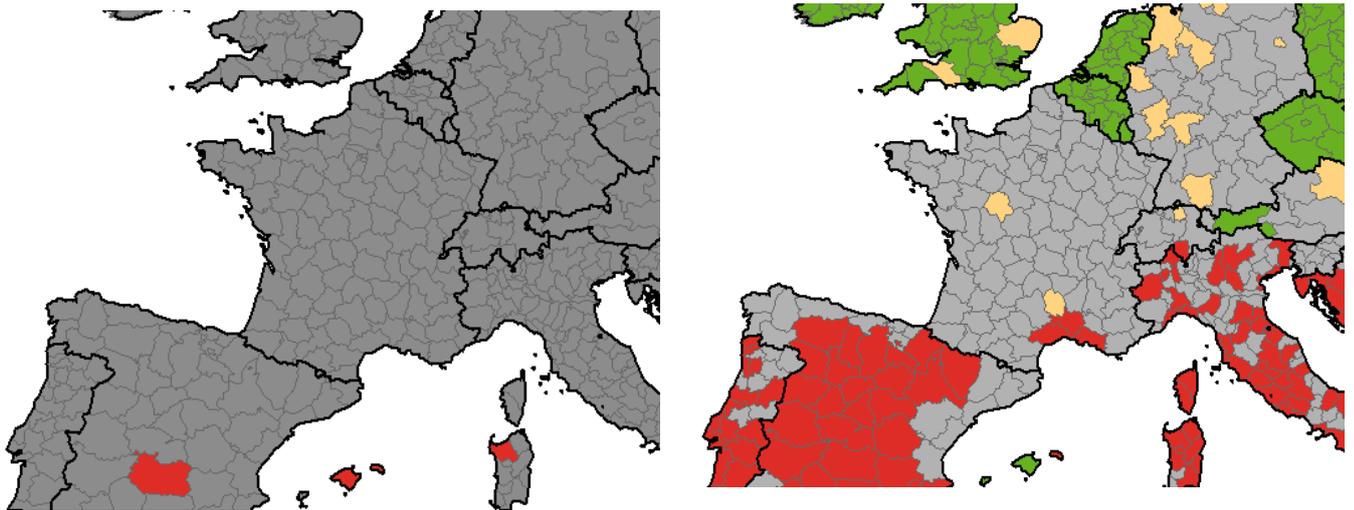


Figure 18 : Distribution géographique de *Hyalomma lusitanicum* (A) et *Hyalomma marginatum* (B) en Mai 2020 en France métropolitaine. [61]

Les tiques *Hyalomma* ont une distribution plus méridionale que les genres précédents. Ce sont des tiques rapportées beaucoup moins fréquemment en France que *Dermacentor* ou *Rhipicephalus* [62]. Rapportée en Espagne, Italie, Portugal, *Hya. lusitanicum* reste rare en France [179], avec simplement quelques individus rencontrés dans l'extrême Sud, et en Corse [58] [174] (cf. Figure 18-A). Bien qu'elle fût une espèce fréquente dans les années 1950, sa distribution semble s'être considérablement réduite depuis [144].

Hyalomma marginatum est bien installée dans le Sud de la France, avec des foyers confirmés dans le Gard, l'Hérault, les Bouches du Rhône, la Corse, le Var, l'Aude [61] [166] [179] (cf. Figure 18-B).

Hyalomma scupense est établie en France dans le Sud-Ouest principalement : Charente Maritime, Gironde, Landes, Pyrénées-Atlantiques [113]. En 2016, elle est décrite également en Corse. Cette espèce représentait 8,7% des tiques prélevées dans 3 abattoirs corses, entre Mai 2014 et Mai 2015 [71].

II.D.4. Distribution géographique et activité anthropique

Les changements climatiques actuels, et en particulier la hausse de la température moyenne, ont un impact sur la distribution des populations de tiques. La température va avoir divers effets, observés ou supposés, sur ces populations. Comme présenté précédemment (cf. II.B.3.a.), une hausse de température sera à l'origine d'une modification de la durée des cycles évolutifs [141]. La conséquence directe sera une modification des territoires de distribution des tiques. Les populations déjà présentes seront capables de coloniser des territoires plus au Nord, au climat initialement trop froid pour assurer leur survie. Ce phénomène a été observé en Suède, avec la remontée au Nord des populations de tiques *I. ricinus*, ainsi qu'en Allemagne avec l'extension des populations de *D. reticulatus* [70]. Les tiques d'espèces pas ou peu présentes en France pourront elles aussi voir leur distribution changer. Les tiques *Hya. marginatum*, encore rares en France et limitées aux départements les plus au Sud, pourraient voir leur territoire s'étendre, avec des populations qui s'établissent, comme le suggèrent certains modèles [60] [70] [110] [174].

À l'inverse, certaines espèces pourraient se raréfier. C'est ce qui fût noté pour *R. bursa* en Tunisie. En effet, si les actions anthropiques s'accompagnent d'une hausse de la température moyenne, elles s'accompagnent aussi d'une modification majeure du milieu naturel, des biotopes et des niches écologiques qui y sont liées. Ainsi, la modification de la niche écologique de *R. bursa* a entraîné une réduction importante de sa population [31].

Enfin, les modifications des milieux d'origine anthropique (température, couvert végétal, etc.) sont à l'origine d'une modification de distribution, de mouvements et de comportement des hôtes vertébrés obligatoires des tiques, petits mammifères principalement. Ces données sont aussi à prendre en compte dans l'évolution de la distribution des populations de tiques [31] [70].

Toutes ces modifications ont un impact sur les maladies vectorielles à tiques. Cela a déjà été noté pour diverses maladies : encéphalite à tique, babésiose canine, blue tongue, fièvre de la Vallée du Rift, West-Nile fever [31] [70].

II.E. Autres modes de transmission de la maladie

II.E.1. Transmission iatrogène

La transmission iatrogène de la piroplasmose est possible, par le mélange d'un sang contaminé à un sang indemne. Plusieurs manipulations peuvent ainsi y aboutir. Une transfusion de sang de la part d'un donneur infecté non testé préalablement à un receveur naïf peut être à l'origine d'une transmission de la maladie. De même, l'utilisation de matériel contaminé par du sang infecté comme des seringues ou des appareils de dentisterie peuvent aboutir à la transmission de la maladie. C'est une des causes majeures de détection de chevaux positifs à la piroplasmose dans des régions habituellement indemnes [167] [173] [182].

En Août 2011, vingt chevaux Quarter Horse ont été révélés positifs à *T. equi* lors d'une course en Floride. Certains chevaux étant importés du Mexique, il fut supposé qu'ils étaient les réservoirs à l'origine de la contamination des autres. Les pratiques comme les transfusions de sang à but « dopant » ou le partage des aiguilles ont été supposées à l'origine des contaminations [162].

II.E.2. Transmission transplacentaire

II.E.2.a. Transmission transplacentaire de *Theileria equi*

- *Mécanismes de transmission*

Theileria equi se transmet également par voie transplacentaire, bien que le mécanisme exact de cette transmission ne soit pas résolu. Il a été montré qu'il n'est pas nécessaire d'avoir des lésions placentaires et un mélange des sangs maternel et fœtal pour que le parasite soit transmis. En 2007, Allsopp *et al.* avancent l'hypothèse suivante : entre le 40^e et 150^e jour, correspondant à la période précédant la mise en place du placenta, l'embryon se nourrit d'un mélange de cellules épithéliales desquamées, sécrétions glandulaires, et érythrocytes maternels. Ainsi, les érythrocytes infectés peuvent directement atteindre le fœtus. La placentation épithéliochoriale empêchant le passage d'anticorps maternels par le placenta, et la mise en place du système immunitaire du poulain après 240 jours n'inhibent donc en rien l'installation du parasite [14].

- *Conséquences sur le poulain*

Les conséquences d'une infection *in utero* sont diverses : avortement, naissance de poulain mort-né, naissance de poulain malade ou naissance de poulain cliniquement sain.

Les avortements ont généralement lieu dans le dernier tiers de gestation, bien que l'infection ait généralement lieu avant 150 j [14] [111] [158]. Les cas de piroplasmose néonatale sont rarement de bon pronostic, avec une présentation clinique proche de l'isoérythrolyse néonatale, mais une issue souvent fatale [14] [111]. En 2004, Phipps *et al.* décrivent le cas de deux chevaux cliniquement sains de 2 et 5 ans, séropositifs à *T. equi*, dont la contamination serait probablement d'origine transplacentaire [136]. Les cellules productrices d'anticorps n'apparaissant pas avant 240 jours de gestation, les parasites acquis entre le 40^e et 150^e jour seraient reconnus comme du soi par le système immunitaire du poulain. Ainsi, la prise colostrale durant les premiers mois de vie, associée à l'immunité innée, permettrait un contrôle essentiel de la parasitémie sans pour autant éliminer totalement *T. equi* [14] [158].

Le nombre de parasites infectant le poulain est également important, puisque des niveaux de parasitémie supérieurs à 50% ont été observés chez des avortons, ou des poulains atteints de piroplasmose néonatale [14]. Pour autant, des juments avec une parasitémie très faible peuvent infecter leur fœtus [64].

- *Prévalence des avortements à piroplasmose*

La prévalence des atteintes de juments gestantes par la piroplasmose est difficile à évaluer. Une étude chez des juments Pur-sang d'Afrique du Sud concluait que 11% des avortements étaient dus à *T. equi* [111]. Une autre étude entre 2014 et 2016 sur des juments Pur-sang de Trinidad concluait à une prévalence équivalente, avec 11 à 15% des avortements liés à la piroplasmose [158]. En pays indemnes, les cas de piroplasmose sont plus sporadiques, liés à des importations, comme le montre l'étude de Phipps *et al.* en 2004 [136].

II.E.2.b. Transmission transplacentaire de *Babesia caballi*

Si la transmission transplacentaire de *T. equi* a été démontrée, la transmission transplacentaire de *B. caballi* est longtemps restée incertaine [111]. Dans une étude de 2016, Sant *et al.* montrent cependant qu'il existe un lien statistique entre transmission transplacentaire de *B. caballi* et avortement [158].

II.E.3. Transmission par la semence

A ce jour, aucun cas de transmission de la piroplasmose via la semence d'un étalon contaminé n'a été rapporté [63] [182]. C'est une préoccupation liée à l'augmentation du transport de sperme frais, réfrigéré ou congelé aux échelles régionale, nationale et internationale [120]. A ce jour, le risque estimé de transmission est faible, et limité aux cas de contamination de l'échantillon de semence par du sang contaminé [120] [154].

III. Épidémiologie de la piroplasmose

III.A. Dans le monde

La piroplasmose équine est une maladie largement distribuée dans le monde. Il est en effet considéré que seulement 10% des chevaux vivent dans une région indemne de piroplasmose [49] [154]. La distribution mondiale de cette maladie coïncide avec la distribution des tiques vectrices, et la majorité des régions en climat tropical et subtropical sont endémiques de piroplasmose. La majorité des tiques vectrices de piroplasmose étant compétentes dans la transmission des deux parasites, les distributions géographiques de *T. equi* et *B. caballi* à travers le monde sont quasiment identiques, bien que la distribution de *B. caballi* s'étende un peu plus au Nord que celle de *T. equi*. Dans les pays endémiques de piroplasmose, *T. equi* est plus fréquemment incriminée que *B. caballi* [133] [172].

L'augmentation des mouvements des chevaux à l'international de par les sports équestres, les courses, les pratiques d'élevage et en particulier de reproduction constitue le principal risque d'introduction de la maladie dans des pays actuellement indemnes (Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Singapour, etc.). En outre, de nombreux pays indemnes présentent un climat favorable au développement de tiques compétentes. Certains possèdent même déjà des vecteurs compétents [49] [133] [154].

III.A.1. Amérique

En Amérique centrale et du Sud, la piroplasmose est endémique, à l'exception du sud de l'Argentine et du Chili. Plusieurs études montrent des prévalences très élevées en Colombie, au Chili, sur les îles cubaine et portoricaine ou encore au Brésil, avec des taux de séropositivité

allant parfois jusqu'à plus de 90%. Une étude de Barbosa en 2000 au Nord du Brésil montre une incidence annuelle moyenne d'infection à *T. equi* de 12% [19] [133] [135] [172].

En Amérique du Nord, les États-Unis et le Canada sont considérés comme des pays indemnes de piroplasmose. Importée aux États-Unis en 1959 par des chevaux arrivant de Cuba, des mesures de quarantaine strictes sont depuis imposées dès qu'un cas de piroplasmose est rapporté, permettant de contenir la maladie localement [49] [133]. De rares cas sporadiques sont parfois rapportés, comme l'épidémie en Floride en 2011 chez des chevaux importés du Mexique [162]. Le dernier cas rapporté au Canada date de 1987 [131]. Au Mexique, la maladie est présente mais les manifestations cliniques sont rarement rapportées [131] [172].

Ce statut indemne et les risques importants liés aux déplacements des chevaux expliquent que les États-Unis et le Canada exigent que les chevaux importés soient certifiés « indemnes de piroplasmose » [147].

III.A.2. Europe

La piroplasmose est endémique dans la majorité des pays d'Europe du Sud. Elle est fréquemment rapportée au Portugal, en Espagne, en France, en Italie, dans les Balkans, en Hongrie, en Roumanie et dans le sud de la Russie. La distribution de la maladie suit la distribution de *D. reticulatus*, principal vecteur en Europe [49] [154]. Dans les pays les plus au sud, les tiques *Hyalomma* et *Rhipicephalus* prédominent et sont les principaux vecteurs de la maladie [154]. Selon les études, les pays, les années et les méthodes utilisées, les prévalences varient, allant de quelques pourcents dans des pays peu touchés comme les Pays-Bas, à plus de 70% dans certaines régions d'Italie en 2016 [36] [133] [154] [172]. Le Luxembourg, l'Ukraine, les pays baltes, la République Tchèque, la Pologne font partie des pays européens considérés comme indemnes de piroplasmose. Les rares cas sporadiques de piroplasmose dans des pays indemnes ont pu être reliés épidémiologiquement à des pays endémiques, comme la France, l'Espagne ou l'Italie. Le Royaume-Uni est historiquement classé comme pays indemne de piroplasmose. Une étude de 2019 a montré une séropositivité de 8% à au moins un des deux parasites de la piroplasmose, ainsi qu'une positivité à la PCR de 0,8% à *T. equi*. Pour autant, aucune manifestation clinique n'a été rapportée au Royaume-Uni [41] [147] [154].

III.A.3. Afrique

L'Afrique est endémique dans la quasi-totalité de ses pays, avec des séroprévalences très élevées, allant de 50% à plus de 95% selon les études et les pays. Les principaux vecteurs sont *Rhipicephalus evertsi evertsi*, qui transmet *B. caballi* et *T. equi*, et *Hyalomma truncatum*, qui ne transmet que *B. caballi* [123] [133] [154] [193].

III.A.4. Asie

La piroplasmose est largement répandue en Asie, et particulièrement en Chine, en Mongolie et en Asie du Sud-Est [133]. Une étude d'Avarzed en Mongolie centrale en 1997 montre un taux de séroprévalence supérieur à 80% pour *T. equi* et *B. caballi* dans une population de chevaux allant de 1 à 19 ans. Les principaux vecteurs dans cette région du monde sont *Dermacentor nuttali*, *Hyalomma dromedarii* et *Dermacentor silvarum* [21] [154].

En 2017, une étude jugeait de l'importance de la piroplasmose dans la mortalité d'une population de 19 chevaux de Przewalski réintroduits dans le parc national de Hustai en Mongolie. Cette étude montrait un portage de *T. equi* de 84%, équivalent à celui d'une population de chevaux domestiques (80%). En revanche, aucun cheval de Przewalski n'était porteur de *B. caballi*, et un unique cheval l'était au sein de la population de chevaux domestique. Entre 2012 et 2015, le taux de mortalité moyen des chevaux de Przewalski à cause de la piroplasmose a été de 19%. [168].

Le Japon est considéré comme pays indemne de piroplasmose [147]. Cependant, une étude d'Ikadai en 2002 sur 2000 chevaux prélevés entre 1971 et 1973 a montré une séroprévalence de 5% pour *B. caballi* et de 2% pour *T. equi*. Les sérums de ces chevaux étaient analysés par ELISA, le portage des chevaux dont le sérum revenait positif étant ensuite confirmé par Western Blot [84]. Une autre étude d'Ikadai en 2007 a montré la capacité d'*Haemaphysalis longicornis*, tique fréquente au Japon, d'assurer le cycle parasitaire de *T. equi* [86].

III.A.5. Îles océaniques

L'Australie et la Nouvelle-Zélande sont indemnes de piroplasmose. Bien que *T. equi* ait été importé à plusieurs reprises en Australie (dans les années 1950 et 1960 par des chevaux du Texas, en 1976 par des chevaux d'Espagne), le parasite ne s'est pas installé. Il semblerait que des vecteurs potentiellement compétents tels que *R. microplus* soient pour autant présents dans ces pays [49] [154].

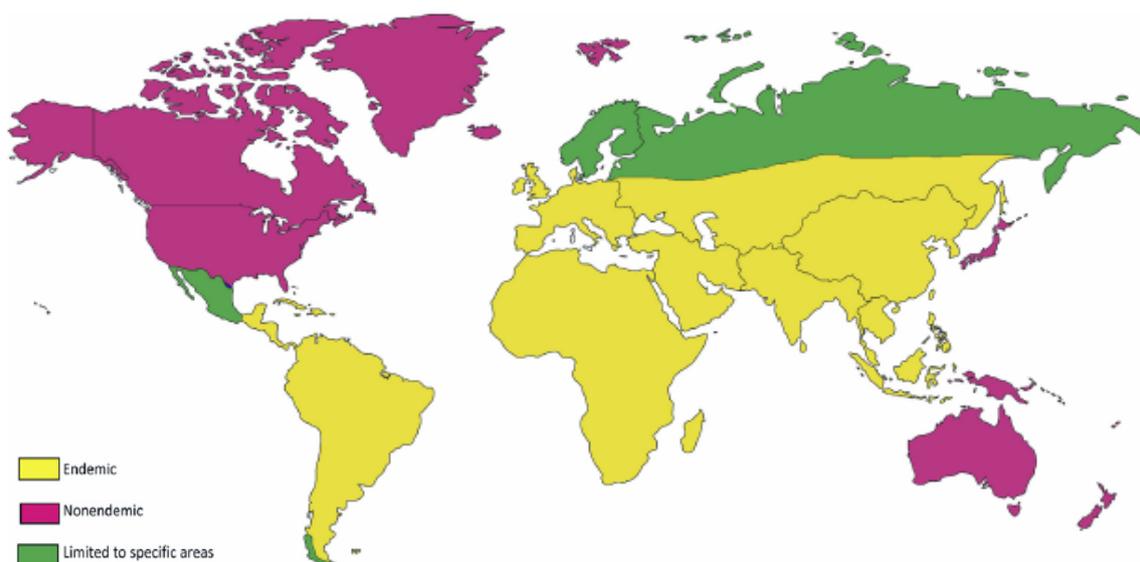


Figure 19 : Distribution géographique globale de la piroplasmose équine dans le monde. [184]

III.B. En France

III.B.1. Données épidémiologiques disponibles

Les premières études à grande échelle en France concernant la piroplasmose équine sont celles de Soulé. Entre 1973 et 1996, un premier bilan de la situation épidémiologique de la France quant à la piroplasmose équine a été réalisé, utilisant la méthode de fixation du complément. Celui-ci montrait une augmentation nette des taux de séroprévalence dans la population équine. Sur la période de 1973 à 1979, la positivité moyenne à au moins un des deux parasites était de 4,3%. Elle augmente ensuite jusqu'à atteindre 15,3% en 1988. Entre 1974 et 1988, les prévalences de *T. equi* et *B. caballi* étaient de 5,35% et 3,65% respectivement. Sur la période de 1981 à 1996, elles sont de 12,2% pour *T. equi* et 9% pour *B. caballi* [107] [165].

Une étude de Le Metayer (2007) sur 18464 sérums analysés à l'aide de la microtechnique de fixation du complément, prélevés entre 1997 et 2005, montre une séroprévalence moyenne de 18,92%, dont 13,78% de positivité à *T. equi* et 9,24% de positivité à *B. caballi*. Cette étude montre aussi sur cette période une stabilisation de la prévalence moyenne de la piroplasmose, avec une augmentation de la prévalence de *T. equi*, contrebalancée par une diminution de la prévalence de *B. caballi* [107]. Toutes ces études montrent que la piroplasmose est enzootique dans les départements du sud de la France, mais aussi que l'augmentation de prévalence depuis 40 ans s'accompagne d'une remontée des parasites vers les départements plus au nord, avec une augmentation des séroprévalences dans ceux-ci (cf. Figures 20 et 21).

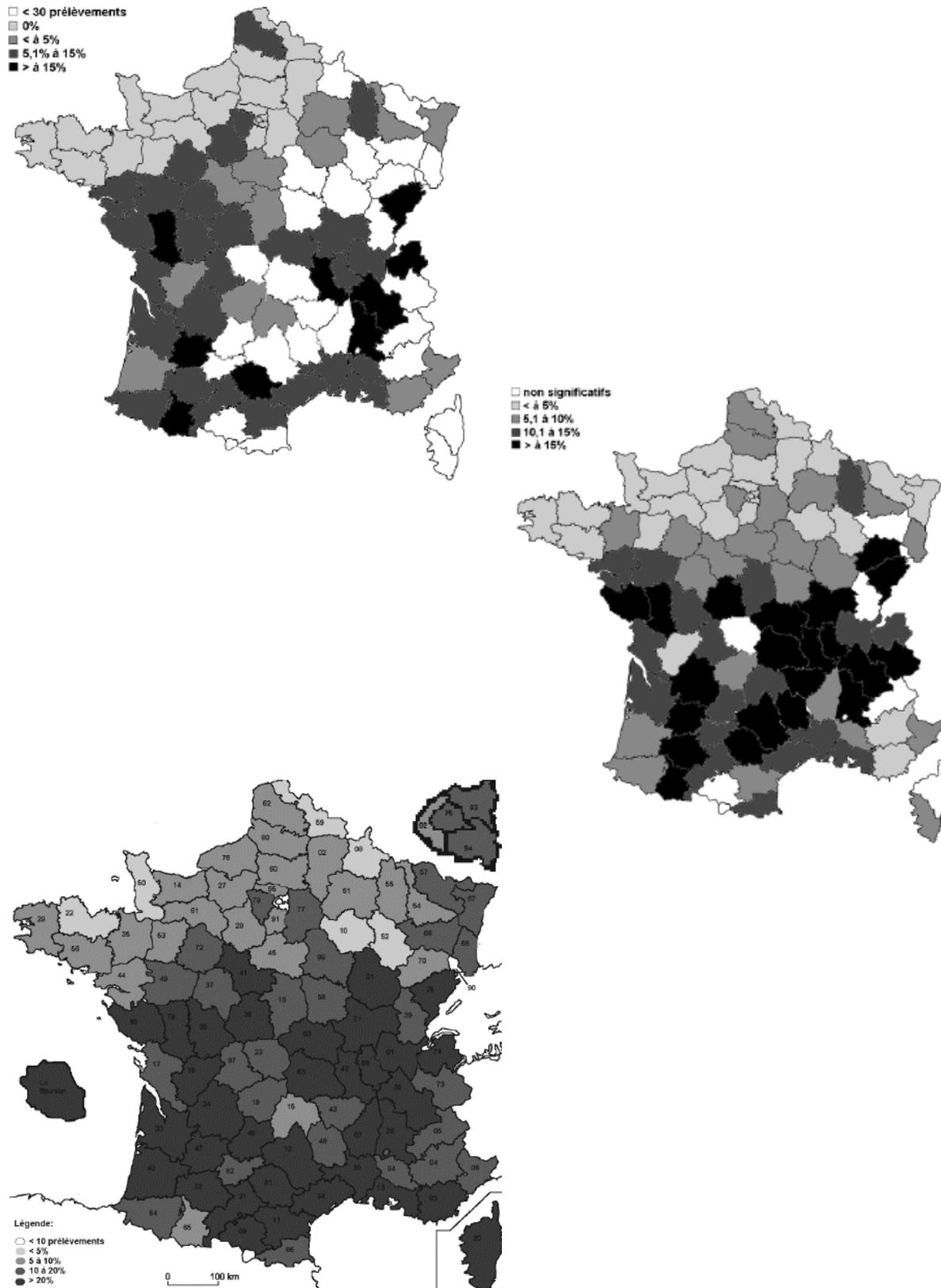


Figure 20 : Répartition géographique de la séroprévalence à *Babesia caballi* en France sur les périodes 1974-1989 (A), 1981-1996 (B) et 1997-2005 (C). [107] [165]

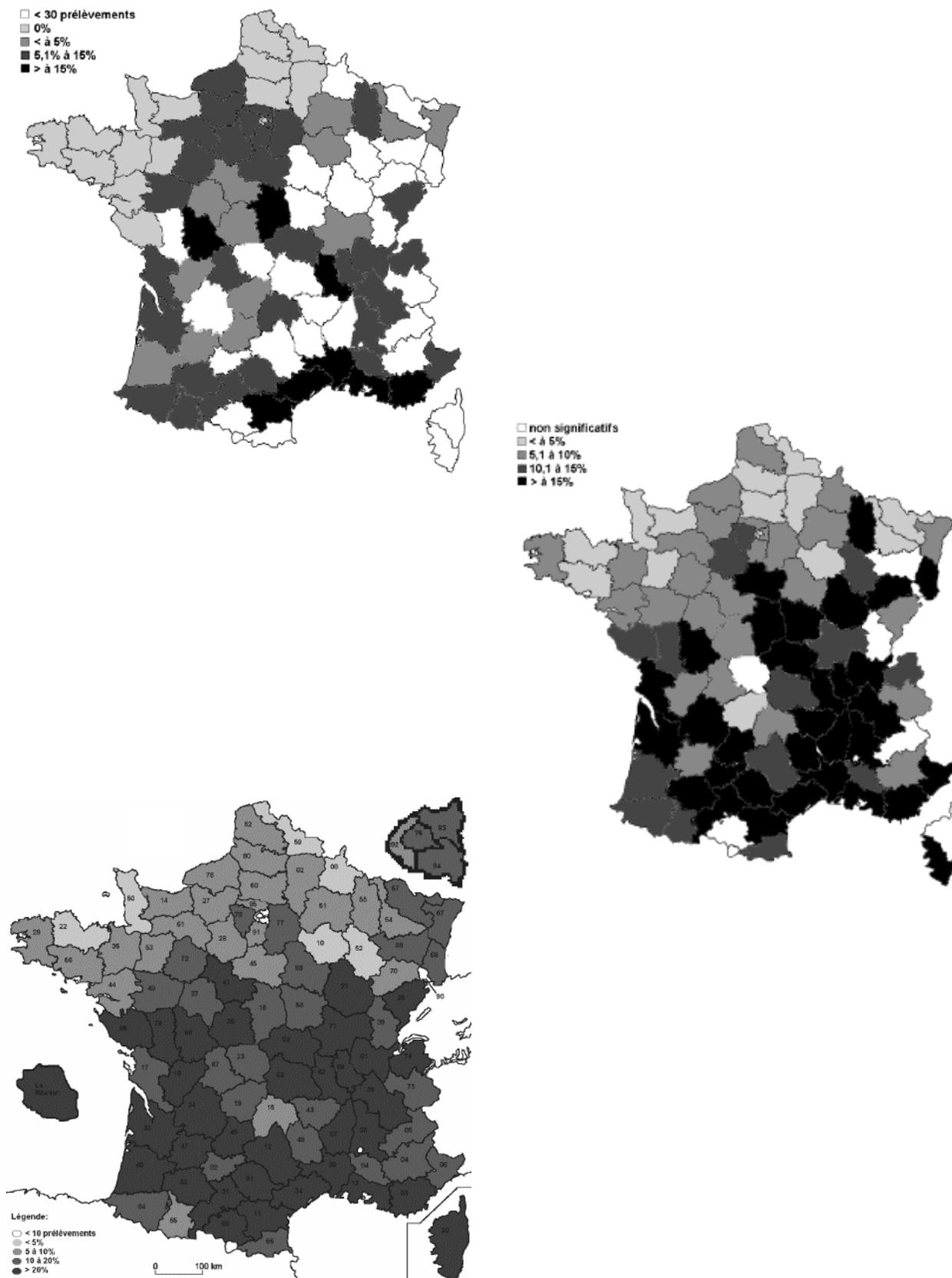


Figure 21 : Répartition géographique de la séroprévalence à *Theileria equi* en France sur les périodes 1974-1989 (A), 1981-1996 (B) et 1997-2005 (C). [107] [165]

Une étude de 2014 du RESPE et du laboratoire Frank Duncombe de Caen entre 2011 et 2012 sur 14839 chevaux sur toute la France, combinant les techniques de fixation du complément, d'immunofluorescence indirecte et d'ELISA montre une séroprévalence de *T. equi* et *B. caballi* de 27,01% et 23% respectivement [45]. Enfin, une dernière étude de 2017, compilant les données acquises par le sous-réseau « Piro-like » du RESPE entre 2013 et 2017 sur l'ensemble du territoire, montre une prévalence de *T. equi* et *B. caballi* et 30,9% et 17,1% respectivement [57].

Si les études de Soulé dans les années 1970s à 1990s portent sur plusieurs populations de chevaux (suspectée d'être infectée et non suspectée d'être infectée), il est important de prendre en compte le fait que les études du sous-réseau « Piro-like » du RESPE sont basées sur des cas déclarés par les vétérinaires de terrain, et donc sur les manifestations cliniques. De même, la population de chevaux étudiés dans l'étude de 2007 par Le Metayer est composée à la fois de chevaux chez qui une piroplasmose clinique était suspectée, et de chevaux destinés à l'exportation, tous analysés sans distinction.

Enfin, notons qu'il existe quelques études de prévalence de la piroplasmose dans des populations prises localement. L'étude de Guillot en 2002 sur une population de chevaux en Camargue montre des séroprévalences très élevées à *T. equi* et *B. caballi*, avec des taux de 67,2% et 22,8% respectivement [73].

III.B.2. Sous-réseau « Piro-like » du RESPE

Le RESPE possède actuellement dix sous-réseaux de surveillance des affections des équidés [148] :

- Respiratoire
- Avortement
- Neurologique
- Anomalie génétique
- Maladies du pâturage
- Maladies du poulain
- Reproduction
- Maladies cutanées
- Maladies réglementées
- Piro-like

Mis en place en Novembre 2013, le sous-réseau « Piro-like » a pour objectif la surveillance épidémiologique du syndrome « Piro-like », caractérisé par une hyperthermie d'origine indéterminée associée à un ou plusieurs symptômes évoquant la piroplasmose (anorexie, abattement, amaigrissement, contre-performance, etc.). En outre, il permet de fournir

aux vétérinaires de terrain un soutien technique dans le dépistage de ces affections, ainsi qu'un soutien sanitaire lors d'épizooties.

Lors d'une suspicion clinique, un vétérinaire sentinelle va pouvoir déclarer au RESPE qu'un cheval présente un syndrome « Piro-like ». Un prélèvement sanguin sera envoyé au laboratoire LABEO Frank Duncombe où le diagnostic sera fait. Une prise en charge de 50% des frais d'analyses est assurée par le RESPE dans le cadre du protocole de surveillance du syndrome « Piro-like ».

Les agents pathogènes recherchés sont ceux de :

- La piroplasmose (*T. equi* et *B. caballi*)
- L'anaplasmose (*A. phagocytophilum*)
- L'anémie infectieuse équine (*Retroviridae*)
- Le virus du West-Nile Fever (*Flavivirus*) depuis 2019

IV. Étude clinique

IV.A. Signes cliniques

IV.A.1. Incubation

Les périodes d'incubation de *B. caballi* et *T. equi* sont de 10-30 jours et 12-19 jours respectivement [49].

IV.A.2. Forme clinique suraiguë

Des formes cliniques suraiguës de piroplasmose ont été décrites. Ce sont des formes rares, touchant généralement des chevaux adultes naïfs introduits en zone de forte endémie, ou des poulains infectés *in utero*. Les chevaux touchés par cette forme foudroyante de la maladie vont être retrouvés mourant avec des défaillances organiques multiples, ou déjà morts sans signes prémonitoires. D'autres vont présenter une forme clinique proche de la forme aiguë,

mais avec une dégradation beaucoup plus rapide ainsi qu'une non-réponse aux traitements mis en place [49] [64] [182].

Chez le poulain nouveau-né, les signes cliniques apparaissent généralement dans les trois jours, quand ils ne sont pas présents dès la naissance. Ces signes cliniques sont peu spécifiques, tels que l'anémie, l'ictère, la faiblesse, l'incapacité à se lever, l'incapacité à téter, l'hyperthermie et la présence de pétéchies sur les muqueuses [49]. Il est important de faire la différence entre cette affection et l'isoérythrolyse néonatale, pour laquelle la clinique est proche, afin d'initier rapidement un traitement.

IV.A.3. Forme clinique aiguë

La forme clinique aiguë de piroplasmose est plus fréquente. Elle peut apparaître spontanément suite à une infection, ou faire suite à une rechute ou à une baisse d'immunité chez un animal porteur sain. La présentation clinique initiale est peu spécifique, avec des signes tels que de l'apathie, de l'anorexie, des œdèmes périphériques, l'intolérance à l'effort et une hyperthermie. Le cheval pourra présenter un pic d'hyperthermie assez bref (41°C-42°C sur 24 à 36h) suivi d'une température oscillant aux alentours de 40°C durant une dizaine de jours. Il semblerait que l'hyperthermie liée à une infection à *T. equi* soit plus intermittente et ne fasse pas de pic comme une infection à *B. caballi* [20] [49] [50] [63]. Pour autant, il n'est pas possible de distinguer les deux parasites sur la simple base de la présentation clinique. D'autres signes cliniques peuvent les accompagner, marquant l'anémie d'origine hémolytique, tels que les muqueuses pâles ou ictériques, la sudation, la tachycardie, la tachypnée ainsi que la pigmenturie. Il sera également possible d'observer des pétéchies sur les muqueuses dues à la thrombocytopénie et des œdèmes dans les régions déclives (œdèmes sous-orbitaux, œdème ventral, œdème des membres) une semaine à dix jours après l'infection, alors que la température redescend [49] [50] [78] [183] [190]. Certaines formes cliniques apparaissent plus modérées avec un syndrome fébrile plus intermittent, une perte de poids, des muqueuses moins pâles ou sub-ictériques. Des signes de colique ainsi que des diarrhées peuvent être également notés [49].

Sans traitement, le taux de mortalité peut dépasser les 50% pour une population de chevaux naïfs introduits en régions endémique. Un taux de mortalité de 69% a été noté chez des chevaux infectés non traités dans le sud de la France [154]. Des chevaux qui survivent à une piroplasmose à *B. caballi* pourront être en mesure d'éliminer le parasite. En revanche, si l'agent pathogène est *T. equi*, ils deviendront malades chroniques ou porteurs sains.

IV.A.4. Forme clinique chronique

Cette forme peut être d'emblée celle présentée par l'animal, ou faire suite à une forme aiguë chez un animal non traité. Les chevaux en piroplasmose clinique chronique présentent généralement un historique de signes peu spécifiques et frustes, comme décrits précédemment : hyperthermie, perte de poids, faiblesse, anorexie, etc. Ces chevaux sont généralement anémiés, ont des muqueuses légèrement pâles ou sub-ictériques, ainsi qu'une splénomégalie détectable à la palpation transrectale [49] [63] [182].

IV.A.5. Forme inapparente

Le portage sain de piroplasmes par un cheval peut être présent d'emblée, ou faire suite à une piroplasmose non détectée par le propriétaire, car subclinique, ou mal traitée. Par ailleurs, il faut noter que les traitements disponibles et utilisés aujourd'hui ne permettent pas une stérilisation complète de l'organisme. Les chevaux porteurs de *B. caballi* le restent entre 1 et 4 ans, tandis que le portage de *T. equi* dure de nombreuses années, si ce n'est toute la vie de l'animal [78]. Lors de portage asymptomatique, les parasites peuvent persister dans le sang à un taux très faible, dans la rate, ou encore dans la moelle osseuse [137] [149]. Une étude de Chevrier en 1979 montre un taux de portage sain de 2% chez des animaux cliniquement sains, et de 8% chez des animaux qui présentent des symptômes frustes, comme une baisse de forme [39].

L'existence de chevaux porteurs inapparents de piroplasmes est d'une importance capitale sur les plans clinique et épidémiologique. Cliniquement, des phases de piroplasmose clinique sont à craindre lors d'un stress, ou d'une baisse d'immunité quelle qu'en soit la raison (transport, maladie intercurrente, médicament, etc.). Une étude en Jordanie en 1997 a montré l'apparition d'épisodes cliniques chez des chevaux porteurs inapparents après un exercice intense [75]. Une autre étude de 1988 sur des ânes montre une augmentation significative de la parasitémie ainsi que de la température rectale après l'injection de betaméthasone, un glucocorticoïde, à dose immunosuppressive [132].

Épidémiologiquement, ces chevaux, bien que sains cliniquement, constituent des réservoirs de parasites. Leurs déplacements dans des régions indemnes est alors un réel risque d'introduction de la maladie. C'est ainsi que la maladie fût introduite en Floride depuis Cuba en 1959 par exemple [97].

IV.A.6. Complications

Diverses complications de piroplasmose ont été décrites [49] [50] [74] [182] [190] :

- Système digestif
 - ➔ Colique
 - ➔ Entérite catarrhale
 - ➔ Diarrhée
- Système reproducteur
 - ➔ Baisse ou perte totale de fertilité des étalons, transitoire ou permanente
 - ➔ Avortement, mortinatalité (cf. *II.E.2. Transmission transplacentaire*)
 - ➔ Production de poulains chétifs, ou qui meurent dans les jours suivant la naissance
- Système respiratoire
 - ➔ Pneumonie
 - ➔ Œdème pulmonaire [76]
- Système rénal
 - ➔ Insuffisance rénale [1] [8] [76]
- Système hépatique
 - ➔ Insuffisance hépatique [143]
- Système circulatoire
 - ➔ CIVD
 - ➔ Atteinte des cellules myocardiques et arythmie cardiaque [8] [54]
 - ➔ Vascularite [182]
- Système nerveux
 - ➔ Ataxie
 - ➔ Spasme tonico-clonique, crise épileptiforme
- Système locomoteur
 - ➔ Fourbure

IV.A.7. Diagnostic différentiel clinique

La synthèse des signes cliniques, quelle que soit leur fréquence, et des complications possibles montre que la piroplasmose est une affection aux symptômes peu spécifiques. Le symptôme le plus précoce est l'hyperthermie, concomitante à la parasitémie, suivi du syndrome hémolytique. L'ensemble des autres signes cliniques et complications, inconstamment visibles,

ne sont que les conséquences de ce syndrome hémolytique et de la faiblesse engendrée chez le cheval atteint. Ainsi, dans le diagnostic de piroplasmose par le vétérinaire, les données épidémiologiques à confronter aux données cliniques sont essentielles :

- La piroplasmose est-elle présente/fréquente dans cette région ?
- Le cheval vit-il dans un environnement propice à une piqure de tique (boisements, ...) ?
- Une rechute de piroplasmose chronique/inapparente est-elle possible ?
- Est-ce un cheval provenant d'une région indemne ?

C'est ainsi qu'a été créé la notion de syndrome « Piro-like », regroupant les affections « ressemblant cliniquement à une piroplasmose ». Ce seront la plupart du temps ces affections qui entreront dans le diagnostic différentiel d'une présentation clinique de piroplasmose. Les affections du syndrome « Piro-like » et leur diagnostic clinique différentiel sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau IV : Diagnostic différentiel des affections « Piro-like ». [53]

	Piroplasmose	Borréliose de Lyme	Leptospirose	Anaplasmose	AIE	AVE
<i>Syndrome fébrile</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Amaigrissement</i>	X	X			X	
<i>Œdèmes</i>	X			X	X	X
<i>Ictère</i>	X			X	X	
<i>Pétéchies</i>	X			X	X	
<i>Uvéite</i>		X	X			
<i>Signes neurologiques</i>	X	X		X	X	
<i>Avortement Mortinatalité</i>	X	X	X			X
<i>Raideur Myalgie</i>	X	X		X		
<i>Autre</i>		Boiterie Fourbure		Orchite Arythmie cardiaque		Jetage Larmolement

AIE = Anémie Infectieuse Equine ; AVE = Artérite Virale Equine

IV.B. Pathogénie

IV.B.1. Mécanismes pathologiques

Le principal mécanisme pathologique de la piroplasmose est l'anémie d'origine hémolytique. Cette hémolyse a deux origines : intravasculaire et extravasculaire. L'hémolyse extravasculaire est assurée par les macrophages spléniques qui retirent les érythrocytes infectés de la circulation sanguine [15] [182] [184].

Par ailleurs, il a été démontré que l'infection des érythrocytes par *T. equi* menait à des modifications biochimiques importantes, avec une augmentation du nombre de protéines membranaires, une augmentation de la quantité de phospholipides membranaires, une augmentation de la concentration plasmatique en malondialdéhyde et une baisse de la concentration sanguine en hémoglobine. Les modifications biochimiques membranaires des érythrocytes sont à l'origine d'une rigidification membranaire et d'une baisse de déformabilité. L'augmentation de la concentration plasmatique en malondialdéhyde marque l'augmentation des processus de peroxydation des lipides, amenant à une concentration d'ions oxydatifs à l'origine de la lyse cellulaire [15] [143] (cf. Figure 22). Par ailleurs, il a été noté une hypophosphatémie lors de piroplasmose. Il est décrit chez d'autres espèces comme les bovins, ou dans les cas de malaria humaine, qu'une hypophosphatémie est un facteur aggravant d'hémolyse. L'inhibition du métabolisme du glycéraldéhyde-3-phosphate a pour conséquence une diminution de l'ATP disponible et une fragilisation des membranes cellulaires [50]. Cette hémolyse intravasculaire sera aussi à l'origine de l'ictère, remarquable chez les chevaux en piroplasmose aiguë, par augmentation de la concentration sanguine en bilirubine non conjuguée. La libération dans le sang d'hémoglobine et de bilirubine sera aussi à l'origine de la pigmenturie.

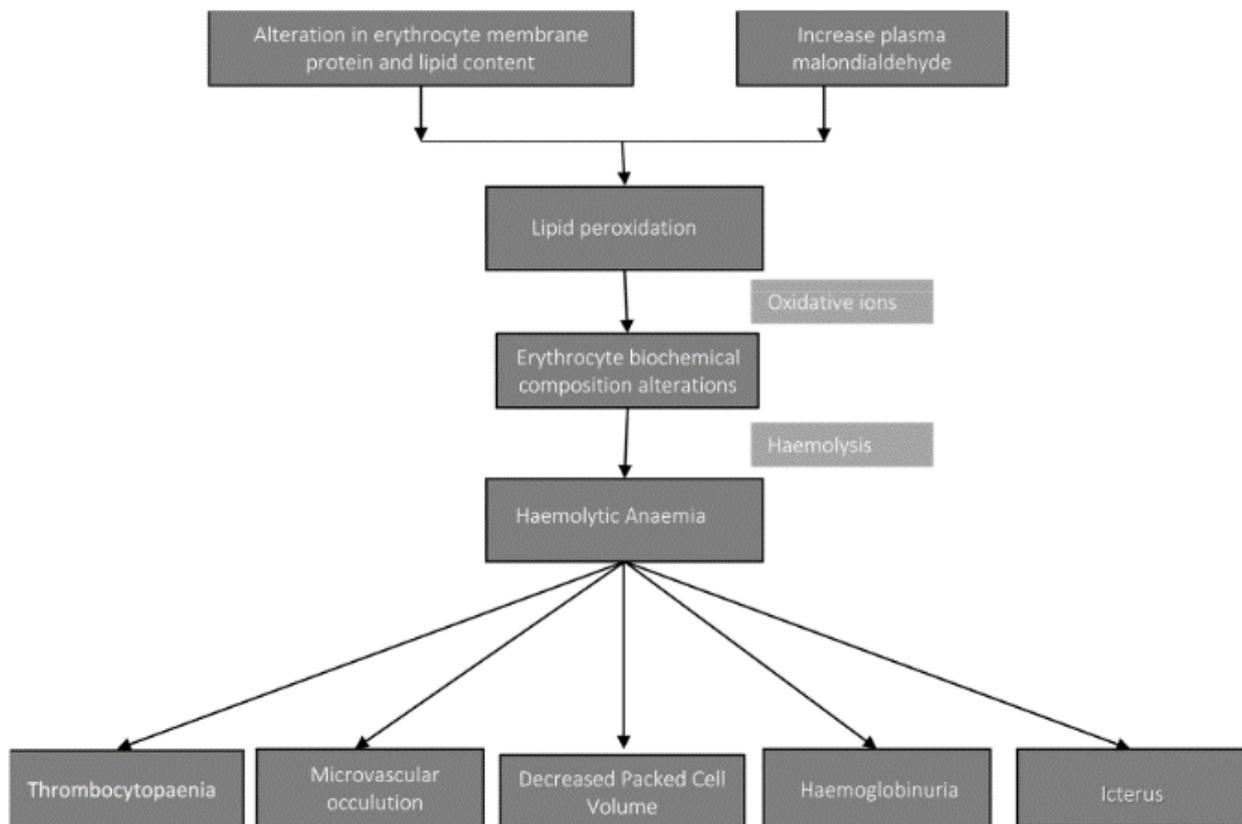


Figure 22 : Physiopathologie de l'anémie hémolytique lors de piroplasmose équine. [133]

L'atteinte rénale sera la conséquence de plusieurs phénomènes pathologiques. La libération de pigments suite à l'hémolyse est à l'origine d'une néphropathie pigmentaire. Les troubles circulatoires aboutissant à une hypotension rénale et donc une baisse de filtration glomérulaire renforcent l'insuffisance rénale [8]. Diverses atteintes du rein pourront être notées. En 2017, Adam *et al.* décrivent un cheval hongre de 13 ans atteint de piroplasmose à *B. caballi* présentant une glomérulonéphrite membrano-proliférative, une néphrite interstitielle, ainsi qu'un œdème périrénal et interstitiel [1].

L'atteinte circulatoire est caractérisée par une altération des mécanismes de coagulation et de la microvascularisation. En effet, la baisse de déformabilité des érythrocytes va contribuer à la mise en place d'une stase sanguine au sein de la microvascularisation [15]. De plus, la formation de microthrombi va renforcer ces défauts de vascularisation et pourra être à l'origine de vascularites. Des phénomènes de CIVD ont été décrits, bien que le mécanisme exact de leur mise en place reste hypothétique : destructions plaquettaires par le dépôt de complexes immuns à leur surface, séquestration des plaquettes par la rate, excès de consommation des plaquettes par la formation de nombreux microthrombi dans le système circulatoire [182].

Cet important défaut circulatoire engendrera des défaillances organiques multiples, telle que l'atteinte neurologique par anoxie tissulaire. L'inflammation généralisée sera à l'origine des troubles digestifs, hépatiques, pulmonaires, cardiaques, etc. L'endotoxémie résultant des troubles digestifs pourront être à l'origine de fourbure et d'un état de choc. C'est cette

défaillance multiple avec état de choc qui est supposée être la cause de la forme suraiguë de piroplasmose avec mort rapide des animaux atteints [1] [154] [182].

IV.B.2. Mécanismes immunitaires

IV.B.2.a. Immunité innée

L'immunité innée, première ligne de défense lors d'infection, assure un rôle essentiel dans l'immunité des chevaux face à la piroplasmose, bien que les mécanismes exacts entrant en jeu ne soient pas tous élucidés. La rate possède un rôle essentiel dans le contrôle de la parasitémie. Des études menées chez des chevaux splénectomisés montrent des parasitémies bien plus élevées que chez des chevaux normaux, allant jusqu'à plus de 80%, ainsi que des taux de mortalité bien supérieurs [15] [94]. Or nous avons vu précédemment que ce sont les macrophages spléniques qui assurent le retrait des érythrocytes infectés de la circulation sanguine. Le rôle exact des cellules de l'immunité innée, telles que les macrophages, les granulocytes ou les cellules Natural Killer (NK) n'est cependant pas connu [133].

Le monoxyde d'azote (NO) produit par les macrophages, les mastocytes et les neutrophiles activés possède un rôle important, à la fois dans l'immunité et dans les mécanismes pathologiques. En effet, si son activité antimicrobienne et anticellulaire aurait pour rôle la défense non spécifique de l'organisme, par destruction des cellules infectées, sa production en quantité trop importante a pour conséquence un stress oxydatif à l'origine des mécanismes pathologiques décrits précédemment (hémolyse, glomérulopathie, etc.) [40] [76] [143]. D'autres facteurs impliqués dans les mécanismes immunitaires, telles que les cytokines, interviennent dans la physiopathologie des infections à piroplasmes. Différentes études s'intéressant aux médiateurs de l'inflammation ont pu mettre en évidence l'intervention des cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 β , IL-12 α , IL18, mais aussi de l'interféron- γ (IFN- γ), du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et des acides sialiques [76] [122]. Si leur rôle exact n'est pas entièrement élucidé, il est supposé que ces facteurs indispensables au bon fonctionnement de l'immunité de l'hôte interviennent également dans les mécanismes pathologiques de la maladie :

- glomérulopathie par TNF- α et INF- γ
- œdème pulmonaire par l'inflammation généralisée médiée par les cytokines et lésions endothéliales causées par le NO
- atteinte hépatique, cardiaque
- etc.

IV.B.2.b. Immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative est elle aussi indispensable au contrôle de l'infection. En effet dans une étude, Knowles *et al.* (1994) montrent chez des poulains SCID (Severe Combined Immune Deficiency) l'incapacité de contrôler l'infection à *T. equi*. Chez ces poulains, les lymphocytes T et B sont incapables de répondre à un antigène, mais le système immunitaire inné fonctionne normalement [94].

Par ailleurs, on peut noter qu'il n'y a pas d'immunité croisée entre *T. equi* et *B. caballi*.

- *La réponse immunitaire à médiation cellulaire*

La participation d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire a été démontrée en 1977 par Banerjee *et al.* Une injection sous-cutanée d'une préparation d'antigène de *T. equi* entraîne une réaction d'hypersensibilité cutanée retardée, avec infiltration de cellules mononucléées et œdème sous-cutané [22]. Par ailleurs, les lymphocytes parasités par des schizontes de *T. equi* semblent stimuler la prolifération des lymphocytes sanguins de l'hôte. Ces lymphocytes sanguins quant à eux ont montré *in vitro* la capacité à inhiber la croissance des cellules lymphoblastoïdes parasitées, bien que les mécanismes exacts de ces phénomènes ne soient pas connus [191]. La réponse immunitaire à médiation cellulaire apparaît donc indispensable dans la lutte contre l'infection aux piroplasmes, par la mise en place de systèmes de lutte contre les cellules infectées.

- *La réponse cellulaire à médiation humorale*

La réponse immunitaire à médiation humorale semble tout aussi importante dans la pathogénie de la piroplasmose équine. Deux éléments ont été identifiés comme les antigènes immunodominants de *T. equi* : les protéines de surface des mérozoïtes *equine merozoite antigen*, EMA-1 et EMA-2. Ces protéines sont à l'origine d'une réponse immunitaire à médiation humorale, avec l'apparition d'anticorps spécifiques [95] [96] [127]. Sept gènes codant pour des chaînes lourdes d'immunoglobulines de type G (IgG) ont été décrits dans l'espèce équine. Les anticorps IgGa (désormais IgG1) et IgGb (désormais IgG4 et IgG7) sont majoritairement présents durant la phase aiguë de l'infection, tandis que les anticorps IgG(T) (désormais IgG5 et IgG3) sont majoritaires durant la phase d'infection chronique [44] [133].

La réponse immunitaire humorale à une infection à *B. caballi* est moins bien connue. L'hôte produit des anticorps anti-RAP-1 (Rhoptry Associated Protein 1) utilisés pour les tests sérologiques [182].

- *Cinétique des anticorps* [35] [51] [169]

L'évaluation de l'évolution du taux d'anticorps dans le temps, en réponse à une infection par des piroplasmies, est une mesure dépendante de la méthode utilisée. En effet, en fonction de celle-ci et de sa sensibilité, les résultats obtenus présenteront quelques variations. Dans l'étude de Tenter *et al.* de 1986, les anticorps suite à une infection à *T. equi* sont détectés entre 11 et 20 jours post-infection par la méthode de fixation du complément, et entre 7 et 14 jours par la méthode d'immunofluorescence indirecte. Pour *B. caballi*, les premiers anticorps sont détectés entre 10 et 11 jours post-infection par immunofluorescence indirecte, et entre 13 et 15 jours par fixation du complément. Les études tendent à montrer un pic dans le taux d'anticorps 30 à 45 jours post-infection. Enfin, la persistance des anticorps semble être liée au statut porteur du cheval. Tant que le cheval infecté est porteur du parasite, le taux d'anticorps va diminuer après le pic mais des anticorps resteront détectables par des méthodes suffisamment sensibles, même longtemps après, comme le montre l'étude de Tenter où des anticorps anti-*Theileria* et anti-*Babesia* restent détectables 455 jours et 190 post-infection respectivement. C'est probablement ainsi, grâce à ces réinfections régulières qu'est entretenue l'immunité des animaux vivant en région endémique. Cette cinétique d'anticorps en fonction des techniques sera plus détaillée par la suite.

IV.B.2.c. Transfert passif d'immunité

En 2012, Mealey *et al.* ont montré que le transfert de plasma hyperimmun chez des poulains SCID permettait de retarder le moment d'apparition du pic de parasitémie de *T. equi* [117]. Cette étude démontre l'importance des anticorps et de l'immunité humorale dans la protection contre la piroplasmose. Ce transfert passif a toute son importance pour les poulains, au système immunitaire encore immature. En région d'endémie, une partie des poulinières seront porteuses d'au moins un des parasites, et présentent donc des anticorps. Ceux-ci seront ingérés par le poulain via le colostrum, et permettront une protection durant les 1 à 5 premiers mois de vie, voire jusqu'à 9 mois. Le taux d'anticorps d'origine maternelle diminuera ensuite progressivement [55] [183].

IV.C. Lésions

IV.C.1. Lésions macroscopiques

Les lésions remarquables à l'autopsie sont directement dépendantes de la sévérité de l'atteinte, et des complications [49] [152] [182] :

- Tissus anémiés
- Œdème sous-cutané et des tissus sous-séreux
- Splénomégalie
- Congestion splénique
- Maigreur plus ou moins sévère
- Hépatomégalie
- Hypertrophie des nœuds lymphatiques
- Reins hypertrophiés et décolorés
- Épanchements (hydrothorax, hydropéritoine, hydropéricarde)
- Hémorragies épi- et endocardiques
- Œdème pulmonaire
- Congestion plus ou moins généralisée

IV.C.2. Lésions histopathologiques

Les lésions histopathologiques seront-elles aussi diverses, en fonction de la sévérité de la maladie et des complications [49] [152] [182] :

- Congestion et œdème pulmonaire
- Hemosidérophages dans les parois des alvéoles pulmonaires
- Néphrite interstitielle
- Nécrose tubulaire rénale
- Dégénérescence hydropique des cellules de l'épithélium tubulaire rénal
- Dégénérescence graisseuse des cellules de l'épithélium tubulaire rénal
- Inclusions d'hémoglobine et protéiques des tubules rénaux du cortex et de la médulla
- Nécrose centro-lobulaire du foie
- Stase biliaire
- Microthrombi dans le foie et les poumons
- Infiltrations des reins, du foie, des poumons et nœuds lymphatiques par des cellules immunitaires du système réticulo-endothélial.

IV.D. Modifications hémato-biochimiques

IV.D.1. Modifications hématologiques

IV.D.1.a. Modifications de la lignée érythrocytaire

Les modifications prédominantes seront liées au syndrome hémolytique. La numération formule sanguine (NFS) montrera une anémie plus ou moins marquée en fonction de la sévérité de la maladie, avec une diminution du comptage érythrocytaire, une baisse de la concentration en hémoglobine, ainsi qu'une baisse de l'hématocrite. Les modifications du VGM, du TCMH et du CCMH sont plus variables [35] [51] [182] [190]. Ainsi, en fonction de la sévérité du syndrome hémolytique, cette anémie pourra être qualifiée de normochrome, hypochrome, normocytaire, ou macrocytaire [114] [157].

IV.D.1.b. Modifications des lignées leucocytaires et thrombocytaires

Lors d'infection aiguë, il est fréquent de voir à la NFS une formule leucocytaire avec lymphopénie et neutropénie [49] [182] [190]. D'autres anomalies peuvent être notées, mais celles-ci sont variables en fonction de la sévérité de l'atteinte, ainsi que du stade de la maladie. L'étude de Rudolph *et al.* en 1975 montre chez des chevaux en phase aiguë, infectés expérimentalement, une augmentation des granulocytes neutrophiles les 24 premières heures post inoculation, puis une diminution les jours suivants. Les cellules monocytaires augmentent au fur à et mesure des jours, suivant la parasitémie. Les autres cellules leucocytaires ont quant à elles des comportements variables. Le nombre total de leucocytes présentant globalement une diminution les 48 premières heures, puis un pic au 5^e jour, pour diminuer de nouveau ensuite [157]. Chez des porteurs inapparents chroniques, il sera possible de ne noter qu'une diminution de la numération granulocytaire [114].

Il sera également fréquent de trouver une thrombocytopénie, bien que les mécanismes y aboutissant ne soient pas encore entièrement élucidés [182] :

- Dépôt de complexes immuns et lyse cellulaire ?
- Séquestration par la rate ?
- Excès de consommation ?

IV.D.2. Modifications biochimiques

IV.D.2.a. Modifications de la bilirubine et des paramètres inflammatoires généraux

Le changement biochimique le plus fréquent sera l'hyperbilirubinémie, conséquence directe de l'hémolyse par libération puis oxydation de l'hème de l'hémoglobine. D'autres modifications telles que l'augmentation du fibrinogène sanguin peuvent être notées [51] [182]. Il a récemment été montré un lien entre l'augmentation des acides sialiques, marqueurs de l'inflammation aiguë, et le niveau de parasitémie des chevaux atteints de piroplasmose, bien que le mécanisme à l'origine de ce changement ne soit pas connu [122].

IV.D.2.b. Modifications des protéines sériques

Le dosage des protéines sériques va donner un résultat qui pourra être variable. Il est fréquent de trouver une hypoalbuminémie lors de piroplasmose. Cependant il est également fréquent de noter une augmentation de la fraction des globulines. Le rapport [Albumine / Globulines] sera ainsi diminué lors de piroplasmose. Par ailleurs, il faut rester prudent avec ces variations qui sont dépendantes de l'état physiologique ou pathologique de l'animal. Le régime alimentaire, l'état général, les infections concomitantes, et l'état d'hydratation sont autant de paramètres pouvant faire varier le dosage des protéines sériques [7] [133] [187].

Une étude de 2010 sur le profil électrophorétique des protéines sériques de chevaux atteints de piroplasmose clinique montre qu'il est fréquent lors de piroplasmose de trouver une augmentation des γ -globulines, parfois associée à une augmentation des α_2 -globulines (cf. Figure 23). Ces modifications restent cependant assez peu spécifiques. Les modifications du profil des α_2 -globulines est un marqueur de l'inflammation aiguë, bien qu'une atteinte rénale ou hépatique puisse donner les mêmes changements. La modification du profil des γ -globulines est à relier à la réponse immunitaire à médiation humorale mise en place par l'organisme. Par ailleurs, il est possible que ces changements soient trop peu marqués pour être détectés par les techniques d'électrophorèse utilisées en routine [23].

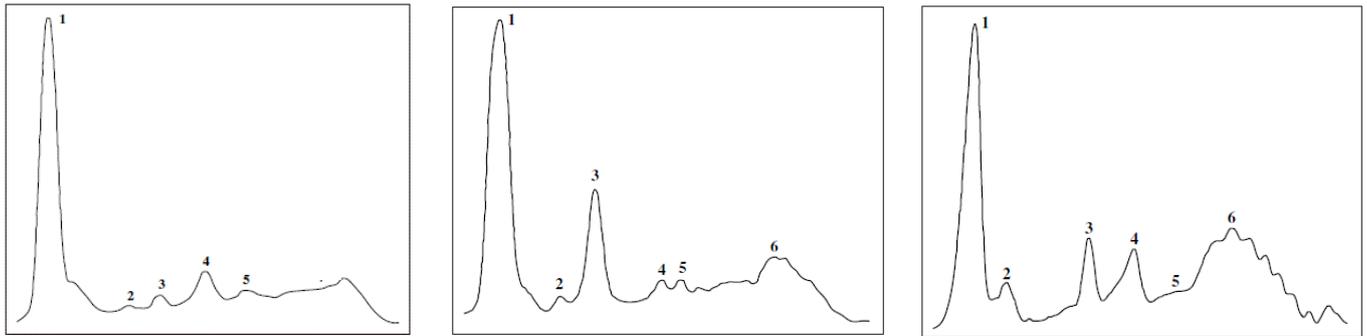


Figure 23 : Profil électrophorétique des protéines sériques de 3 chevaux. [23]

A : cheval sain

B ; C : chevaux atteints de piroplasmose clinique

1 : Albumine
2 : α_1 -globulines

3 : α_2 -globulines
4 : β_1 -globulines

5 : β_2 -globulines
6 : γ -globulines

B : augmentation des α_2 -globulines

C : augmentation des γ -globulines

IV.D.2.c. Modifications des paramètres hépatiques

Des modifications dans les concentrations en enzymes hépatiques peuvent également être notées : augmentation des aspartate aminotransférases (AST), gamma-glutamyltransférases (GGT), alanine aminotransférases (ALT), créatine kinases (CK), phosphatases alcalines (PAL/ALP), lactate déshydrogénases (LDH), et en particulier LDH5, isoenzyme impliquée dans les pathologies hépatiques [35] [133] [143] [182]. Ces changements sont attribuables à la souffrance tissulaire hépatique, due à la nécrose centrolobulaire des hépatocytes, par diminution de l'apport sanguin.

Il sera également possible de noter une augmentation du cholestérol, des triglycérides, des HDL et LDL, bien que le mécanisme exact qui en est à l'origine dans l'espèce équine ne soit pas connu [7] [187].

IV.D.2.d. Modifications des paramètres rénaux

Lors d'atteinte rénale, la biochimie sanguine montre une augmentation de l'urée et de la créatinine [1]. Ces marqueurs peuvent cependant rester dans des valeurs normales lors d'atteinte rénale légère. Dans une étude de 2020, Ahmadpour *et al.* montrent que la cystatine-

C semble être un meilleur marqueur que la créatinine lors d'atteinte rénale : indépendante du sexe, de l'activité, de la masse corporelle, de l'hydratation, la concentration de cette protéine augmente 1 à 2 jours plus tôt que la créatinine lors d'atteinte rénale aiguë [8].

Une analyse urinaire montrera également diverses modifications. Outre la pigmenturie visible macroscopiquement, on pourra observer des érythrocytes, des leucocytes et des cellules épithéliales dans l'urine. La clairance de la créatinine sera fortement diminuée, marquant la baisse de filtration glomérulaire, et les fractions d'excrétion ionique pourront également être modifiées. L'augmentation du ratio [GGT / créatinine] et la protéinurie signent la glomérulonéphrite, et les dommages des tubules proximaux [1].

IV.D.2.e. Modifications des paramètres cardiaques et circulatoires

Les lésions myocardiques, qu'elles soient dues aux lésions endothéliales, à la CIVD ou à l'hypoxie tissulaire, sont évaluées par l'augmentation de la Troponine cardiaque I (TC-I), enzyme hautement spécifique. Ahmadpour *et al.* (2020) ont montré une concentration en TC-I près de 6 fois supérieure chez les animaux malades de piroplasmose que chez les animaux sains. D'autres marqueurs sont également sujets à variation lors de piroplasmose, tels que l'homocystéine et la bande myocardique de la créatine-kinase, généralement dosées avec la TC-I car dépendant d'autres facteurs non cardiaques.

Les D-dimères, produits de dégradation de la fibrine, apparaissent également augmentés chez les animaux atteints de piroplasmose. Cette augmentation est à mettre en lien avec les altérations des processus de coagulation, et l'apparition des complications circulatoires telles que la CIVD [8].

IV.D.2.f. Modification du profil en oligo-éléments

Les modifications de la concentration sérique en oligo-éléments semblent être assez variables. Il a été rapporté une augmentation du fer (Fe), lié à l'hémolyse, celle-ci pouvant être masquée par la séquestration du fer à cause de l'inflammation [99] [187].

Une étude de 2008 montre une élévation du cuivre (Cu) et une diminution du zinc (Zn) chez des chevaux atteints de piroplasmose [52], résultats qui diffèrent avec les études de Zaemi *et al.* de 2016 et de Koenhemi *et al.* de 2018, qui ne notent pas de changements pour le zinc, et une augmentation pour le cuivre [99] [187]. Il a également été noté une baisse du magnésium (Mg) et du manganèse (Mn) [99] [187].

V. Diagnostic de certitude

Nous avons vu dans l'étude clinique que la piroplasmose est une affection qui se caractérise par des signes peu spécifiques. Le vétérinaire devra donc confronter les données cliniques non spécifiques qui lui sont présentées (abattement, faiblesse, anémie, etc.), aux données épidémiologiques dont il dispose (région à tiques, saison, climat, environnement favorable, etc.), ainsi qu'aux résultats des examens complémentaires éventuellement mis en œuvre (anémie, hyperbilirubinémie, etc.). C'est ainsi que sera posée l'hypothèse diagnostique de piroplasmose. En revanche, d'autres examens devront être mis en œuvre lorsqu'il souhaitera poser un diagnostic de certitude.

V.A. Anciennes méthodes

V.A.1. Transfusion de sang total

Aussi appelé isotest, cette méthode consiste à prélever le sang d'un cheval suspect et à l'injecter à un cheval sain. La quantité de sang à transfuser est grande (au moins 500 mL), et le cheval sain peut être splénectomisé, afin d'exacerber les signes cliniques s'ils doivent apparaître. Le cheval transfusé est ensuite mis sous étroite surveillance. L'apparition de signes cliniques et l'observation du parasite par la réalisation fréquente de frottis sanguins permettent la confirmation du diagnostic. Il s'agit d'une méthode plutôt ancienne qui n'est plus utilisée aujourd'hui [63].

V.A.2. Utilisation de tiques vectrices

Proche de la méthode précédente, et appelée xénotest, celle-ci consiste à nourrir des tiques vectrices sur un animal suspect. Le parasite est ensuite identifié soit dans les tiques directement, soit par contamination d'un cheval sain. C'est également une méthode désormais peu utilisée [63].

V.B. Observation directe du parasite

V.B.1. Culture *in vitro*

Plusieurs techniques de culture *in vitro* des parasites de la piroplasmose ont été décrites. A partir d'un échantillon sanguin, sur un milieu approprié et généralement enrichi il est possible de cultiver et ainsi augmenter le nombre de parasites initialement présents. Cette méthode possède toutefois l'inconvénient d'être longue étant donné que, selon le protocole utilisé, il faut entre 6 et 28 jours pour avoir un premier résultat [79] [192]. Cela en fait donc une méthode assez peu adaptée à la pratique de terrain, bien qu'elle fût utilisée dans des études pour diagnostiquer des chevaux porteurs du parasite négatifs aux tests sérologiques [80].

En revanche, c'est une méthode couramment utilisée en recherche, afin d'augmenter la taille d'un échantillon de parasite, pour l'analyse génétique et moléculaire, la production d'antigènes ou encore l'atténuation de la virulence des souches [159] [193]. En effet, lors d'épisode clinique, la parasitémie est généralement basse. Il est fréquent pour *B. caballi* d'avoir une parasitémie inférieure à 0,1%, bien que des cas de parasitémie de 10% aient été rapportés. Pour *T. equi*, la parasitémie est généralement comprise entre 1% et 5%, certains cas aigus ayant présenté des parasitémies supérieures à 20% [49].

V.B.2. Étalement sanguin

L'étalement sanguin est la technique de laboratoire la plus simple à mettre en œuvre, ne nécessitant qu'une lame, un microscope et une goutte de sang. La goutte de sang est étalée et colorée, le plus souvent par une coloration Romanosky, de type Giemsa 10% [153]. On recherche au microscope les formes intracellulaires caractéristiques des parasites déjà présentées précédemment (cf. Figures 5 et 7) :

- Croix de Malte
- Piriforme
- Bigéminée
- Etc.

Cette technique présente l'avantage d'être simple, rapide à mettre en œuvre et peu coûteuse. La sensibilité de cette technique est entre 10^{-5} et 10^{-6} , ce qui signifie qu'une parasitémie avec un parasite tous les 10^5 à 10^6 érythrocytes peut être détectée. On considère qu'un observateur expérimenté, au grossissement x400 scanne 10^6 érythrocytes en dix minutes [30]. Plus la parasitémie sera élevée, plus la détection sera facile, c'est pourquoi cette méthode est plus efficace sur les animaux en phase clinique aiguë, avant que la parasitémie ne redescende [153]. Il est rare d'observer au microscope des parasites chez des animaux porteurs sains, chez qui la parasitémie est très basse et pour lesquels des examens plus sensibles sont donc

recommandés [145]. A partir du moment où le parasite est vu, le diagnostic de certitude peut être posé quant au portage. Si le parasite n'est pas observé, il sera nécessaire d'effectuer d'autres examens de laboratoire plus sensibles.

V.B.3. Immunofluorescence directe

Le test d'immunofluorescence directe consiste en l'observation d'une réaction anticorps-antigène spécifique. Après étalement d'une goutte de sang de l'animal suspect sur une lame dégraissée, on dépose une solution contenant des anticorps anti-*Babesia* marqués à la fluorescéine. La lame est observée au microscope sous lumière ultraviolette, et l'observateur note la fluorescence observée [150]. Comme pour l'étalement sanguin, c'est une méthode assez peu sensible pour laquelle une parasitémie relativement élevée est nécessaire. C'est pourquoi elle doit être mise en œuvre en phase clinique aiguë. C'est par conséquent une méthode peu utilisée en routine.

V.C. Méthodes sérologiques

Les méthodes sérologiques reposent sur la mise en évidence de la réaction immunitaire provoquée par le parasite. Ainsi, on ne détecte et on n'observe pas l'agent pathogène directement, mais les anticorps produits par l'organisme, ou le fonctionnement du système du complément.

V.C.1. Fixation du complément

La méthode de fixation du complément a été instaurée en 1969 comme le test de référence pour l'importation des équidés aux États-unis, et a également été instaurée dans divers autres pays indemnes de piroplasmose [169]. Bien que plusieurs protocoles existent, le principe de cette méthode reste le même : tester le fonctionnement des éléments du complément lors d'une réaction anticorps-antigène spécifique (cf. Figure 24).

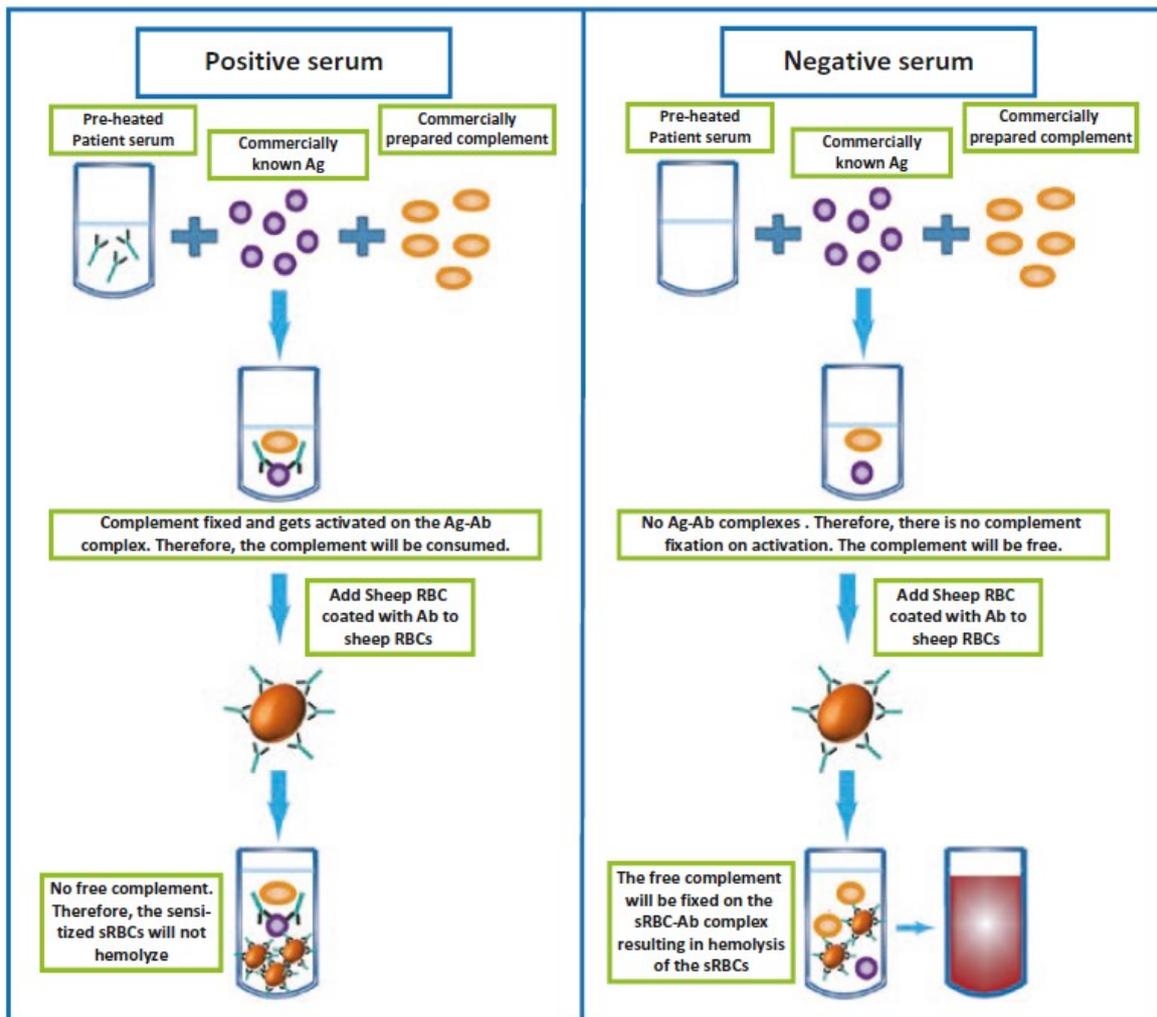


Figure 24 : Principe général du test de fixation du complément. [9]

Un animal suspect possédant des anticorps spécifiques à l'antigène testé, ici un antigène de *B. caballi* ou *T. equi*, va être capable de consommer les éléments du complément mis en présence dans la solution. Un mélange d'hématies et d'anticorps anti-hématie est ensuite ajouté à la solution (généralement hématies de mouton). Si les éléments du complément sont consommés par la réaction anti-*Babesia*, les hématies de mouton ne seront pas hémolysées par manque de complément. S'il reste des éléments du complément libres car le cheval suspect ne possède pas d'anticorps anti-*Babesia*, ceux-ci seront consommés par le complexe anticorps-antigène des hématies de mouton, résultant en une hémolyse, partielle ou complète. C'est ainsi qu'est évalué le résultat du test. L'hémolyse est évaluée par un pourcentage en 5 paliers (cf. Tableau V), allant de 0% à 100% codés par des +. On considère le test positif si à la dilution 1:5 l'hémolyse est inférieure à 50%.

Tableau V : Interprétation des résultat du test de fixation du complément. [33]

Pourcentage d'hémolyse	Codification du résultat	Résultat du test
0%	++++	POSITIF
25%	+++	POSITIF
50%	++	POSITIF
75%	+	NÉGATIF
100%	Hémolyse complète	NÉGATIF

Les anticorps commencent à être détectés 5 à 8 jours après infection, et augmentent pour atteindre un pic entre 15 jours et 2-3 mois post-infection. Après ce pic, le titre en anticorps va diminuer régulièrement jusqu'à atteindre un plateau, perdurant durant toute la durée du portage du parasite, ou trop faible pour être détecté par cette méthode [78][181]. Si l'animal atteint élimine le parasite, ou qu'un traitement permet la stérilisation de l'organisme, il redeviendra négatif 3 à 15 mois après, lors d'infection à *B. caballi*, ou 24 mois après pour *T. equi* [33].

Quelques inconvénients sont à prendre en compte lors de l'utilisation de ce test. Tout d'abord, bien que plus sensible que l'observation microscopique directe du parasite, plusieurs résultats faussement négatifs ont été rapportés lors de plusieurs études [30] [33] [169]. L'une des raisons expliquant ce manque de sensibilité est la présence lors d'infection chronique chez le cheval d'IgG(T) ne fixant pas le complément. Par ailleurs, bien que très spécifique, des réactions croisées entre antigène de *T. equi* et antiserum de *B. caballi* ont été rapportées [55]. Enfin, c'est une méthode nécessitant l'utilisation d'antigènes connus, produits artificiellement (*in vivo* ou *in vitro*), ce qui est coûteux. Pour toutes ces raisons, le test de fixation du complément n'est plus considéré comme la méthode de référence lors de mouvements d'équidés.

V.C.2. Immunofluorescence indirecte : IFI

Le test d'IFI a été mis en place en complément du test de fixation du complément, quand ce dernier donnait des résultats non concluants. Plusieurs protocoles existent pour la préparation des solutions et des réactifs, mais le principe général de cette méthode reste le même. Il repose sur la mise en évidence et la visualisation indirecte des anticorps anti-*Babesia* ou anti-*Theileria* (cf. Figure 25).

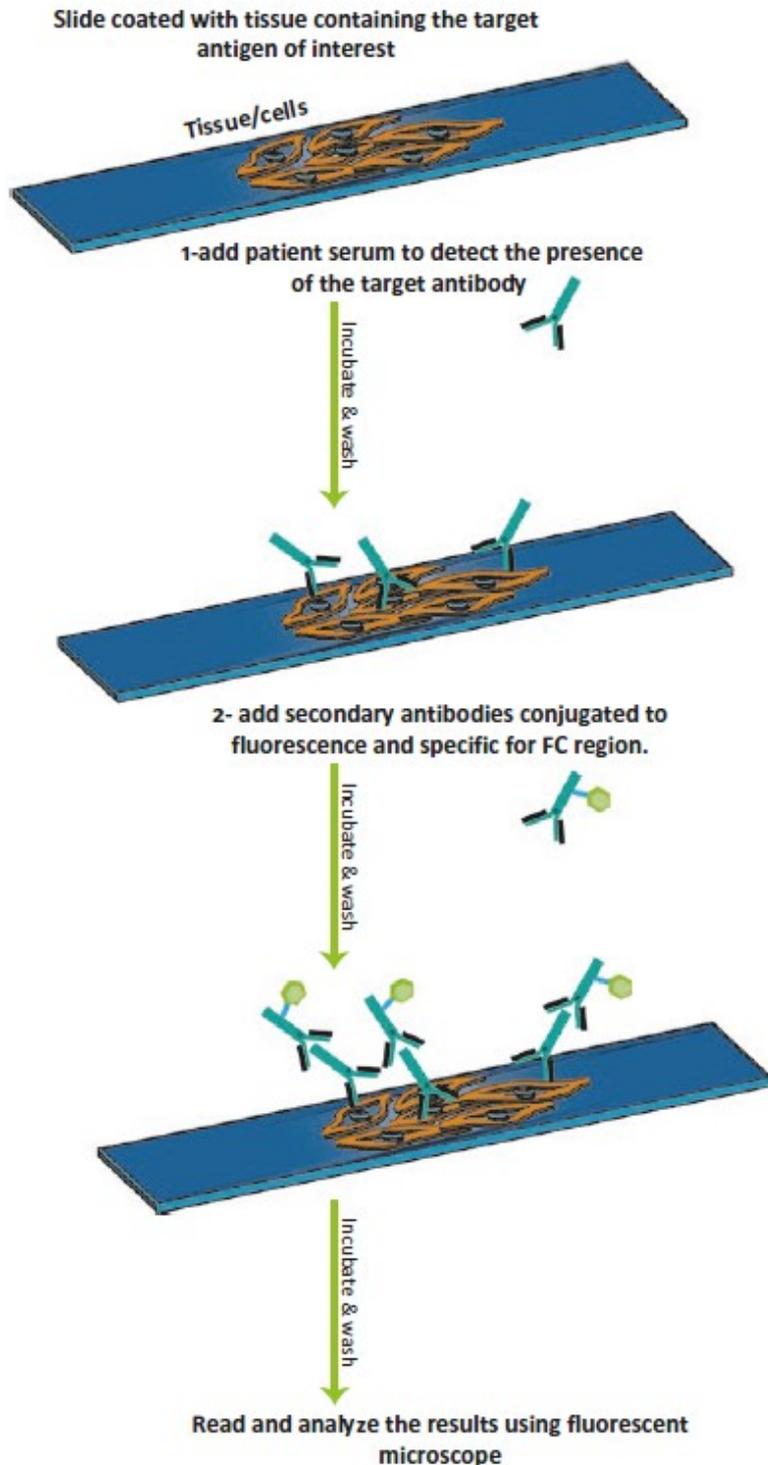


Figure 25 : Principe général du test d'immunofluorescence indirecte. [10]

Après dépôt sur une lame d'une préparation d'antigènes de *B. caballi* ou *T. equi*, et ajout du sérum de l'animal suspect, on lave la lame puis on ajoute à la préparation des anticorps anti-fragment FC avec un marqueur fluorescent. La lame est ensuite lavée. Si l'animal suspect possède effectivement des anticorps anti-piroplasme, les anticorps fluorescents y seront attachés, et une fluorescence apparaîtra lors de la visualisation de la lame au microscope sous

lumière fluorescente (cf. Figure 26). Si l'animal ne possède pas d'anticorps anti-piroplasme, les anticorps fluorescents seront partis en lavant la lame, et aucune fluorescence n'apparaîtra.

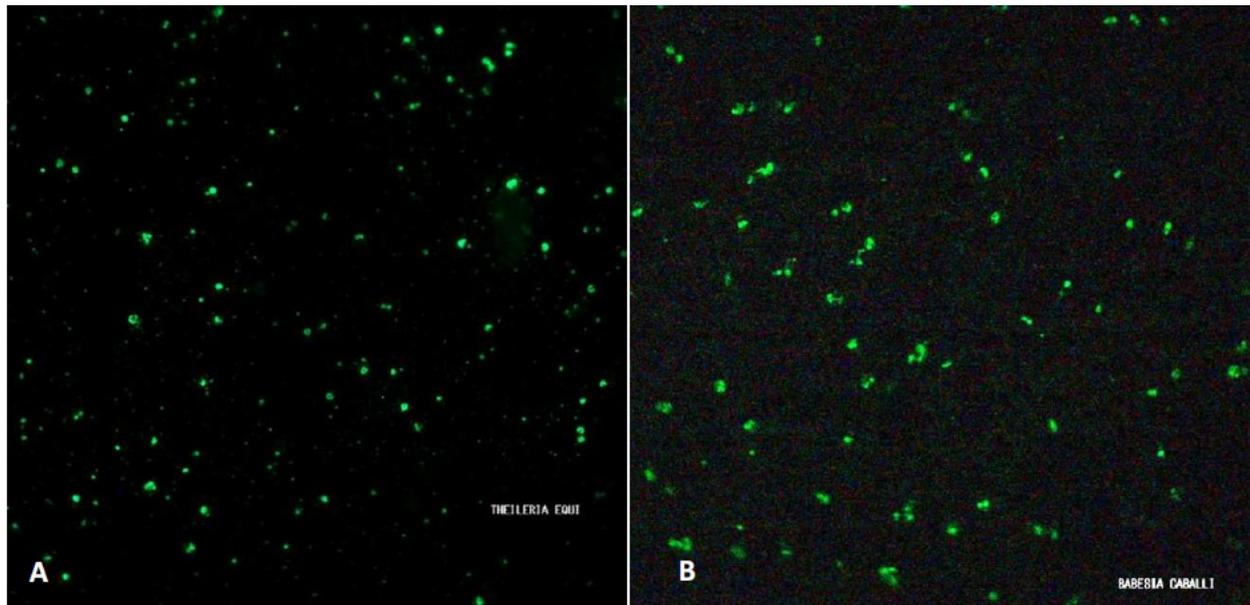


Figure 26 : Observation microscopique d'une réaction positive au test d'immunofluorescence indirecte. [53]

Observation au grossissement x400 à l'aide d'une lampe à mercure révélant la fluorescence.

A : réaction positive à *Theileria equi*

B : réaction positive à *Babesia caballi*

Le résultat de ce test est généralement considéré positif lorsqu'une fluorescence marquée est observée à la dilution 1:40 ou 1:80. Les premiers anticorps sont mis en évidence 3 à 20 jours après infection par IFI, pour atteindre un pic entre 15 jours et 2 mois post-infection. Le titre en anticorps diminue ensuite pour atteindre un plateau lors du portage chronique. On obtient donc des résultats similaires au test de fixation du complément, bien que les titres en anticorps mesurés soient généralement supérieurs avec l'IFI. L'IFI donne par ailleurs des résultats positifs plus longtemps que la fixation du complément, elle est plus sensible et tout aussi spécifique [153] [169] [181].

Le résultat de ce test est cependant subjectif, dépendant de l'observateur. La lecture est difficile, entre un résultat faiblement positif et un résultat négatif, ce qui rend la standardisation de ce test compliquée. De plus, c'est une technique longue dans la préparation et dans la lecture [30] [169]. Comme pour le test de fixation du complément, cette méthode nécessite l'utilisation d'antigènes connus, produits artificiellement.

V.C.3. ELISA

Comme pour les techniques précédentes, l'ELISA a pour principe la détection et la visualisation des anticorps anti-piroplasme chez un cheval suspect. Plusieurs techniques ELISA existent (directe, indirecte, sandwich, etc.), et c'est la technique d'ELISA par compétition (ELISAc) qui est utilisée aujourd'hui. Elle a été mise en place par Knowles *et al.* en 1992 pour *T. equi*.

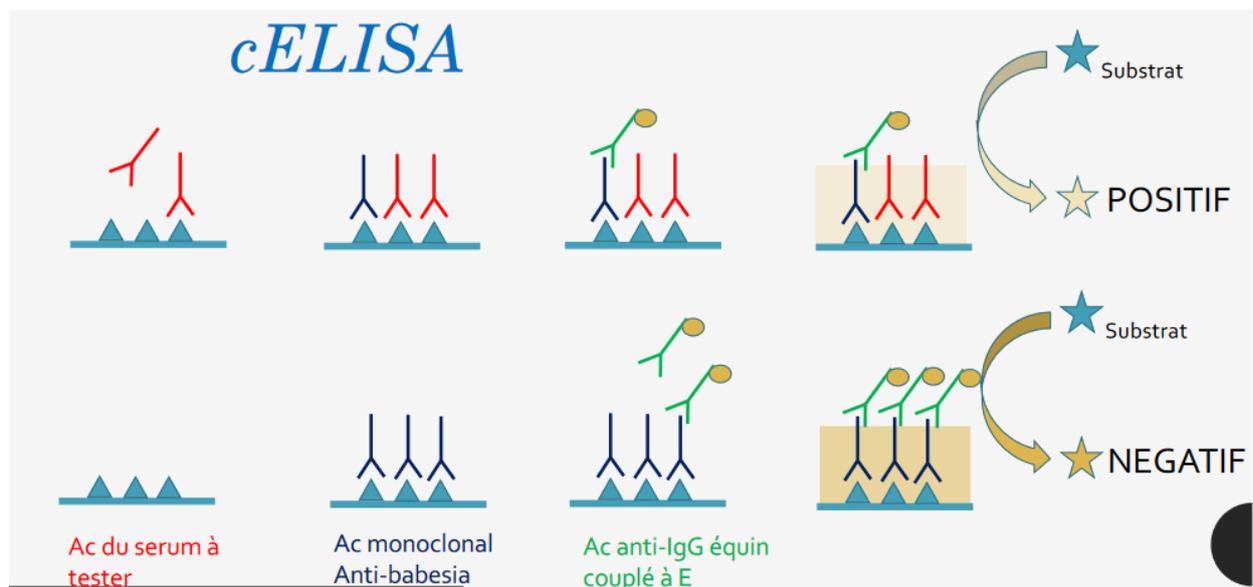


Figure 27 : Principe général de la technique d'ELISA par compétition. [177]

Le sérum de l'animal suspect est mis en contact avec l'antigène d'intérêt (EMA-1 ou RAP-1), ainsi que des anticorps monoclonaux couplés à une protéine chromogénique. Les sites de liaison pour l'antigène des anticorps de l'animal et des anticorps monoclonaux sont ainsi en compétition pour la fixation de l'antigène d'intérêt. Si l'animal possède des anticorps anti-piroplasme, moins d'anticorps monoclonaux seront fixés et la réaction colorée sera plus faible. Si l'animal ne possède pas d'anticorps anti-piroplasme, la réaction colorée sera plus importante, car la fixation de l'antigène aux anticorps monoclonaux de détection sera plus importante (cf. Figure 27).

Pour *T. equi*, l'antigène utilisé est EMA-1 (*equi merozoite antigen 1*). L'intérêt de l'utilisation de cet antigène a été démontré dans une étude de Knowles en 1992. L'obtention d'une protéine EMA-1 recombinante est permise par clonage du gène codant pour cette protéine chez des bactéries *Escherichia coli* [95]. Plus récemment, la production de protéines EMA-1 recombinantes a été développée dans des cellules d'insectes via la multiplication d'un baculovirus [186]. Pour *B. caballi* la protéine utilisée dans les tests ELISAc est la protéine RAP-

1 (*Rhoptry-associated protein 1*), également appelée Bc48 pour protéine rhoptry des mérozoïtes de *B. caballi* de 48kDa. Elle est codée par le vecteur de clonage pGEX4T au sein de bactéries *E. coli* [85] [89].

En fonction des études, on note que les premiers anticorps anti-*Theileria* sont détectés par ELISA entre 5 jours et 3-4 semaines post-infection, et restent détectables toute la durée des études [85] [95] [186].

La sensibilité et la spécificité de la technique ELISA sont supérieures à celles de l'IFI et du test de fixation du complément [85] [89] [186]. Une étude de 2005 par l'USDA sur 1000 sérums de chevaux montrait une spécificité de 99,2% à 99,5%. Cette haute spécificité s'explique par l'utilisation de protéines recombinantes, et non plus d'antigènes non purifiés de parasites [130]. La méthode ELISAc est aujourd'hui celle préconisée par l'OIE dans le dépistage de la piroplasmose chez les chevaux destinés à l'exportation.

V.D. Méthodes génétiques

Les méthodes diagnostiques basées sur la génétique font partie des méthodes les plus récentes. Elles présentent généralement une très bonne sensibilité et une excellente spécificité, se basant sur la détection de l'ADN du parasite.

V.D.1. Hybridation *in situ*

La technique d'hybridation *in situ* repose sur la complémentarité des bases nucléiques entre elles pour la détection de l'ADN des piroplasmes. Des sondes ADN radiomarquées ont été développées par Posnett *et al.* en 1991 pour reconnaître un fragment d'ADN spécifique de *T. equi* ou *B. caballi*. Après dépôt de sang de l'animal suspect sur une lame de nylon et dénaturation thermique de l'ADN, la sonde est ajoutée. Le taux d'hybridation est ensuite évalué par densitométrie.

Cette technique présente une bonne spécificité, puisque les sondes ADN de *B. caballi* ne se combinent pas à l'ADN de *T. equi*, et inversement. Les sondes ont également été testées avec l'ADN de *B. bovis* et *B. bigemina*, avec lesquels elles ne s'hybrident pas. La sensibilité de cette méthode a été évaluée dans ces études. Il a été noté et calculé que les sondes pour *B. caballi* (pBC11 et pBC191) pouvaient détecter des parasitemies de 0,06% et 0,0016% respectivement. Les sondes pour *T. equi* (pSE2 et pSB20) pouvaient quant à elles détecter des

parasitémies de 0,0025% [139][140]. Afin d'augmenter la sensibilité de cette technique, une étape d'amplification de l'ADN a été ajoutée. C'est ainsi qu'ont été développées les techniques de PCR.

V.D.2. PCR

Depuis le début des années 2000, les techniques de PCR utilisées dans la détection des piroplasmes équins se sont considérablement multipliées et développées. En 1999, une première technique de PCR basée sur l'hybridation d'une fraction de la séquence du gène de l'ARN 18S a été mise en place [24]. En 2001, Nicolaiewsky décrit une technique de PCR nichée pour *T. equi* utilisant le gène *ema-1* déjà décrit précédemment, plus sensible [126]. En 2003, Rampersad publie une étude comparant étalement sanguin, PCR simple et PCR nichée dans la détection de *T. equi* [145]. En 2005, c'est Alhassan qui décrit une technique de PCR multiplex, avec tout d'abord l'utilisation d'amorces communes pour l'amplification simultanée de *B. caballi* et *T. equi*, puis des amorces des séquences des gènes *rap-1* et *ema-1* permettent la différenciation des deux parasites [12]. En 2008 et 2010, Kim et Bhoora décrivent l'utilisation d'une PCR quantitative en temps réel pour le diagnostic de piroplasmose équine [28] [93].

Plusieurs types de PCR ont ainsi été développés ces dernières années pour la détection des piroplasmes équins : PCR simple, PCR nichée, PCR multiplex ou encore PCR en temps réel. Le principe reste cependant le même quelle que soit la méthode utilisée : après dénaturation, des amorces de séquence spécifique encadrant une séquence connue de l'ADN du parasite recherché sont utilisées. Les amorces classiquement utilisées pour le diagnostic de piroplasmose aujourd'hui sont des amorces permettant l'amplification de *rap-1* (*Bc48*) pour *B. caballi*, et de *ema-1* pour *T. equi*. Après hybridation, une phase d'amplification par réplication de l'ADN a lieu dans un thermocycleur. Cette amplification exponentielle permet d'augmenter la quantité de matériel génétique initialement faible, voire très faible lors de parasitémies très basses. Après n cycles, on a alors 2^n copies de l'ADN initial (cf. Figure 28). Ce sont toutes ces étapes qui font de la PCR une méthode très sensible et spécifique. Les limites de détection de la PCR sont par conséquent très basses. En fonction des études, ces limites de détection vont d'une parasitémie de 0,000006% [126] à 0,000114% [28].

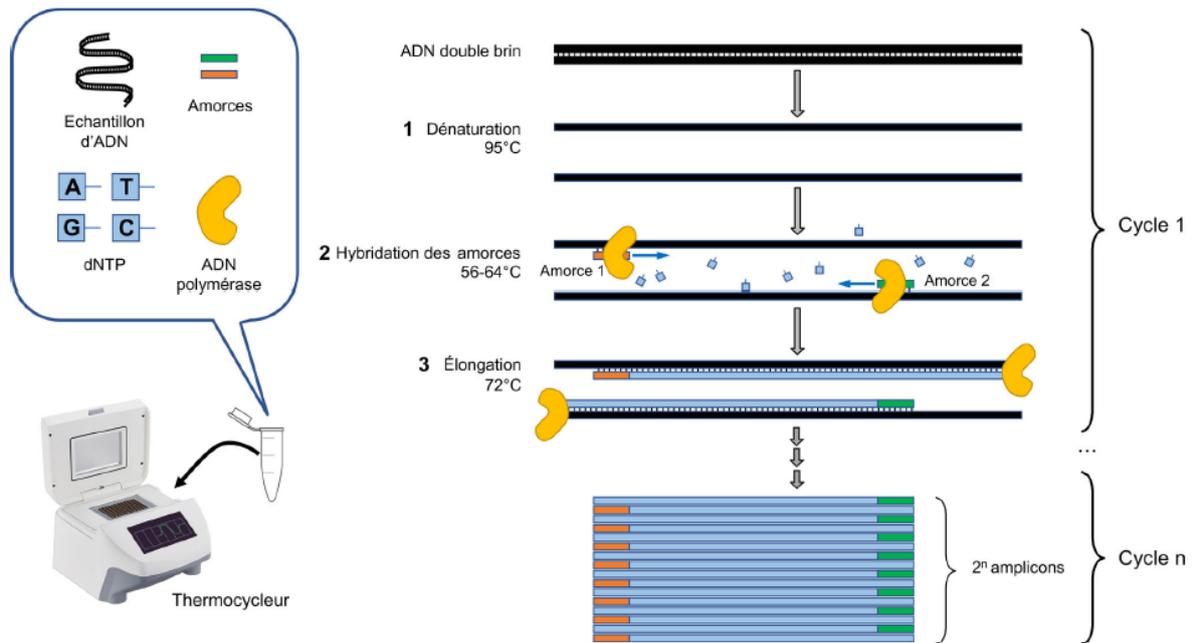


Figure 28 : Principe général de la PCR. [170]

V.D.3. LAMP

L'utilisation de la technique LAMP dans le cadre du diagnostic de la piroplasmose équine a été décrite pour la première fois en 2007. Cette technique moléculaire est proche de la PCR. En effet, par l'utilisation de 4 amorces spécifiques reconnaissant 6 sections de l'ADN, et d'une ADN-polymérase, le matériel génétique du parasite à diagnostiquer sera amplifié de manière exponentielle, augmentant la sensibilité de détection (cf. Figure 29). Une différence avec la PCR se trouve dans l'amplification isotherme de l'ADN, et non l'utilisation de thermocycleurs, coûteux. Cette méthode est basée elle aussi sur l'amplification des gènes *ema-1* et *rap-1*. C'est une méthode diagnostique qui a montré une spécificité et une sensibilité équivalente à celle de la PCR pour la piroplasmose, dans la détection des parasites dès les premiers jours post-infection. Elle est également rapide, l'amplification se réalisant sur 1 heure, et facile à mettre en œuvre, puisque le résultat de la réaction peut être observé à l'œil nu par la fluorescence ou la colorimétrie de la solution [11] [13].

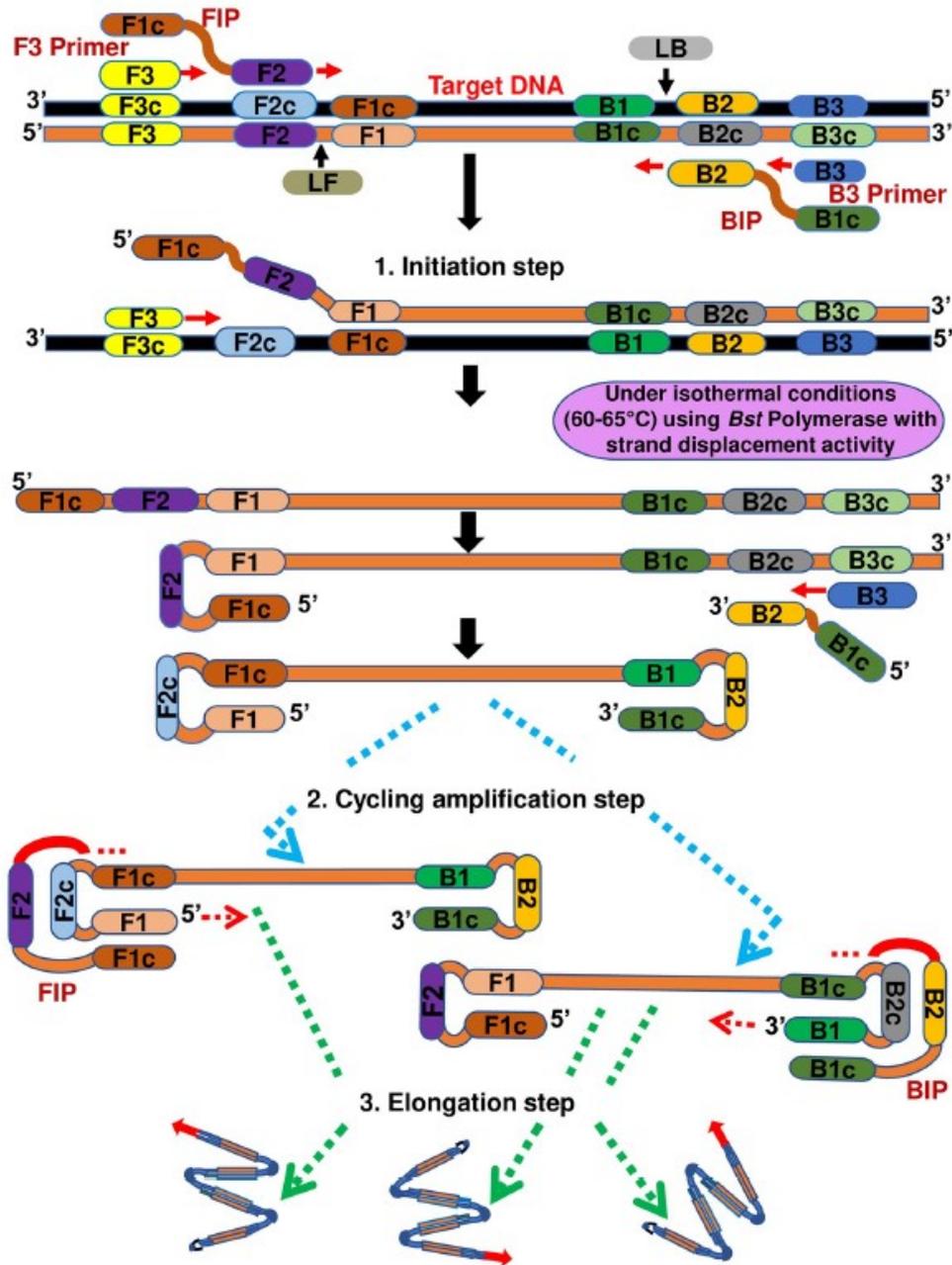


Figure 29 : Principe général de la technique LAMP. [129]

V.D.4. RPA

En 2020 a été décrite une technique de RPA efficace pour le diagnostic de la piroplasmose [109]. La RPA est une technique moléculaire proche de la PCR et de la technique LAMP, basée sur le principe d'amplification du matériel génétique (cf. Figure 30). Comme la technique LAMP, il s'agit d'une technique isotherme, ne nécessitant pas de thermocycleur. Par ailleurs, c'est une technique encore plus rapide, puisque l'amplification se fait en 20 à 40 minutes.

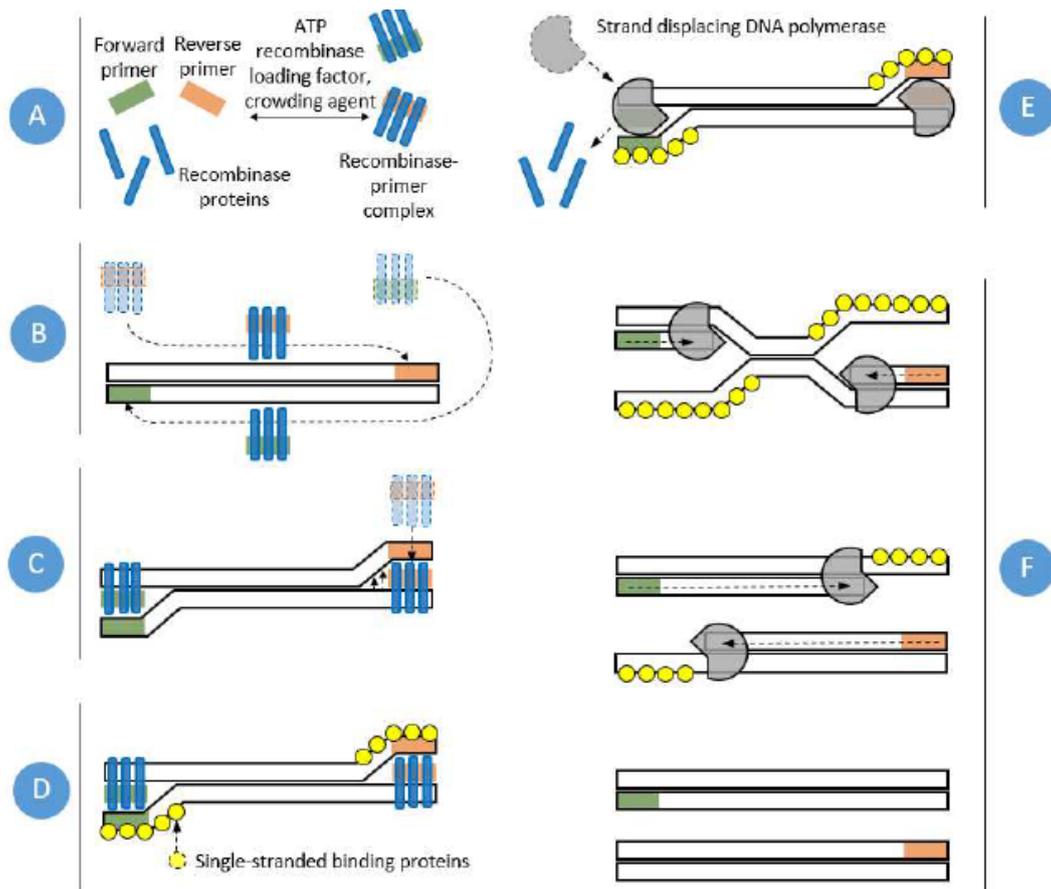


Figure 30 : Principe général de la technique RPA. [112]

Il y a formation d'un complexe entre une protéine recombinaison, ayant pour rôle initial la réparation de l'ADN, et les amorces spécifiques des gènes recherchés (A). Ce complexe amorce-recombinaison s'hybride à la séquence correspondante (B), et la protéine recombinaison permet la dissociation des deux brins d'ADN (C). Des protéines de liaison vont ensuite venir fixer les monobrins d'ADN et les garder ainsi dissociés (D). Les complexes amorce-recombinaison sont dissociés, et quittent leur brin d'ADN, laissant la place à l'ADN polymérase

qui dupliquera les deux monobrins (E) (F). Le cycle ce répétera, amplifiant l'ADN recherché de manière exponentielle [112].

La technique RPA mise au point par Lei en 2020 est une technique quantitative et en temps réel, permettant la détection simultanée de *T. equi* et *B. caballi* par amplification du gène 18S de l'ARN, puis le gène *ema-1* et *rap-1* respectivement pour chaque parasite. Cette méthode présente par ailleurs une grande sensibilité et spécificité, comparables à la PCR classiquement réalisée, tout en étant plus rapide [109].

V.D. Conclusion sur les méthodes diagnostiques

Chacune des méthodes diagnostiques présentées dans cette partie présente ses avantages et inconvénients. Bien que les anciennes méthodes directes (xénodiagnostique et isotest) ne soient plus vraiment d'actualité pour des raisons pratiques et éthiques, la visualisation directe au microscope est encore largement utilisée de par sa facilité de mise en œuvre, sa rapidité d'exécution et le diagnostic de certitude posé lors de l'observation d'un piroplasme. Les techniques indirectes, basées sur l'observation de la réaction immunitaire sont quant à elles de bons marqueurs du passage du parasite dans l'organisme, et du portage asymptomatique avec une faible parasitémie, indétectable à l'observation microscopique. Il faut cependant ne pas oublier qu'elles se basent sur la détection des anticorps créés par l'organisme suite à l'infection, et nécessitent donc plusieurs jours à plusieurs semaines avant d'être positives. Enfin, les techniques récentes se basant sur la génétique se caractérisent par leur excellente sensibilité et spécificité. Elles permettent la détection précoce du parasite dans l'organisme, même lorsque qu'il est présent en très faible quantité. Elles ne présument cependant ni de la viabilité du parasite, ni de la réaction de l'organisme à sa présence. On voit par ailleurs depuis une vingtaine d'années que ces techniques génétiques se développent et se multiplient à très grande vitesse, donnant naissance à des méthodes de plus en plus rapides, et peu coûteuses. Enfin, il faut garder à l'esprit que ces méthodes servent également à la recherche dans le domaine vétérinaire : cultures *in vitro* de parasites, séquençage génétique des populations de parasites, développement de nouvelles méthodes diagnostiques, etc.

En pratique, il est donc nécessaire que le vétérinaire associe ces différentes méthodes, profitant des avantages de chacune pour le diagnostic et le suivi des chevaux qu'il consultera : méthodes génétiques dans le diagnostic précoce ou le portage sain, sérologies dans les diagnostics plus tardifs, mise en évidence d'une séroconversion, etc.

Enfin, il ne faut pas oublier que certaines de ces méthodes diagnostiques sont des obligations réglementaires dans les processus d'exportation/importation de chevaux à travers le monde (USA, Canada, Japon, etc.).

VI. Traitement

VI.A. Objectifs du traitement de la piroplasmose

Les objectifs du traitement d'un cheval atteint de piroplasmose se doivent d'être adaptés à la situation rencontrée par le vétérinaire. Le principal facteur qui modulera la stratégie thérapeutique à adopter va être le lieu de résidence de l'animal. Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment dans ce travail, le portage chronique des piroplasmes est fréquent en région endémique, et ce sont les réinfestations successives, ainsi que le portage chronique des parasites qui permettent la mise en place d'une immunité concomitante, protégeant les animaux des formes cliniques graves. Ces formes cliniques graves, quand elles sont observées, le sont généralement chez des chevaux initialement sains, arrivant en zone endémique et donc soumis à une forte pression infectieuse. Par conséquent, chez des chevaux vivant en région endémique, le principal objectif va être la réduction des symptômes et la diminution du temps de convalescence. La stérilisation complète de l'organisme ne présente que peu d'intérêt, risquant au contraire d'être délétère plus que bénéfique. A l'inverse, chez un cheval vivant en région non endémique, la stérilisation de l'organisme serait en théorie souhaitée, pour éviter l'installation permanente du parasite dans cette région. C'est pourquoi dans ces régions, des méthodes diagnostiques très sensibles sont nécessaires à la détection d'animaux réservoirs, porteurs asymptomatiques [172] [182].

VI.B. Traitement spécifique de la piroplasmose

VI.B.1. Substances colorantes

Les substances colorantes sont d'anciennes molécules qui ne sont plus utilisées aujourd'hui dans le traitement de la piroplasmose équine.

VI.B.1.a. Bleu trypan

Le bleu trypan a été l'une des premières molécules utilisées dans les essais de traitement de la piroplasmose équine. Dès 1918, De Kock publie une étude dans laquelle il teste de nombreuses substances pour tenter de traiter cette maladie. Ayant déjà montré son efficacité

dans le traitement de la babésiose bovine quelques années auparavant, le bleu trypan s'est montré efficace contre *B. caballi*, mais pas contre *T. equi* [104]. L'administration se fait par voie intraveineuse stricte, à la dose de 10 mg/kg. Par ailleurs, il a été noté que cette substance colore en bleu les tissus des animaux traités. Elle n'est plus utilisée aujourd'hui pour le traitement de la piroplasmose équine [33].

VI.B.1.b. Euflavine

Aussi appelée chloro-méthylate d'acriflavine, l'euflavine est un dérivé de l'acridine. C'est une substance colorée qui a montré son efficacité à la fois contre *B. caballi* et *T. equi*, bien que des résistances soient décrites pour *T. equi*. L'administration se fait par voie intraveineuse, à la dose de 4-8 mL/100 kg d'une solution diluée à 5%. Le volume injecté ne doit pas dépasser les 20 mL [33].

VI.B.2. Dérivés de la naphthaline

La parvaquone, la buparvaquone et l'atovaquone sont des drogues anti-protozoaires développées pour lutter contre la theilériose. Les différentes études effectuées avec la parvaquone et la buparvaquone évaluant leur efficacité contre *T. equi* rapportent une efficacité partielle, sans réussite de stérilisation de l'organisme. Ces médicaments montrent une efficacité au stade schizonte du parasite, lors d'infection aiguë [33].

L'administration de buparvaquone en injection intraveineuse lente, à la dose de 4-6 mg/kg une fois par jour pendant 3 jours, permet la réduction des signes cliniques, bien que les animaux restent porteurs du parasite. L'administration intramusculaire est également efficace, mais montre cependant des réactions locales importantes, et l'apparition de boiteries sur 2-3 jours [154]. Une étude de 2003 montre que l'association de buparvaquone intraveineuse et d'artéether intramusculaire à la dose de 5 mg/kg pendant 4 jours permettait un traitement efficace, mais transitoire, des infections à *T. equi* chez des ânes splénectomisés [101].

L'administration de parvaquone se fait par voie intramusculaire, à la dose de 20 mg/kg [49].

VI.B.3. Autres antipaludéens

D'autres drogues antipaludéennes testées contre la piroplasmose vont être les molécules dérivées de l'artémisinine : l'artésunate et l'artéether, la pamaquine et la pyriméthamine. Une étude de 2003 montre l'efficacité relative *in vitro* de l'artésunate, de la pamaquine et de la pyriméthamine sur les deux parasites [124]. L'étude de Kumar sur des ânes splénectomisés en 2003 montre que l'artéether seul, à la dose de 5 mg/kg en intramusculaire, ne présente pas de réelle efficacité. L'artésunate seul, à la dose de 2,5 mg/kg en intramusculaire, montre une efficacité relative le temps que dure le traitement, à savoir 4 jours, puis la parasitémie remonte et l'animal décède. En revanche, l'association artéether/buparvaquone montre une efficacité intéressante, équivalente à celle du dipropionate d'imidocarbe [101].

VI.B.4. Tétracyclines

Les tétracyclines ayant montré une efficacité contre la piroplasmose équine sont l'hydrochloride de chlortétracycline, et l'hydrochloride d'oxytétracycline. Ces molécules n'ont cependant montré qu'une efficacité incomplète, face à *T. equi* uniquement. L'oxytétracycline a pour avantage de posséder une AMM pour le cheval en France, sous le nom déposé OXYTETRACYCLINE 10 %[®], bien que l'indication de traitement de la piroplasmose n'en fasse pas partie. L'administration chez le cheval se fait par voie intraveineuse stricte et lente. La posologie utilisée est de 5,5 mg/kg une fois par jour pendant au moins 2 jours, en pratique le traitement étant souvent administré sur une semaine. La posologie de la chlortétracycline est de 31,2 mg/kg une fois par jour pendant 4 jours [33] [53] [190].

VI.B.5. Diamidines et molécules apparentées

VI.B.5.a. Diacéturate de diminazène

Commercialisé dans certains pays sous le nom déposé de BERENIL[®], l'administration dans l'espèce équine se fait par voie intramusculaire. Il est rapporté qu'une injection à la dose de 11 mg/kg est efficace pour diminuer les signes cliniques d'une piroplasmose, et que 2 injections à 24 h d'intervalle, à la dose de 11 mg/kg, permet l'élimination de *B. caballi*, mais pas celle de *T. equi* [49]. En 1984, Kuttler rapporte que 2 injections de diminazène à 24 h d'intervalle à la dose de 5 mg/kg suffisent à traiter une infection à *B. caballi*, et que deux injections à la dose de 12 mg/kg à 24h d'intervalle semblent traiter une infection à *T. equi* [104].

Cette molécule possède cependant des effets secondaires importants. En effet, la posologie de 11 mg/kg est proche de la dose toxique, et peut avoir diverses conséquences, telles qu'une nécrose locale au site d'injection, la sudation, la dépression ou la détresse respiratoire

de l'animal. Pour éviter cela, multiplier les sites d'injection et injecter des volumes plus faibles peuvent diminuer les réactions locales [154].

VI.B.5.b. Iséthionate de phénamidine

Un traitement avec 2 injections d'iséthionate de phénamidine à la dose de 8,8 mg/kg par voie sous-cutanée, à 24 h d'intervalle semble efficace pour éliminer une infection à *B. caballi* [104].

VI.B.5.c. Amicarbalide

Une injection intramusculaire unique d'amicarbalide à la dose de 9-10 mg/kg semble suffire à diminuer les signes cliniques. Pour l'élimination de *B. caballi*, 2 injections à la dose de 8,8 mg/kg à 24 h d'intervalle sont nécessaires. Cependant, il semblerait que l'élimination complète de *T. equi* ne soit pas possible, comme l'ont montré 4 injections à 24 h d'intervalle, ainsi que l'augmentation de la posologie à 11 mg/kg [49] [104].

Cette molécule possède aussi des effets secondaires importants, et rapidement atteints. En effet, ont été rapportés des signes rappelant une réaction anaphylactique, tels que troubles respiratoires, troubles gastro-intestinaux, œdème périorbitaire, œdème sous-cutané, etc. Pour éviter cela, il est possible de diminuer les doses à 2,2 mg/kg en 2 injections à 24 h d'intervalle. Ceci permet la réduction des symptômes lors de piroplasmose clinique, mais ne permet pas la stérilisation de l'organisme [154].

VI.B.5.d. Imidocarbe

- *Présentation de la molécule*

L'imidocarbe, sous forme de dipropionate, est la molécule considérée aujourd'hui comme la plus efficace dans le traitement de la piroplasmose. Elle est commercialisée en France sous le nom déposé de CARBESIA[®], et jusqu'en 2012 possédait une AMM pour les chevaux. L'AMM à ce jour concerne les chiens et les bovins. C'est un médicament spécifique au traitement de la piroplasmose et de l'anaplasmosse. C'est une molécule de la classe des carbanilides, proches des diamidines [17].

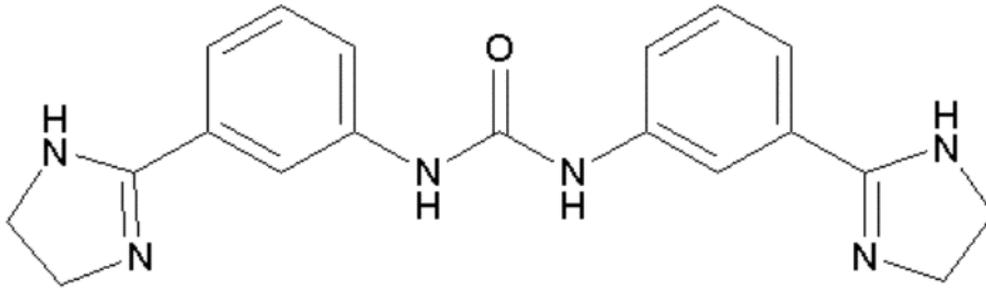


Figure 31 : Structure chimique de l'imidocarbe.

○ *Pharmacodynamie*

Le mécanisme d'action exact par lequel cette molécule exerce son action piroplassmicide n'est pas certain. Plusieurs hypothèses existent cependant :

- Après pénétration au sein du parasite par les transporteurs protéiques des bases puriques, l'imidocarbe inhiberait les topoisomérases de type II ainsi que la thymidilate synthase, nécessaires à la réplication et la constitution de l'ADN [17].
- La perturbation de la synthèse ou de l'utilisation des polyamines par le parasite entraînerait sa mort, avec vacuolisation du cytoplasme, dissolution de l'enveloppe nucléaire et concentration de la chromatine [33] [116].
- L'inhibition par la molécule d'imidocarbe de la pénétration de l'inositol au sein du globule rouge parasité entraînerait la mort du parasite par dénutrition. C'est ce mécanisme qui expliquerait l'effet prophylactique de l'imidocarbe [116].

Il a été montré, sur un modèle murin, que le dipropionate d'imidocarbe possède une action anti-inflammatoire, par stimulation de la production d'IL-10, et diminution de la production de TNF α *in vivo* [91]. Il a également été montré chez des bovins infectés par *Anaplasma marginale* que l'imidocarbe avait une action sur l'activité de certaines enzymes [56] :

- Réduction de l'activité de l'adénosine désaminase : augmentation de la quantité d'adénosine, à effet anti-inflammatoire, et stimulateur de la production de cytokines anti-inflammatoires.
- Réduction de l'activité de l'acétylcholine estérase : augmentation de la quantité d'acétylcholine, activation du système anti-inflammatoire cholinergique, par réduction de la libération de cytokines pro-inflammatoires.
- Augmentation de l'activité des superoxyde-dismutases et des catalases : activité anti-oxydante et lutte contre les radicaux libres.

- *Posologie*

La posologie à laquelle sera administré l'imidocarbe est une question importante pour plusieurs raisons. Premièrement, le médicament n'ayant plus d'AMM pour le cheval en France, il sera prescrit dans le cadre de la cascade de prescription, et le choix de la posologie par le vétérinaire devra se faire dans ce cadre réglementaire. Ensuite, c'est un médicament possédant de nombreux effets secondaires, fréquents et graves. Enfin, *B. caballi* et *T. equi* n'ont pas la même résistance aux piroplasmicides.

Pour le traitement de *B. caballi*, deux injections en intramusculaire de dipropionate d'imidocarbe à la dose de 2,2 mg/kg à 24 h d'intervalle sont considérées comme suffisantes à l'élimination du parasite [38] [49] [154] [178]. En 2009, une étude a montré que 4 injections d'imidocarbe à 72h d'intervalle à la dose de 4 mg/kg i) permettaient l'élimination du parasite, qui n'était plus décelable par PCR, ii) entraînaient une séroconversion des animaux, qui redevenaient séronégatifs par ELISA, et iii) empêchaient l'infection de chevaux sains par transfusion sanguine [160].

Le traitement de *T. equi* pose plus de problème. C'est un parasite plus résistant que *B. caballi*, et la question de la possibilité de son élimination de l'organisme d'un animal infecté n'est toujours pas résolue. La possibilité d'élimination de *T. equi* de l'organisme pourrait dépendre de l'hôte mais aussi de la souche infectante [34]. La posologie aujourd'hui recommandée lors de traitement d'une infection à *T. equi* est de 4 injections d'imidocarbe en intramusculaire, à 72h d'intervalle, à la dose de 4,4 mg/kg [183]. Cette posologie ne permet pour autant pas une élimination systématique complète du parasite. Une étude de 2013 montre que cette posologie permet l'élimination du parasite chez 4/5 des chevaux testés [69]. De plus, il faut noter que cette posologie est proche de la DL₅₀ de l'imidocarbe, qui est de 2x16 mg/kg donné à 48 h d'intervalle [49]. Une posologie supérieure, de 6-8 mg/kg en 4 injections à 72h d'intervalle, semble être efficace pour l'élimination du parasite, mais présente cependant un risque de toxicité très élevé [154]. Une étude de 2015 montre *in vitro* le développement de résistances chez certaines souches de *T. equi* à l'imidocarbe, ce qui est également à prendre en compte dans l'utilisation de ce médicament, et la recherche de nouvelles molécules efficaces contre ces parasites est donc primordiale [77]. Lors de l'utilisation d'imidocarbe dans le traitement d'une piroplasmose équine, le suivi des paramètres hépatiques et rénaux est essentiel pour prévenir les complications. Enfin, il faut noter que les ânes sont particulièrement sensibles aux effets secondaires de l'imidocarbe. On essaiera généralement de ne pas dépasser la dose de 2,2 mg/kg [38] [154].

Tableau VI : Posologie du CARBESIA® pour le traitement de *Babesia caballi*.

2,2 mg/kg IM	4,4 mg/kg IM
2 fois à 24h d'intervalle	4 fois à 72h d'intervalle
<p>Considéré suffisant pour éliminer le parasite</p>	<p>Elimination certaine du parasite → non décelable par PCR</p> <p>Séroconversion des chevaux → redeviennent négatif par ELISA</p> <p>Prévention de l'infection d'un cheval sain par transfusion sanguine</p>

IM = Intramusculaire

Tableau VII : Posologie du CARBESIA® pour le traitement de *Theileria equi*.

4,4 mg/kg IM	6-8 mg/kg
4 fois à 72h d'intervalle	4 fois à 72h d'intervalle
<p>Elimination incomplète du parasite</p>	<p>Semble efficace pour l'élimination complète du parasite</p> <p>Risque de toxicité très élevé</p>

IM = Intramusculaire

○ *Pharmacocinétique* [26]

Le dipropionate d'imidocarbe, après injection intramusculaire, est absorbé dans les 10 minutes, atteignant rapidement un plateau à sa concentration plasmatique maximale. Ce plateau est maintenu durant 2 heures, puis décroît d'abord rapidement, puis plus lentement sur les 10 à 12 heures suivantes (cf. Figure 32).

La molécule est détectable dans l'urine moins de 3 heures après injection, et reste détectable à des concentrations élevées, comparables au pic de concentration plasmatique, plus de 36 heures après injection. Elle est détectable dans les selles dès 30 minutes à 3 heures post-injection. La concentration fécale maximale est atteinte après 48 h, et la molécule reste détectable jusqu'à 10 jours après administration. L'imidocarbe a également été détecté dans le lait de juments, 2h après injection. L'étude de Lewis en 1999 montre que l'imidocarbe traverse également la barrière placentaire, et est retrouvé dans le sang fœtal à des concentrations équivalentes à celles du sang de la mère [111].

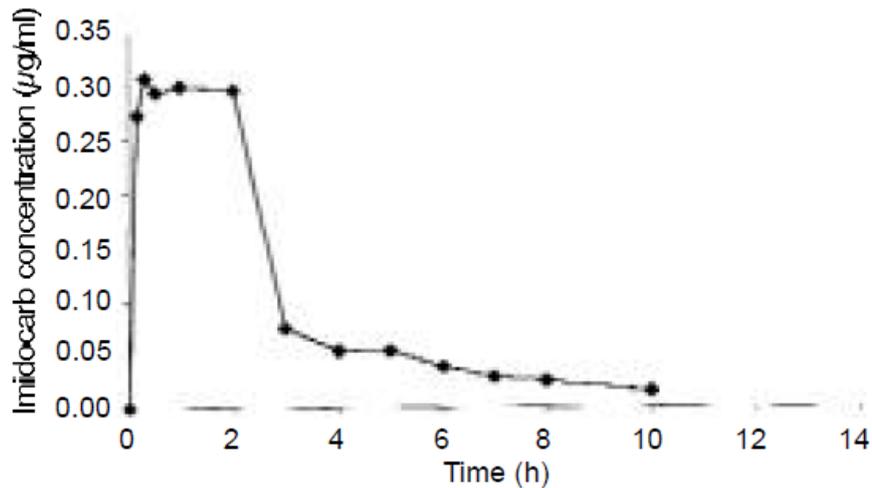


Figure 32 : Concentration plasmatique en imidocarbe dipropionate au cours du temps après une injection intramusculaire de 2,4 mg/kg. [26]

○ *Effets secondaires*

Les effets secondaires d'un traitement à l'imidocarbe sont assez fréquents, du fait de la faible marge thérapeutique. De plus, les animaux particulièrement sensibles comme les ânes, ou le traitement des affections à *T. equi* nécessitant une dose plus élevée que pour *B. caballi* font de ces effets secondaires des complications d'autant plus fréquentes. On va généralement retrouver un syndrome parasymphomimétique, ayant pour origine l'inhibition des choline-estérases, et donc l'augmentation de la quantité d'acétylcholine. Les signes fréquemment observés vont être [154] [179] :

- Sudation
- Agitation
- Colique / diarrhée

Les complications de colique peuvent être évitées par l'ajout d'un spasmolytique dans le protocole thérapeutique. Chez des animaux sensibles, ou lors de dosage trop important, cela peut également aboutir à la mort de l'animal, bien que ce cas reste moins fréquent.

L'imidocarbe possède également une hépatotoxicité et une néphrotoxicité, caractérisées à l'autopsie par une nécrose périportale et une nécrose corticale et tubulaire. C'est pourquoi le suivi des paramètres hépatiques et rénaux est important pour prévenir d'éventuelles complications [2].

VI.B.6. Molécules à l'essai

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses molécules sont à l'essai dans le traitement des piroplasmoses animales (cf. Tableau VIII). La quasi-totalité d'entre elles est encore au stade de l'essai clinique *in vitro*, et très peu ont donc réellement montré une efficacité *in vivo*. Cependant, elles restent des pistes intéressantes, explorées dans le but de trouver des traitements toujours plus efficaces, avec une innocuité moindre, et un coût intéressant [178]. Dans un article de 2019, Rizk synthétise l'ensemble des composés chimiques étudiés pour leur effet anti-piroplasma bovin et équin entre 1990 et 2019 [151].

L'IC₅₀ *in vitro* désigne la concentration inhibitrice médiane *in vitro*, c'est-à-dire la concentration micromolaire (μM) de substance active nécessaire à inhiber 50% de la croissance du parasite.

Tableau VIII : Substances anti-piroplasmes équins testées *in vitro* entre 1990 et 2019. [151]

Composé chimique	Parasite	IC ₅₀ <i>in vitro</i> (μM)
Clindamycine phosphate	<i>B. caballi</i>	4,7
	<i>T. equi</i>	27,2
Triclosan	<i>B. caballi</i>	4,8 μg/mL
	<i>T. equi</i>	29 μg/mL
Epoxomicine	<i>B. caballi</i>	0,009
	<i>T. equi</i>	0,021
Tétracycline hydrochloride	<i>B. caballi</i>	4 ± 1
	<i>T. equi</i>	62 ± 2
(-)-Epigallocatechine-3-gallate	<i>B. caballi</i>	4,42
	<i>T. equi</i>	3,64
Terpène nérolidol	<i>B. caballi</i>	23,1 ± 1
Ciprofloxacine	<i>B. caballi</i>	2,7 ± 0,47
	<i>T. equi</i>	2,5 ± 0,45
Thiostrepton	<i>B. caballi</i>	2,7 ± 0,5
	<i>T. equi</i>	6,4 ± 1,2
Rifampicine	<i>B. caballi</i>	4,7 ± 0,8
	<i>T. equi</i>	4,1 ± 0,7
Pepstatine A	<i>B. caballi</i>	17,6
	<i>T. equi</i>	18,1
Méfloquine	<i>B. caballi</i>	20,7
	<i>T. equi</i>	4
Acide fusidique	<i>B. caballi</i>	33,3
	<i>T. equi</i>	56,25
Allicine	<i>B. caballi</i>	470
	<i>T. equi</i>	742
Pyronaridine tétraphosphate	<i>B. caballi</i>	0,440 ± 0,110
	<i>T. equi</i>	2,140 ± 0,540
Lutéoline	<i>B. caballi</i>	0,965 ± 0,10
	<i>T. equi</i>	2,400 ± 0,890
Nimbolide	<i>B. caballi</i>	0,998 ± 0,270
	<i>T. equi</i>	6,710 ± 1,780
Gédunine	<i>B. caballi</i>	11,180 ± 0,480
	<i>T. equi</i>	12,400 ± 4,800
N-acétyl-L-cystéine	<i>B. caballi</i>	114,53 ± 28,58
	<i>T. equi</i>	349,05 ± 16,21
Enoxacine	<i>B. caballi</i>	12,630 ± 3,040
	<i>T. equi</i>	24,700 ± 7,300
Nitidine chlorure	<i>B. caballi</i>	0,11 ± 0,03
	<i>T. equi</i>	2,05 ± 0,4
Camptothécine	<i>B. caballi</i>	2,07 ± 0,6
	<i>T. equi</i>	0,33 ± 0,02
17-DMAG	<i>B. caballi</i>	0,0885 ± 0,0096
	<i>T. equi</i>	0,3077 ± 0,0072
Thymoquinone	<i>B. caballi</i>	67,33 ± 0,94
	<i>T. equi</i>	74,05 ± 4,55

VI.C. Traitement et gestation

VI.C.1. Traitement de la jument gestante

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la transmission transplacentaire de la piroplasmose est une cause d'avortement, de mortinatalité, de naissance de poulain chétif ou mourant. La question du traitement de la jument gestante, particulièrement en région endémique a donc toute son importance. Lewis a montré dans une étude en 1999 que le dipropionate d'imidocarbe traversait effectivement la barrière placentaire, pour arriver dans la circulation du fœtus [111]. Plusieurs questions persistent cependant. Le moment exact de l'infection et les mécanismes y aboutissant ne sont pas connus à ce jour, bien qu'il ait été montré que l'infection du poulain avait lieu avant 150 jours de gestation. Malgré cette infection plutôt précoce, les avortements sont pour la plupart rapportés dans le dernier tiers de gestation. De plus, aucune étude n'a montré de réel lien entre le traitement d'une jument gestante et la naissance d'un poulain sain ou malade. Enfin, les effets thérapeutiques ou toxiques de médicaments tels que l'imidocarbe chez le fœtus nécessitent également des études, non réalisées à ce jour.

VI.C.2. Traitement du poulain nouveau-né

Le traitement du poulain nouveau-né présente lui aussi plusieurs interrogations. Aucune étude n'a rapporté l'efficacité ou la toxicité de molécules piroplasmicides telles que l'imidocarbe sur des jeunes sujets nouveau-nés. Aujourd'hui, le traitement du nouveau-né malade est principalement symptomatique, bien que comme nous l'avons évoqué précédemment, les animaux qui naissent avec une piroplasmose clinique décèdent pour beaucoup d'entre eux dans les jours qui suivent. En 2016, Sant rapporte le traitement efficace d'un poulain infecté par *T. equi* par une association d'oxytétracycline (10 mg/kg, 1 fois par jour), de dipropionate d'imidocarbe (2,2 mg/kg), de ceftiofur (4,4 mg/kg, 1 fois par jour), de chloramphénicol (25 mg/kg, 3 fois par jour) et de triméthoprim-sulfamide (30 mg/kg, 2 fois par jour) pendant 2 mois [158].

VI.D. Traitement de soutien des animaux malades

Le traitement symptomatique est essentiel lui aussi dans la prise en charge thérapeutique de la piroplasmose équine. Le cheval doit être mis en repos, et il faut évaluer immédiatement s'il est nécessaire de soutenir les fonctions vitales de l'animal. Le traitement de soutien se fera en fonction des signes cliniques présentés par l'animal, de la sévérité de l'atteinte et des complications [49] [154].

- Transfusion sanguine chez un animal trop fortement anémié
- Perfusion de l'animal déshydraté
- Anti-inflammatoires
- Rééquilibrage électrolytique et acido-basique
- Antibiothérapie lors de surinfections
- Gestion des coliques (de par l'infection ou le traitement à l'imidocarbe)
- Héparine lors de CIVD
- Gestion de la fourbure, de l'œdème pulmonaire, des signes neurologiques, etc.

Chez les poulains nouveau-nés, seront généralement rapidement mis en place la transfusion sanguine, la réhydratation et l'antibiothérapie préventive.

VII. Prophylaxie

VII.A. Prophylaxie médicale

VII.A.1. Prophylaxie médicamenteuse

La prophylaxie médicale de la piroplasmose équine consiste à l'injection d'une molécule piroplasmicide pour protéger l'animal contre l'infection. En 1980, Singh rapporte que 2 injections de diacéturate de diminazène à 24h d'intervalle à la dose de 12 mg/kg en intramusculaire permet une protection de 30 à 35 jours contre *T. equi* [163]. L'imidocarbe a lui aussi montré son activité prophylactique contre les piroplasmes dans diverses espèces : chiens, bovins, moutons, murins, et équins [26] [142] [176]. Deux injections d'imidocarbe à 72h

d'intervalle à la dose de 2 mg/kg protégeraient contre l'infection à *B. caballi* pendant 2 à 3 semaines [53].

Cette pratique n'est pas la plus recommandée. D'une part, en zone endémique, l'immunité de prémunition protège la plupart des chevaux porteurs des formes cliniques graves. D'autre part, commencent à être décrites des résistances de plus en plus importantes des parasites contre ces traitements [77].

VII.A.2. Prophylaxie vaccinale

Il n'existe pas à ce jour de vaccin contre la piroplasmose équine. Malgré cela, de nombreuses études s'intéressent à l'immunogénicité de certains antigènes de piroplasmes, à la stimulation immunitaire qu'ils provoquent, et *in fine* au développement de vaccins. En 1992, Knowles met en évidence la protéine EMA-1, principal antigène de *T. equi*. Il note par ailleurs que les anticorps EMA-1 persistent durant les 33 semaines que dure l'étude, sans réexposition au parasite [95]. En 2002, Kumar vaccine des ânes à partir d'antigènes de mérozoïtes de *T. equi* tués. Cette étude montre une protection immunitaire forte et spécifique durant au moins 4 semaines, durée de l'étude [100]. Plus récemment, en 2009, la production d'une protéine EMA-1 recombinante au sein de levures *Pichia pastoris*, et leur injection à des souris a montré la production d'une réponse immunitaire forte et spécifique, capable de réagir avec les protéines EMA-1 natives de *T. equi* [127].

Il reste cependant plusieurs points encore non élucidés par les études actuelles, tels que la durée de protection d'un tel vaccin s'il était réalisé, son innocuité, etc. De plus, les exigences réglementaires actuelles dans la majorité des pays indemnes de piroplasmose sont la nécessité d'obtenir un test sérologique négatif afin de pouvoir importer un animal depuis une région endémique. La production d'un vaccin devra donc être en adéquation avec ces exigences, en permettant la différenciation entre anticorps vaccinaux et infectieux, ou alors les exigences devront évoluer (tests de dépistage génétiques, etc.).

VII.B. Prophylaxie sanitaire

VII.B.1. Lutte contre les vecteurs

La lutte contre les tiques est la première mesure à mettre en place. Bien que l'élimination des tiques du biotope soit impossible à atteindre, plusieurs moyens de lutte existent pour diminuer les risques de transmission de la piroplasmose.

VII.B.1.a. Lutte écologique

Tout d'abord, la lutte écologique, qui va consister au contrôle de l'environnement de vie commun aux tiques et aux hôtes. Une gestion correcte de la végétation en taillant les haies, les arbres, arbustes et végétaux en bord de pâture, débroussailler, limiter l'accès aux bois et sous-bois, etc. permet de limiter la prolifération des tiques et leurs contacts avec les chevaux, et est ainsi une première étape essentielle dans la lutte contre la transmission de maladies telles que la piroplasmose équine [32] [173].

D'autre part, lutter contre la présence d'hôtes des tiques appartenant à la faune sauvage (rongeurs, cervidés, etc.) permet également de diminuer la présence de tiques de l'environnement de vie du cheval, et ainsi le risque de transmission de parasites [32].

VII.B.1.b. Lutte chimique

La lutte chimique va consister en l'application de produits acaricides ou répulsifs sur le cheval afin de prévenir l'attachement d'une tique. Actuellement en France, un seul médicament antiparasitaire externe anti-tiques possède une AMM pour les équidés : le SEBACIL 50 % SOLUTION[®]. Il s'agit d'un médicament à base de Phoxim, un organophosphoré. Chez les chevaux, la posologie recommandée est de 1 mL dans 1 Litre d'eau, avec application à l'éponge sur l'animal avec au moins 2 à 3 Litres de solution. Cependant, si la rémanence est de quelques semaines pour les gales, poux et mélophages, l'action sur les tiques est uniquement curative, dès 24h après application, et avec une rémanence de quelques jours tout au plus [18].

Il existait auparavant d'autres produits antiparasitaires externes tels que le DIMPYGAL[®], contenant du Dimpylate, un organophosphoré ou l'ACADREX 60[®] contenant du Fenvalérate, un pyréthrianoïde, qui n'ont aujourd'hui plus d'AMM pour les chevaux. Le BUTOX[®], médicament antiparasitaire externe utilisé chez les animaux d'élevage (bovins et ovins), est un pour-on ou un spray contenant de la deltaméthrine, un pyréthrianoïde, parfois utilisé chez les chevaux hors AMM [5] [43].

VII.B.1.c. Lutte biologique [32]

La lutte biologique contre les tiques englobe plusieurs projets, difficiles à mettre en place à ce jour :

- L'élevage puis l'introduction dans le milieu de prédateurs naturels des tiques (comme l'oiseau pique-bœufs, des araignées, des fourmis)
- L'utilisation de parasitoïdes hyménoptères, qui détruisent les tiques
- L'utilisation d'agents pathogènes des tiques tels que des bactéries (*Proteus mirabilis*, *Cedecea lepagi*, *Bacillus thuringiensis*), des champignons (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*) ou encore des nématodes (*Heterorhabditidae*, *Steinernematidae*)

Cependant, des obstacles pratiques, environnementaux, sanitaires, ou encore le manque d'études font de ces idées des projets particulièrement difficiles à mettre en œuvre.

VII.B.1.d. Extraction manuelle des tiques

L'extraction manuelle des tiques est elle aussi indispensable à la prévention des maladies transmises par celles-ci. Associée aux autres méthodes préventives (répulsifs, gestion de l'environnement), elle permet de réduire les risques de transmission, si les tiques sont retirées de l'animal dans les 24-48h après leur fixation. En retour de promenade, à la sortie du pré si celui-ci présente une végétation propice au développement de tiques, lors du passage, l'animal doit être minutieusement inspecté sur l'ensemble du corps. Si des tiques sont observées, elles doivent être retirées. L'utilisation d'un tire-tique facilite l'extraction complète de la tique, incluant le corps et la tête. Après extraction, il est possible de désinfecter localement afin d'éviter les surinfections cutanées [147].

VII.B.2. Réglementation en pays indemne

Dans les pays indemnes de piroplasmose, la prophylaxie passe également par une réglementation stricte quant à la prévention, la déclaration et la gestion des cas. Tout d'abord, les pays indemnes, tels que les États-Unis, le Canada, le Japon, demandent avant l'importation d'un cheval la réalisation d'un test sérologique montrant que l'animal est indemne de piroplasmose. Les chevaux positifs ne peuvent entrer sur le territoire, ou sous certaines conditions strictes dans des cas de figures particuliers nécessitant un séjour temporaire. Ces chevaux sont mis en quarantaine, examinés régulièrement pour déceler la présence de tiques et mis sous acaricide avant importation.

Des mesures existent également lors de la déclaration d'un cas autochtone de piroplasmose. Aux États-Unis, la déclaration d'un cas positif à la piroplasmose est obligatoire,

le cheval est mis en quarantaine et des mesures sont prises, pouvant aller du traitement sous conditions strictes à l'abattage [183].

Conclusion de la première partie

La piroplasmose équine est une maladie due à des hémoparasites, *Babesia caballi* ou *Theileria equi*, transmis par des tiques. La grande diversité des vecteurs en fait une maladie présente dans la quasi-totalité du monde. On considère en effet que 90% des chevaux dans le monde vivent sur un territoire où la piroplasmose est endémique. Les formes cliniques sont diverses et rarement caractéristiques, nécessitant, pour avoir un diagnostic de certitude, la réalisation d'examens de laboratoire généralement sérologiques ou moléculaires. Le traitement de cette maladie est également un enjeu, dans le sens où les molécules efficaces connues ont un indice thérapeutique faible et des effets secondaires marqués. Par conséquent, la prévention de la piroplasmose équine, qu'elle soit médicale ou sanitaire, est indispensable dans la gestion de cette affection.

Le caractère endémique et la polymorphie des formes cliniques, allant d'un syndrome anémique aigu rare à une forme inapparente fréquente, rend difficile la détermination exacte d'une prévalence de la maladie. Par ailleurs, étant étroitement liée aux populations de tiques, les changements géographiques et saisonniers de ces populations modifient l'épidémiologie de la maladie. Dans notre deuxième partie, nous présenteront l'étude réalisée, à savoir la détermination d'une prévalence de la piroplasmose équine dans le Grand-Ouest. En parallèle, une étude des facteurs de risque d'infection sera également réalisée, à partir d'un questionnaire distribué aux participants de l'étude.

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE PROSPECTIVE – DÉTERMINATION DE LA PRÉVALENCE ET DES FACTEURS DE RISQUE DE LA PIROPLASMOSE ÉQUINE EN FRANCE

I. Objectifs de l'étude

Ce projet a pour objectif l'analyse de la prévalence du portage sain de la piroplasmose équine en France, obtenue par PCR. Les écoles vétérinaires attirent des animaux provenant de nombreux départements en France. Nous aurons ainsi une population de chevaux inclus dans l'étude à la fois plus importante, et provenant d'environnements différents, soumis à des pratiques d'élevage différentes. Une prise de sang sera effectuée sur les chevaux venant en consultation en école vétérinaire pour la détection des parasites responsables de piroplasmose. En parallèle, il sera réalisé une analyse de risque d'être porteur de *Babesia caballi* ou *Theileria equi* à partir de données obtenues via un questionnaire rempli par les propriétaires.

Ma thèse d'exercice vétérinaire s'inscrit dans le programme PiroQuest du projet PiroGoTick porté par l'équipe TiBoDi de l'UMR BIOEPAR. PiroGoTick est un projet de recherche fondamentale et appliquée, qui s'appuie sur la science participative, et qui repose sur la participation de nombreux acteurs privés (propriétaires d'équidés), d'acteurs du secteur professionnel privé comme public (Labéo, RESPE, 4 écoles Nationales Vétérinaires françaises), socioprofessionnel (Fédération National du Cheval) et associatif (Sciences équines). L'objectif du projet est d'apporter des connaissances sur la piroplasmose équine (prévalence, portage, diversité génétique des deux parasites responsables), les tiques présentes sur les Equidés (diversité des espèces en France et dynamique spatio-temporelle), les modalités de transmission des deux espèces parasitaires par ces vecteurs (compétence et capacité vectorielle), ainsi que l'étude des facteurs de risque d'être infecté, environnementaux et individuels. Pour cela, le projet s'appuie sur la mise en place de 5 programmes de sciences participatives :

- PiroTick vise à cartographier les différentes espèces de tiques collectées sur Équidés en France,
- PiroSentinel vise à étudier la dynamique spatio-temporelle des tiques en France grâce à des collectes hebdomadaires sur plus de 2000 Equidés pendant deux ans,

- PiroPâture va analyser finement l'environnement d'Equidés suivis dans le programme PiroSentinel (analyse de végétation, des sols, gestion des pâtures) en lien avec la dynamique spatiotemporelle des tiques collectées,
- Têtatiques, objective les variations individuelles d'attractivité des chevaux pour les tiques, avec une analyse pour tenter de définir des phénotypes de chevaux "à risque" sur la base de questionnaires,
- PiroQuest vise à étudier la prévalence du portage parasitaire chez les chevaux asymptomatiques reçus dans les cliniques des écoles vétérinaires et d'étudier les facteurs de risque sur l'appui d'un questionnaire.

Le projet a été présenté le 04/03/2019, puis approuvé par le CERVO, comité d'éthique d'ONIRIS.

II. Matériels et méthodes

II.A. Animaux inclus dans l'étude

II.A.1. Critères d'inclusion et d'exclusion

Les chevaux inclus dans cette étude sont ceux venus en consultation dans une école vétérinaire. La participation au projet se fait sur demande du propriétaire, ou après proposition par la clinique équine lors de la consultation. Tout motif de consultation peut permettre à l'animal de participer au projet : trouble de santé, reproduction, chirurgie, orthopédie, convenance, dentisterie, etc. Sur accord du propriétaire, un papier d'information sur le projet ainsi qu'un consentement éclairé est fourni (cf. Annexes 1 et 2).

Le seul critère de non inclusion dans l'étude est la présentation par l'animal de signes évocateurs de piroplasmose.

Pour les chevaux retenus dans notre étude, les deux critères d'exclusion correspondent à l'absence de l'un ou de l'autre des deux éléments principaux de cette étude : le questionnaire ou la prise de sang réalisée pour la recherche des parasites par PCR.

II.A.2. Nombre d'animaux et origine

Entre le début du projet en Mai 2019 et Octobre 2020, seuls les chevaux venant en consultation au CISCO à Nantes pouvaient participer à cette étude. A la rentrée 2020, les trois autres écoles vétérinaires françaises ont pu rejoindre le projet. Ainsi, entre le 16/05/2019 et le 12/07/2021, ce sont 343 chevaux qui ont été inclus dans cette étude (cf. Figure 33).

- 150 chevaux à Nantes
- 79 chevaux à Maisons-Alfort
- 80 chevaux à Lyon
- 34 chevaux à Toulouse

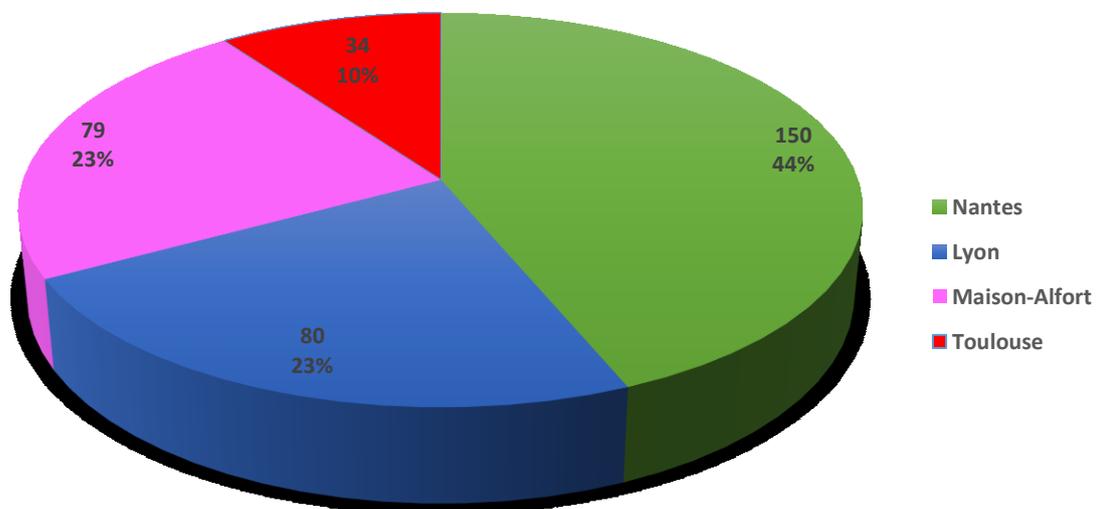


Figure 33 : Répartition des chevaux de l'étude selon leur école d'origine

II.B. Variables explicatives de l'étude

II.B.1. Entrée de l'animal dans l'étude

II.B.1.a. Attribution d'un numéro de dossier

Un numéro de dossier était attribué à l'animal. Ce numéro était inscrit de la manière suivante :

« *CVnn-XX* »

- « *nn* » correspondait à l'année (19 pour 2019, 20 pour 2020 et 21 pour 2021)
- « *XX* » était le numéro de l'animal dans l'étude
- Pour distinguer les écoles, une initiale était ajoutée, sauf pour Nantes
 - « *CV* » pour Nantes
 - « *CVA* » pour Maison-Alfort
 - « *CVT* » pour Toulouse
 - « *CVL* » pour Lyon

Ex : le 13^e animal de 2020 à Lyon a le numéro de dossier « **CVL20-13** ».

II.B.1.b. Pochettes de documents

Pour que l'ensemble des documents et matériels nécessaires à l'étude soient systématiquement donnés au propriétaire, un système de pochettes a été mis en place. Était mis à disposition des étudiants en rotation d'équine, des internes et des cliniciens dans tous les services un carton contenant un ensemble de pochettes plastiques. Chaque pochette contenait :

- La lettre d'information du projet (cf. Annexe 1)
- La fiche de consentement éclairé à faire signer au propriétaire (cf. Annexe 2)
- Le questionnaire, avec le numéro de dossier pré-rempli, afin d'éviter les doublons (cf. Annexe 3)
- Deux tubes héparinés de 10 mL, avec le numéro de dossier correspondant au questionnaire de la même pochette déjà indiqué, pour le diagnostic PCR

II.B.1.c. Méthode de recueil des données

L'un des objectifs de notre étude étant l'analyse des facteurs de risque influençant le portage des parasites de la piroplasmose, un ensemble de données concernant les animaux, leur environnement de vie, leur historique médical, etc. était à recueillir. Pour ce faire, a été créé un

questionnaire à faire remplir par le propriétaire lors de sa consultation. Ce questionnaire de 5 pages était précédé de la lettre d'information (cf. Annexe 3).

Les données des questionnaires remplis étaient ensuite rentrées dans un tableau Excel synthétisant l'ensemble de nos variables. Ces données ont été rentrées de différentes façons en fonction de la question initiale. Certaines réponses ont été codées sous forme de donnée brute (ex : âge de l'animal exprimé en années, ou sexe de l'animal). D'autres l'ont été après transformation en variable qualitative, prenant la valeur « 1 » si la case de questionnaire était cochée, ou que la réponse à la question était « oui », et prenant la valeur « 0 » dans le cas contraire. Lorsqu'une réponse n'avait pas lieu d'être en fonction du contexte, la variable prenait la valeur « SO » pour « Sans Objet » (ex : « *Votre cheval a-t-il déjà été diagnostiqué positif pour la piroplasmose ? Non.* » ; « *Si oui, il y a combien de temps ? SO.* »). Les données manquantes étaient codées « NA ».

II.B.2. Données recueillies pour l'étude

II.B.2.a. Données propres à l'animal

La première partie du questionnaire recueillait les informations concernant l'identité de l'animal, son âge, son sexe, sa race, sa robe, sa taille, son lieu de vie et son utilisation actuelle. L'objectif était d'évaluer si les caractéristiques propres de l'individu pouvaient ou non influencer sur le portage de la maladie.

○ *Age, sexe, taille*

L'âge et la taille de l'animal ont été codés par deux variables prenant pour valeur l'âge du cheval en années (« *age* ») et sa taille en centimètres (« *tail_cv* »).

Le sexe de l'animal a été codé par une variable « *sexe* » prenant les valeurs « *mal* », « *fem* » ou « *hong* », selon que le cheval soit un mâle entier, une femelle ou un hongre respectivement.

○ *Race et robe*

Pour les données de race et de robe, une première variable permettait le codage de la donnée brute, nommée « *race* » et « *robe* » respectivement.

Pour les races, les abréviations suivantes ont été utilisées :

- « *sf* » pour « Selle français »
- « *tf* » pour « Trotteur français »
- « *ps* » pour « Pur-sang »
- « *oc* » / « *onc* » pour « Origine constatée » / « Origine non constatée »
- « *pfs* » pour « Poney français de selle »

- « *psa* » pour « Pur-sang arabe »
- « *aqps* » pour « Autre que pur-sang »
- « *aa* » pour « Anglo-arabe »
- Les autres races étaient notées en toutes lettres.

Pour les robes, seule la robe dominante était gardée, comme par exemple :

- « bai brun » → « bai »
- « alezan brûlé » → « alezan »
- « pie alezan » → « pie »

○ *Lieu de vie*

Cette question a été rajoutée au cours de l'étude, en Octobre 2019. En effet, il a été remarqué que l'adresse du propriétaire, recueillie dans le consentement éclairé, pouvait parfois être éloignée de l'adresse de vie réelle de l'animal. Une question « code postal et commune de vie du cheval » a donc été ajoutée au questionnaire.

Ce lieu de vie était codé par deux variables. La variable « *cp* » prenait pour valeur le code postal de la commune de vie du cheval. Le but de cette donnée était la possibilité d'obtenir l'étendue géographique drainée par les écoles vétérinaires. La variable « *dpt* », gardait le numéro de département de vie du cheval.

Enfin, une variable « *ecole* » prenait comme modalité l'école vétérinaire dans laquelle le cheval a été vu en consultation.

○ *Utilisation*

Quatre propositions étaient faites dans le questionnaire concernant l'utilisation du cheval : la compétition, le loisir, la promenade, la reproduction. Un cinquième choix « autre utilisation », pour lequel les propriétaires pouvaient préciser l'utilisation faite du cheval, était également proposé. Chacune des 4 propositions a été codée de manière qualitative, permettant la prise en compte des animaux ayant plusieurs types d'activité (ex : compétition + loisir). Les précisions quant à la proposition « autre utilisation », quand il y en avait, étaient rentrées directement dans le tableau Excel.

II.B.2.b. Historique médical de piroplasmose

Nous avons vu dans la première partie bibliographique que la piroplasmose est une maladie pour laquelle les parasites ont une capacité de persistance dans l'organisme variable, et particulièrement importante pour *T. equi*. Par conséquent, il nous a semblé intéressant que le questionnaire s'intéresse à un éventuel historique médical de piroplasmose.

- *Diagnostic antérieur de piroplasmose*

Une première question concernant l'existence d'un historique de piroplasmose chez le cheval était posée, codée par une variable nommée « *dant* » prenant les valeurs « 0 » ou « 1 ». Puis une variable « *dant_tem* » prenait pour valeur le temps depuis lequel ce diagnostic antérieur positif avait été posé, ou la modalité « SO » le cas échéant.

- *Méthodes de détection utilisées*

Quatre variables qualitatives, nommées « *dantt_fro* », « *dantt_ser* », « *dantt_pcr* », « *dantt_nsp* », correspondaient aux choix proposés dans le questionnaire, à savoir respectivement si le diagnostic antérieur avait été posé par une technique de « frottis sanguin », par une technique de « sérologie », par une technique de « PCR » ou si le propriétaire ne savait pas ou plus la technique utilisée. Chacune de ces variables pouvait prendre la valeur « 0 », « 1 » ou « SO ».

- *Parasite incriminé*

L'agent infectieux incriminé était codé par 3 variables qualitatives nommées « *dantp_bab* », « *dantp_thei* » et « *dantp_nsp* ». Ces variables suivaient les choix proposés dans le questionnaire, à savoir respectivement un diagnostic antérieur de *Babesia caballi*, un diagnostic antérieur de *Theileria equi*, ou un diagnostic antérieur pour lequel le propriétaire ne sait pas ou plus le parasite incriminé. Chacune de ces variables pouvait prendre la valeur « 0 », « 1 » ou « SO ».

- *Traitement*

Pour le traitement utilisé lors de diagnostic antérieur positif, les variables utilisées suivaient également les choix du questionnaire, à savoir « *dantm_carb* » pour une piroplasmose antérieure traitée au Carbésia, « *dantm_ox* » pour un traitement à l'Oxytétracycline, « *dantm_aut* » pour un autre traitement utilisé, et « *dantm_nsp* » si la personne ne savait pas ou plus le traitement utilisé. Chacune de ces variables pouvait prendre la valeur « 0 », « 1 » ou « SO ».

II.B.2.c. Déplacements de l'animal

La partie suivante concernait les déplacements de l'animal au cours de sa vie. En effet, comme nous en avons déjà parlé précédemment, la filière équine se caractérise par des échanges et des déplacements fréquents des animaux, sur des distances parfois très importantes. Que ce soit pour la compétition, le commerce, la reproduction, etc. Il est fort probable qu'un animal soit amené à fréquenter au cours de ces déplacements des environnements potentiellement à risque vis à vis des tiques.

- *Achat de l'animal*

Une variable « *achat* » prenait les valeurs « 1 » si l'animal avait été acheté et « 0 » si ce n'était pas le cas. Une deuxième question à visée descriptive, concernant les lieux où a vécu le cheval avant son achat, était également posée.

- *Déplacements à risque de l'animal*

Une variable « *dep_rsq* » permettait de coder la réalisation de déplacements jugés à risque par ce cheval, à savoir des déplacements fréquents, d'une durée supérieure à une semaine et dans des environnements *a priori* à risque (boisements, haies, prés peu entretenus). Une deuxième question, codée par une variable « *lieu_dep_rsq* », à visée descriptive, concernant les lieux de ces déplacements, était également posée.

II.B.2.d. Environnement de vie de l'animal

Venait ensuite un ensemble de questions concernant l'environnement de vie actuel du cheval. Nous avons effectivement vu que la piroplasmose est avant tout une maladie transmise par les tiques, et donc directement dépendante de la présence de ses vecteurs dans le milieu. L'analyse du biotope entourant les chevaux de notre étude est par conséquent indispensable dans l'analyse de risque de rencontrer des tiques, et *in fine* d'être porteur de la piroplasmose.

- *Temps passé par l'animal en extérieur*

Les tiques vectrices de piroplasmose vivant dans des milieux de type broussaille, haies, sous-bois, etc., il était tout d'abord nécessaire de caractériser si l'animal vivait ou non en extérieur, mais aussi le temps qu'il y passait, correspondant au temps de contact potentiel avec des tiques.

Une première série de 4 variables qualitatives caractérisait le fait que l'animal vivait ou non en extérieur, et que cela soit de manière complète ou partielle : « *alt_prin* », « *alt_ete* », « *alt_autom* » et « *alt_hiv* ». Pour chaque saison (printemps, été, automne et hiver respectivement), la variable prenait la valeur « 0 » si le cheval vivait entièrement au box, la valeur « 1 » si le cheval alternait entre pré et box, et la valeur « 2 » si le cheval vivait entièrement au pré.

Une deuxième série de 4 variables quantitatives caractérisait le temps passé (en heures, à l'unité près) en extérieur en moyenne par jour, et ce à chaque saison : « *text_prin* », « *text_ete* », « *text_autom* », « *text_hiv* ». Cette variable prenait une valeur entière allant de 0 à 24.

- *Type d'enherbement et hauteur d'herbe*

Le type d'enherbement des prés utilisé par l'animal était codé par 3 variables qualitatives suivant les propositions du questionnaire : « *padd_sable* » pour les paddocks sans herbe, « *pra_sem* » pour les prairies semées et « *pra_perm* » pour les prairies permanentes. Chaque

variable pouvait prendre la valeur « 0 », « 1 », ou « SO » pour les chevaux vivant au box toute l'année.

Pour la hauteur d'herbe, 2 variables qualitatives, « *herb_rase* » et « *herb_haute* », correspondent aux modalités « herbe rase » et « herbe haute » dans les pâtures, et pouvant prendre également les valeurs « 0 », « 1 » ou « SO ».

○ *Délimitation et entretien des pâtures*

Les haies et les bosquets étant des milieux de vie favorables à la survie des tiques, deux questions concernant le type de bordure et l'entretien des pâtures ont été posées.

La délimitation des pâtures était codée par 3 variables qualitatives, nommées « *clot* » pour les pâtures délimitées par une clôture uniquement, « *haie* » si les pâtures étaient délimitées par des haies sur au moins 1 côté, et « *foret* » lorsque de la forêt ou des bosquets étaient présents sur au moins 1 côté.

Deux variables qualitatives, nommées « *pre_uni* » et « *pre_hetero* », servaient à coder les modalités « pré uniformément enherbé » et « pré hétérogène (ronces, arbrisseaux, etc.) ».

Chacune de ces variables pouvait prendre la valeur « 0 », « 1 » ou « SO ».

○ *Humidité des pâtures*

L'humidité des pâtures, et en particulier la présence de points d'eaux dans celles-ci, est également *a priori* un facteur de risque de la présence de tiques.

Les modalités d'humidité des pâtures étaient codées par 3 variables qualitatives, nommées « *pre_eauprox* » pour les pâtures présentant un point d'eau à proximité (accessible ou non), « *pre_inond* » pour les pâtures inondées une partie de l'année, et « *pre_sseau* » pour les pâtures ne présentant pas de point d'eau naturel. Chacune de ces variables pouvait prendre la valeur « 0 », « 1 » ou « SO ».

○ *Animaux sauvages*

Nous avons parlé dans notre première partie bibliographique de l'importance de la faune sauvage dans les maladies transmises par les tiques. En effet, les petits mammifères sauvages, les sangliers, les ongulés, et même parfois les oiseaux peuvent être des hôtes de tiques. Par ailleurs, des animaux comme des échassiers ou des ragondins peuvent être marqueurs de la présence de milieux humides.

Une première variable qualitative, « *anx_sau* », permettait de caractériser le fait que le propriétaire voyait des animaux sauvages ou leurs traces dans ses prés.

Une série de 5 variables caractérisait ensuite la fréquence avec laquelle ces animaux sauvages étaient vus :

- « *anx_an* » : une fois par an
- « *anx_bimens* » : 5 à 6 fois par an
- « *anx_mens* » : tous les mois
- « *anx_sem* » : toutes les semaines
- « *anx_jour* » : tous les jours

Enfin, une série de 7 variables caractérisait les espèces observées dans les prés :

- « *cer* » : cervidés
- « *sang* » : sangliers
- « *ren* » : renards
- « *lap* » : lapins
- « *can* » : canards
- « *ech* » : échassiers
- « *anx_aut* » : autres animaux

II.B.2.e. Tiques

Après avoir étudié l'environnement de vie du cheval, la suite du questionnaire nous a permis de caractériser directement la présence de tiques, observées par le propriétaire.

○ *Tiques sur le cheval*

Nous avons commencé par caractériser l'observation de tiques par le propriétaire sur le cheval directement. Une première variable qualitative, « *tcv* », correspondait au fait que le propriétaire avait déjà observé des tiques sur son cheval. Les variables « *tcv_prin* », « *tcv_ete* », « *tcv_autom* », « *tcv_hiv* », « *tcv_nsp* » correspondent aux différentes saisons au cours desquelles ont été observées des tiques sur le cheval par son propriétaire, ainsi que la modalité « ne sait pas ».

Les variables « *tailtcv_12mm* », « *tailtcv_23mm* », « *tailtcv_3mm* », « *tailtcv_nsp* » correspondaient aux gammes de taille des tiques observées : respectivement « 1 à 2 mm », « 2 à 3 mm », « plus de 3 mm », « ne sait pas ».

○ *Tiques sur les pâtures*

C'est ensuite l'observation de tiques dans les pâtures qui était caractérisée, avec les mêmes questions et propositions que pour l'observation des tiques sur le cheval.

La variable « *tpre* » correspondait au fait que le propriétaire avait déjà observé des tiques dans ses pâtures. Les variables « *tpre_prin* », « *tpre_ete* », « *tpre_autom* », « *tpre_hiv* », « *tpre_nsp* » correspondaient aux différentes saisons auxquelles avaient été observées des tiques dans les pâtures par le propriétaire, ainsi que la modalité « ne sait pas ».

Les variables « *tailtpre_12mm* », « *tailtpre_23mm* », « *tailtpre_3mm* », « *tailtpre_nsp* » correspondaient aux gammes de taille des tiques observées : « 1 à 2 mm », « 2 à 3 mm », « plus de 3 mm », « ne sait pas ».

II.B.2.f. Compagnons

Enfin, étaient caractérisés les compagnons du cheval dans la pâture, ainsi que les animaux domestiques qu'il rencontrait.

○ *Compagnons de pâture*

Pour chaque saison, 5 variables qualitatives servaient à coder les différentes modalités proposées dans le questionnaire quant aux compagnons de pâture du cheval. Au printemps, « *comp_prin* » codait pour le fait que le cheval présentait ou non des compagnons de pâture au printemps. « *comp_prin_cv* », « *comp_prin_bv* », « *comp_prin_pr* », « *comp_prin_aut* » caractérisaient quels compagnons de pâture avait le cheval, à savoir respectivement d'autres chevaux, des bovins, des petits ruminants ou d'autres animaux d'élevage. Les mêmes variables, assorties du déterminant *ad hoc* (« *ete* », « *autom* », « *hiv* »), étaient utilisées pour les autres saisons.

○ *Compagnons domestiques*

Des variables qualitatives ont également été créées pour caractériser la présence d'animaux domestiques dans l'environnement de vie du cheval. Les variables « *chien* », « *chat* », « *dom_aut* » codaient pour les espèces présentes.

La variable « *tdom* » caractérisait le fait que le propriétaire avait ou non déjà observé des tiques sur ces animaux domestiques.

II.B.3. Recueil des données paracliniques

Parallèlement à cela, les données paracliniques des examens hémato-biochimiques étaient également récupérées, via Clovis, le logiciel de clinique des CHUV. Comme pour les données d'environnement, les données hémato-biochimiques étaient rentrées dans un tableau Excel, sous divers noms de variables quantitatives.

○ *Données hématologiques*

Les valeurs de la lignée blanche étaient codées par des variables nommées « *gb* », « *neutro_mat* », « *neutro-hypo* », « *lympho* », « *mono* », « *eosino* », « *baso* », correspondant respectivement aux valeurs du comptage des globules blancs, des granulocytes neutrophiles matures, des granulocytes neutrophiles hyposegmentés, des lymphocytes, des monocytes, des granulocytes éosinophiles et des granulocytes basophiles.

Les valeurs de la lignée rouge étaient codées par les variables notées « *gr* », « *hg* », « *ht* », « *vgm* », « *tcmh* », « *ccmh* », correspondant respectivement aux valeurs du comptage des globules rouges, du taux d'hémoglobine, de l'hématocrite, du VGM, du TCMH et du CCMH.

La valeur du comptage thrombocytaire était codée par la variable « *plt* », pour plaquettes.

○ *Données biochimiques*

Les valeurs des données biochimiques étaient codées par des variables nommées « *creat* », « *uree* », « *pal* », « *asat* », « *ggt* », « *bili_tot* », « *ck* », « *pt* », « *alb* », « *fibri* », « *glu* », « *lac* », pour respectivement la créatinine, l'urée, les PAL, les ASAT, les gamma-GT, la bilirubine totale, les CK, les protéines totales, l'albumine, le fibrinogène, le glucose et les lactates.

○ *Données du ionogramme*

Les valeurs de concentration sanguine en sodium, potassium et chlore ont été codées par les variables « *sod* », « *pota* », « *chlo* » respectivement.

II.B.4. Recodage de certaines variables

II.B.4.a. Race, robe et lieu de vie

Il est rapidement apparu que certaines races et certaines robes étaient largement représentées, comparativement à d'autres. La race « Selle français » est majoritairement représentée, avec 108 individus sur 343, tandis que le « Cruzado », le « Haflinger », ou le cheval « Camarguais » par exemple, ne sont représentés que par un individu chacun. De même, les robes « Bai » et « Alezan » sont largement majoritaires chez les chevaux de cette étude.

Par ailleurs, du fait que les chevaux participant à cette étude soient vus en consultation dans les écoles vétérinaires, certains départements de vie sont très largement surreprésentés. Ainsi, la Loire-Atlantique (44), le Rhône (69) et les Yvelines (78) rassemblent 132 des 343 chevaux de l'étude.

Il a donc été créé 3 nouvelles variables, nommées « *race_freq* », « *robe_freq* » et « *dpt_freq* » avec un seuil, grâce auquel nous avons rassemblé sous une même modalité « autre » les races, robes et départements sous-représentés, afin de faciliter l'analyse statistique

ultérieurement. Ainsi, les modalités de race, robe et département pour lesquelles nous avons moins de 10 individus étaient rassemblées dans cette catégorie « autre ».

II.B.4.b. Autres animaux sauvages observés

Grâce à la possibilité laissée aux propriétaires de noter les « autres animaux sauvages » observés dans leurs prés ne faisant pas partie des réponses proposées, il est vite apparu que les ragondins et les faisans étaient régulièrement observés. Les ragondins étant des marqueurs d'un milieu humide, et les faisans d'un milieu plutôt forestier, il nous est paru intéressant d'intégrer ces animaux à nos variables explicatives. Nous avons donc créé 2 nouvelles variables qualitatives, codées en « 0 » ou « 1 », nommées « *rag* » et « *fais* », reprenant ces possibilités de réponse.

II.C. Analyse moléculaire des échantillons sanguins

II.C.1. Récupération et préparation des échantillons sanguins

A la réception du tube de sang, celui-ci était nettoyé à l'extérieur sous l'eau, puis pulvérisé d'alcool à 70°. Deux étalements directs, notés SD, étaient immédiatement réalisés avec 3 µL de sang total.

Le tube de sang était ensuite centrifugé (2 200 tours / minute, 10 minutes) et le plasma était collecté. Environ 1,8 mL du culot (globules rouges + buffy coat) étaient mélangés à 5 mL d'une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline). Le tube était de nouveau centrifugé et le surnageant (PBS) était éliminé. Un volume de PBS égal au volume de globules rouges était ajouté, puis le tube était homogénéisé, et aliquoté en tubes eppendorf. Un tube de 200 µL était utilisé pour l'extraction d'ADN, et 2 tubes de 1 500 µL étaient conservés à -20°C.

Deux nouvelles lames d'étalement sanguin, notées GR, étaient réalisées à partir de 5 µL de ce tube. Les lames SD et GR étaient colorées au May-Grünwald-Giemsa et observées au microscope optique. Deux lames SD et GR étaient quant à elles conservées (cf. Annexe 4).

L'extraction de l'ADN génomique était ensuite réalisée en utilisant le kit Macherey-Nagel « NucleoSpin Blood » (cf. Annexe 5).

II.C.2. Recherche de l'ADN parasitaire par PCR dans les échantillons sanguins (cf. Annexe 6)

La recherche des parasites dans nos échantillons se base sur la technique de PCR nichée, afin d'amplifier l'ADN parasitaire s'il est présent dans l'échantillon. Lors d'une PCR nichée, 2 PCR sont réalisées successivement (la 2^e PCR étant dite « nichée » sur la première), en utilisant 3 couples d'amorces différents. Le premier couple d'amorces, utilisé pour la première PCR, se fixe indifféremment à *T. equi* et *B. caballi*. Deux autres couples d'amorces, spécifiques de chaque parasite, sont utilisés pour la deuxième PCR.

Un mélange réactionnel, ou mix, est réalisé avec le premier couple d'amorces, une ADN polymérase, une solution tampon, des désoxyribonucléotides, du MgCl₂ et de l'eau. Un mélange de 20 µL de ce mix et de 7 µL d'extrait d'ADN obtenu à partir du tube de sang (cf. **II.C.1.a.**) est réalisé dans un microtube, qui est ensuite mis dans le thermocycleur.

Deux nouveaux mix sont préparés, de la même manière que précédemment, mais en utilisant les amorces spécifiques à chaque parasite. Un mélange de 20 µL de mix et de 10 µL des produits de la première PCR après dilution au 1/100^e est fait dans de nouveaux microtubes, qui sont ensuite mis dans le thermocycleur.

Avec le même protocole, des témoins négatifs et positifs sont réalisés respectivement à partir d'eau ou d'ADN extraits du sang de chevaux détectés positifs (CV19-07, CV19-08, CV19-16). Le témoin négatif permet de contrôler l'absence de contamination par de l'ADN de l'environnement au cours de l'extraction ou de l'amplification PCR. Le témoin positif permet de s'assurer que le protocole a fonctionné.

Après les cycles d'amplification, 5 µL du produit de PCR est utilisé pour migration sur gel d'agarose à 1%. L'utilisation d'un marqueur permet ensuite la lecture de cette migration. Le poids moléculaire attendu du produit d'amplification est d'environ 1250 paires de bases pour *T. equi*, et 910 paires de bases pour *B. caballi*. Les échantillons non utilisés pour la migration sur gel d'agarose sont stockés à 4°C.

Les résultats positifs sont confirmés par un séquençage de l'ADN du parasite détecté (EuroFins).

II.D. Analyse statistique

L'ensemble de nos tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel R (version 4.0.3).

II.D.1. Analyse statistique univariée

II.D.1.a. Analyse statistique univariée des variables qualitatives

Nous avons utilisé pour cela le test exact de Fisher bilatéral, et le test du Khi 2. Le test exact de Fisher nous permettait la comparaison de deux variables qualitatives à deux modalités, et le test du Khi 2 la comparaison de deux variables multimodales, afin de tester l'existence d'un lien statistique. Certaines variables ont été codées de différentes manières (passage de la multimodalité à la bimodalité) afin de tester différemment leur éventuel impact sur le portage parasitaire.

II.D.1.b. Analyse statistique univariée des variables quantitatives

Cette analyse ne concerne que quelques-unes de nos variables potentiellement explicatives, à savoir la taille du cheval, son âge et le temps passé en extérieur à chaque saison. Nous avons pour cela utilisé le test de Wilcoxon-Mann-Whitney dont le principe est d'évaluer si deux échantillons quantitatifs proviennent d'une même distribution ou non.

Ce test statistique a également été utilisé pour le traitement des résultats des analyses hématobiochimiques.

II.D.2. Analyse statistique multivariée

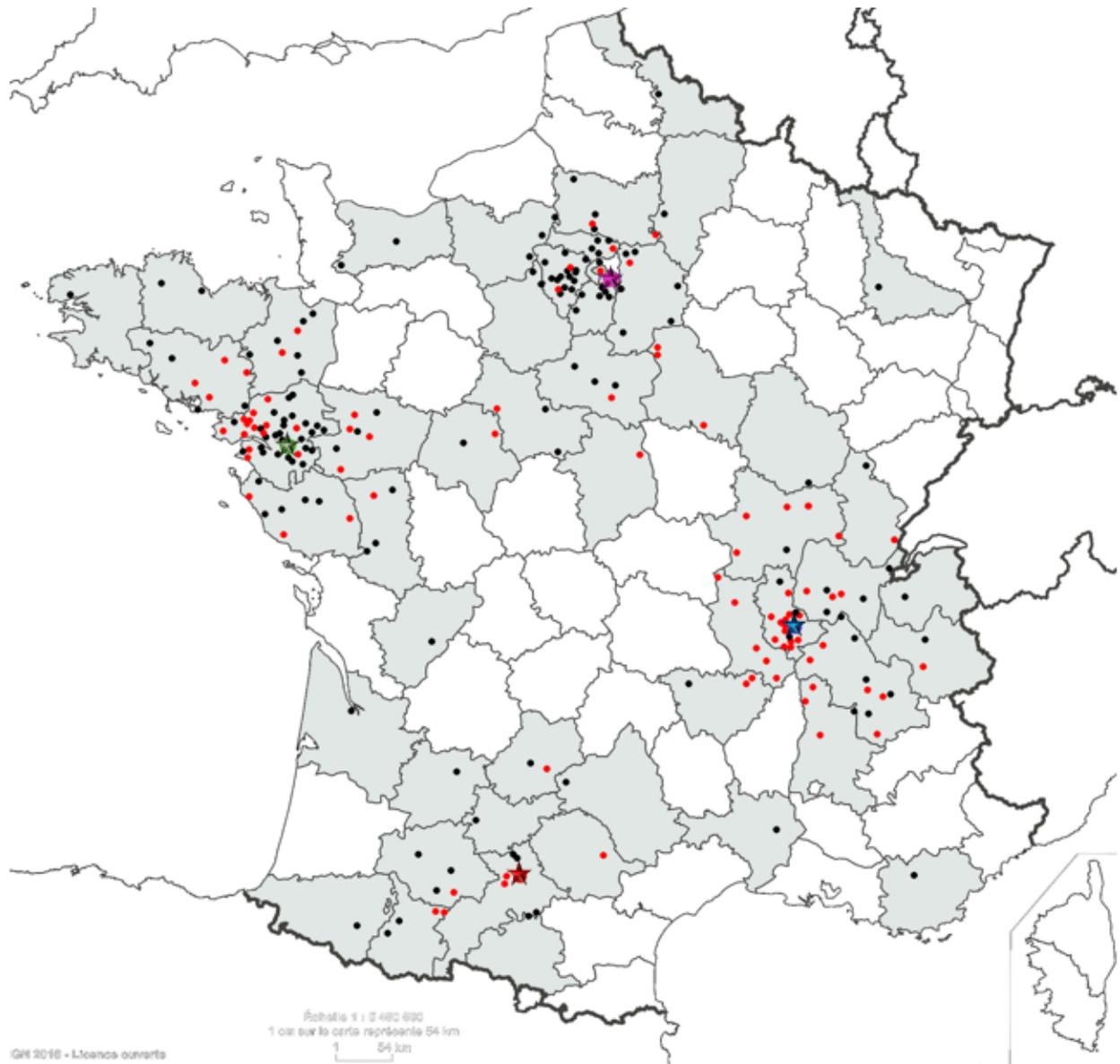
L'analyse multivariée s'est déroulée en plusieurs étapes. Tout d'abord, la réalisation de matrices de corrélation nous a permis de vérifier l'absence de corrélation entre les variables d'intérêt. Il nous a été ainsi possible de choisir les variables les plus intéressantes pour l'analyse statistique multivariée. Nous avons ensuite utilisé la méthode de la régression logistique, appliquée aux variables sélectionnées via l'analyse univariée, les données bibliographiques, et les matrices de corrélation, pour créer un modèle, par procédure ascendante, descendante ou mixte.

III. Résultats

III.A. Résultats du questionnaire

III.A.1. Répartition géographique des chevaux de l'étude

Les 4 écoles vétérinaires ayant participé au projet, il a été possible d'avoir des chevaux provenant d'une grande partie du territoire français métropolitain. Grâce à la variable « *dpt* », dans laquelle nous rentrions le département de vie du cheval, il a été possible de réaliser une carte géographique résumant la répartition des chevaux ayant participé à l'étude en France (cf. Figure 34). Le fond de carte initial a été récupéré sur le site de l'IGN (source : <https://www.ign.fr/institut/ressources-pedagogiques>).



- ★ Nantes
- ★ Lyon
- ★ Toulouse
- ★ Maison-Alfort
- Cheval négatif aux 2 parasites
- Cheval positif à au moins 1 parasite

Figure 34 : Répartition géographique de la population d'étude

On peut noter que la majorité des chevaux de l'étude sont regroupés autour des écoles vétérinaires, ou dans un département limitrophe. Il existe tout de même quelques exceptions, avec la participation de chevaux éloignés des écoles.

III.A.2. Description des chevaux

L'âge des 341 chevaux participants à cette étude s'étend de 6 mois à 31 ans, avec une moyenne à 11,1 ans, une médiane à 10 ans, et un premier et troisième quartile à 6 ans et 15 ans respectivement (cf. Figure 35 et Annexe 7). Ce sont donc des chevaux plutôt jeunes ainsi que des jeunes adultes qui représentent la majorité de notre population d'étude.

Concernant le sexe des chevaux de l'étude, nous avons une majorité de femelles avec 153 individus, puis des hongres avec 144 individus, et enfin une minorité de mâles entiers avec 44 individus (cf. Figure 35).

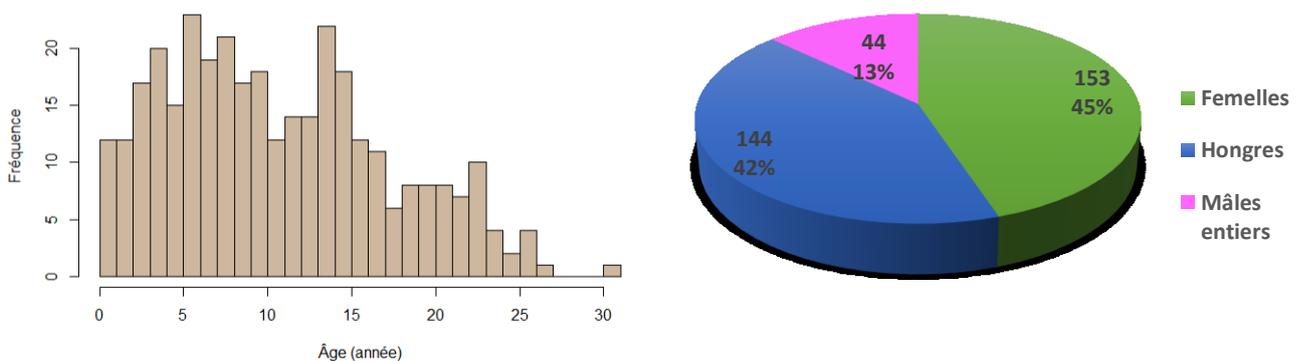


Figure 35 : Distribution des âges de la population d'étude (gauche) et répartition des individus selon leur sexe (droite).

Les données de race, de robe et de département étaient quant à elles beaucoup plus variables. Quarante races d'équidés sont représentées parmi notre population d'étude. Cependant, les individus sont loin d'être distribués de façon équivalente entre toutes ces races. En effet, la race Selle Français est largement sur-représentée avec 108 individus (soit près d'un tiers des chevaux), les deux races suivantes les plus représentées étant le Trotteur Français et les chevaux ONC avec 27 individus. Une majorité des races sont quant à elles sous-représentées avec seulement quelques individus (cf. Annexe 7 et Figure 36).

De manière similaire, la robe « Bai » est largement sur-représentée avec 130 individus (soit plus d'un tiers des chevaux), suivie de la robe « Alezan » avec 69 individus et « Gris » avec 47 individus. Quatre des 10 modalités de robe présentes dans notre étude sont quant à elles sous-représentées avec moins de 3 individus (cf. Annexe 7 et Figure 36).

Les départements d'origine des chevaux sont eux aussi distribués de manière non homogène. Comme nous avons pu l'observer visuellement sur la Figure 34, la majorité des chevaux de l'étude sont rassemblés autour des écoles vétérinaires. Ainsi, sur les 53 départements représentés dans notre étude, 36 possèdent 5 individus ou moins, et seuls 7

possèdent plus de 10 individus : la Loire-Atlantique (44), département de Nantes, le Rhône (69), département de Lyon, les Yvelines (78), département de région parisienne, le Loir-et-Cher (41), la Haute-Garonne (31), département de Toulouse, l'Isère (38), département limitrophe de Lyon et le Morbihan (56), département limitrophe de Nantes (cf. Annexe 7 et Figure 37).

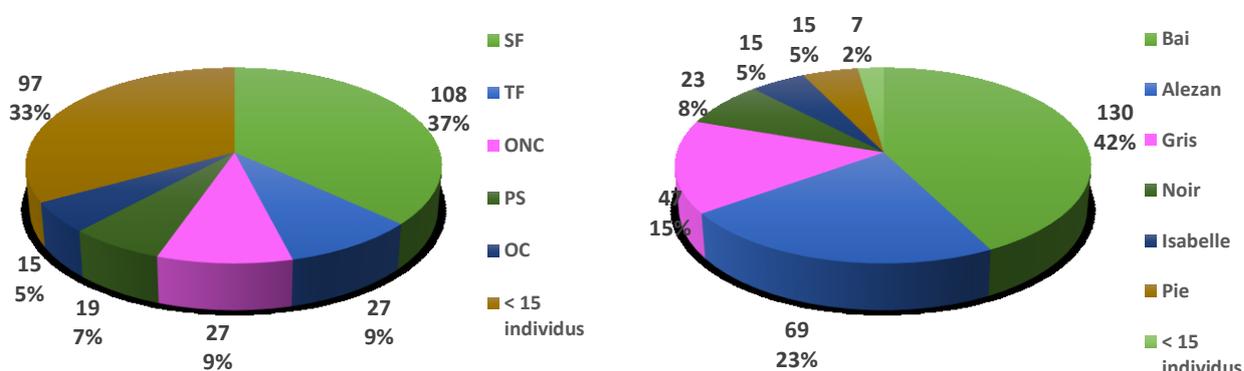


Figure 36 : Répartition des individus de l'étude selon leur race (gauche) et leur robe (droite)

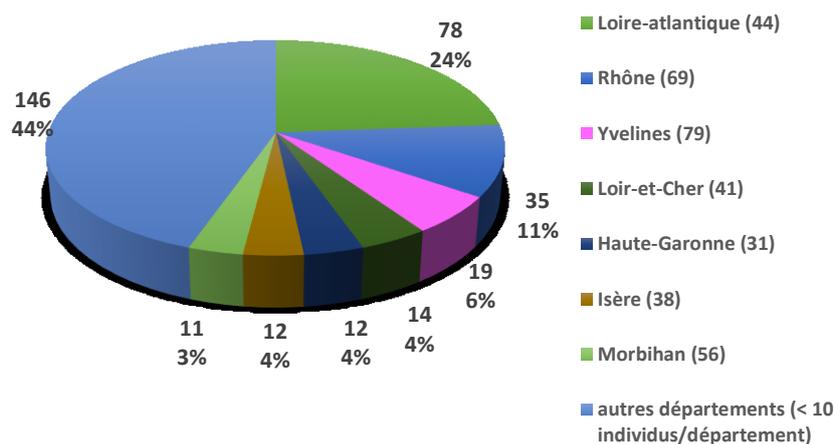


Figure 37 : Répartition des individus de l'étude selon leur département d'origine

Concernant les activités pratiquées par les chevaux de l'étude, nous pouvons noter que près de la moitié pratiquaient de la compétition (150/317) et/ou du loisir (152/317). Environ un tiers des chevaux étaient utilisés pour une activité de promenade (91/317) et environ 5% des chevaux avaient une activité de reproduction (15/317) (cf. Annexe 7).

Dix-huit chevaux étaient à la retraite, et 23 chevaux avaient une « autre activité », pouvant être de l'attelage, de l'élevage (pour les jeunes poulains encore non débouffés), de la chasse, etc.

III.A.3. Description des antécédents de piroplasmose

Sur les 317 participants ayant répondu à la question, 30 ont déjà été testés positifs à la piroplasmose un jour.

III.A.3.a. Technique diagnostique utilisée

La question concernant la technique diagnostique utilisée offrait 4 choix, avec la possibilité de cocher plusieurs réponses :

- « frotti sanguin »,
- « sérologie »,
- « PCR »,
- « ne sait pas ».

Sur les 29 individus ayant répondu à cette question :

- 15 individus ont eu un diagnostic par sérologie uniquement,
- 3 individus ont eu un diagnostic par PCR uniquement,
- 1 individu a eu un diagnostic par PCR et sérologie,
- 1 individu a eu un diagnostic par PCR, sérologie et frotti sanguin,
- 9 individus ne savent pas.

On voit que la sérologie est la technique la plus fréquemment utilisée, avec 17 individus sur 29 en ayant eu au moins une, soit 59% des chevaux.

III.A.3.b. Parasite incriminé

Sur les 29 participants ayant répondu à cette question :

- 6 individus ont déjà eu un diagnostic antérieur positif à *T. equi*,
- 5 individus ont déjà eu un diagnostic antérieur positif à *B. caballi*,
- 1 individu a déjà eu un diagnostic antérieur positif à *T. equi* et *B. caballi*,
- 17 individus ne savent pas.

Il est intéressant pour cette question de noter la forte proportion de « ne sait pas » (17/29, soit 59% des réponses). Plusieurs explications peuvent être trouvées à cela. Premièrement, il est fort possible que, hormis le nom général de « piroplasmose », le nom des parasites soit

inconnu des propriétaires. Une autre possibilité pourrait être qu'aucun diagnostic de certitude ne soit réalisé lors de la suspicion de piroplasmose. En effet, il n'est pas rare, particulièrement dans le Sud de la France où la piroplasmose est fréquente, de traiter les animaux suspects « à l'aveugle ». Par conséquent, il est tout à fait possible que le participant ait coché « oui » à la question concernant un éventuel diagnostic antérieur de piroplasmose, sans pour autant qu'un réel diagnostic de certitude n'ait été réalisé.

III.A.3.c. Traitement mis en place

Sur les 28 participants ayant répondu à cette question :

- 16 ont été traités avec de l'imidocarbe uniquement,
- 2 ont été traités avec de l'oxytétracycline uniquement,
- 3 ont été traités avec un « autre médicament » (non précisé),
- 2 ont été traités avec de l'imidocarbe et de l'oxytétracycline,
- 5 ne savent pas.

On peut noter que l'imidocarbe est le traitement le plus fréquemment mis en place, avec 18 individus qui en ont reçu à l'occasion de leur épisode de piroplasmose, seul ou en association, soit 64% des chevaux.

III.A.4. Description des environnements de vie

III.A.4.a. Description du pâturage

- *Temps passé en extérieur*

La question était posée pour chaque saison, le participant ayant la possibilité de renseigner le nombre d'heures par jour passées au pré par son cheval. Que ce soit par la variable qualitative « *alt_X* », ou quantitative « *text_X* » (« X » étant le suffixe servant à désigner la saison), nous pouvons noter que la distribution des individus est très hétérogène, avec une majorité de chevaux passant 24/24h au pré (cf. Annexe 7 et Figure 38). Avec une médiane à « 24h » quelle que soit la saison, on a une majorité des chevaux avec des temps en extérieur longs.

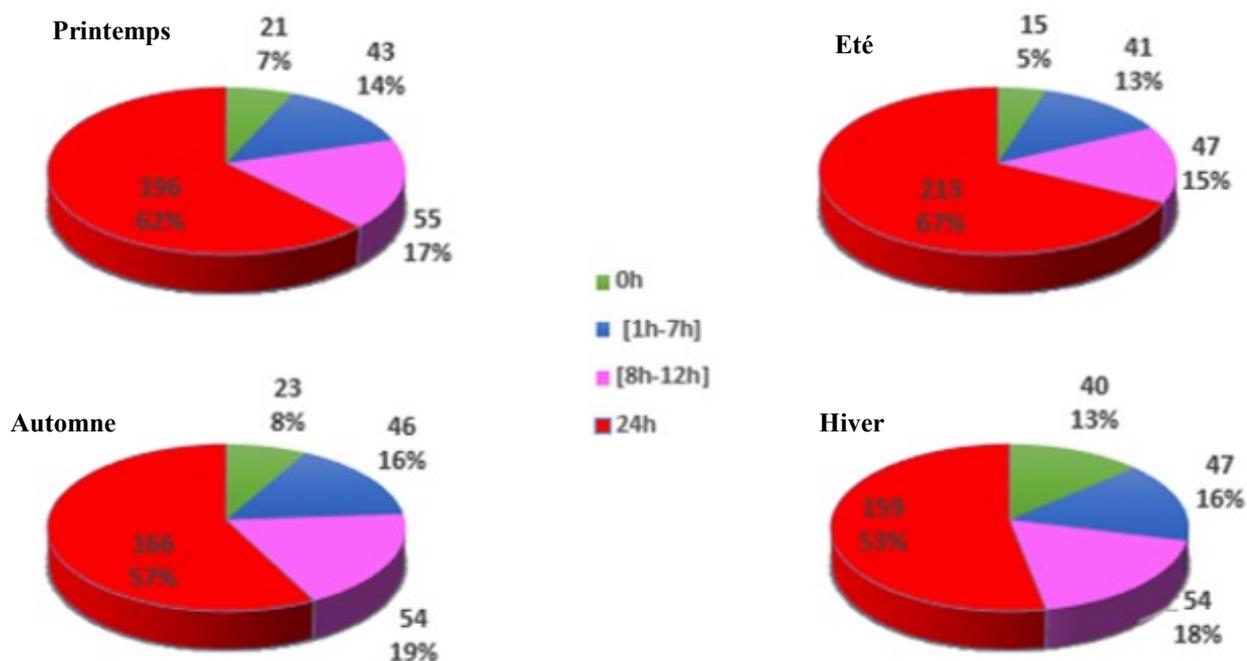


Figure 38 : Répartition des individus en fonction du temps passé au pré chaque jour

Il est tout de même possible de noter que les individus vivent un peu plus en extérieur au printemps et en été, et plus au box en hiver. Les différences sont cependant relativement faibles, avec une majorité d'individus en permanence dehors, quelle que soit la saison. On voit également qu'après 12h, nous passons directement à 24h, sans durée intermédiaire. Cela s'explique probablement par le fait que les propriétaires mettent leur cheval au pré durant la journée, et le rentrent au box la nuit. Enfin, on peut noter que 12 individus sur nos 343 participants sont toute l'année au box.

○ *Type de pâtures*

La répartition des individus en fonction du type de pâtures dans lesquelles ils vont est elle aussi assez hétérogène, avec une nette sur-représentation des prairies permanentes. En effet, 237 chevaux sur les 302 qui pâturent vont dans au moins une prairie permanente, soit 78% des individus. Cinquante-deux chevaux vont dans au moins une prairie semée, soit 17% des individus, et 71 chevaux vont dans au moins une prairie permanente, soit 24% des individus (cf. Annexe 7). Par ailleurs, on peut noter que 54 chevaux, soit 18% des individus, vont dans plusieurs types de pâtures (cf. Figure 39).

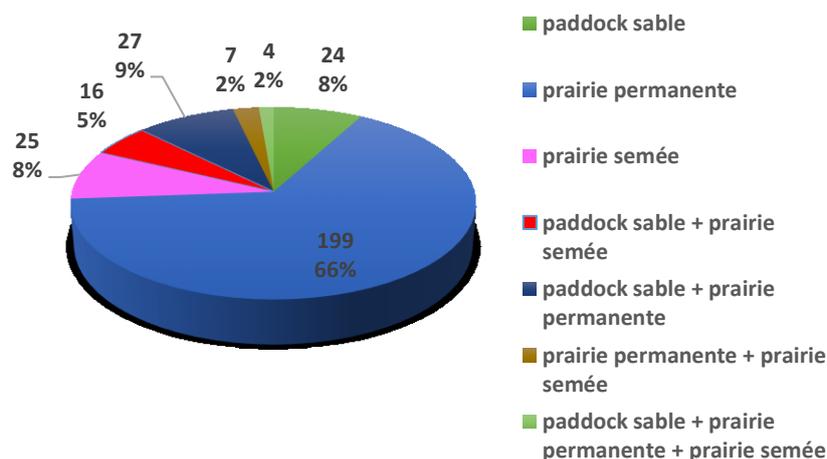


Figure 39 : Répartition des individus en fonction du type de pâtures fréquentées

○ *Hauteur d'herbe et hétérogénéité des pâtures*

Parmi les 300 individus ayant répondu à la question sur la hauteur d'herbe, 127 ont coché que leur cheval fréquente au moins une pâture avec de l'herbe rase, et 186 ont coché que leur cheval fréquente au moins une pâture avec de l'herbe parfois haute. Ainsi, ce sont 13 individus qui ont coché les 2 réponses, à savoir que leur cheval fréquente différents types de pâtures, certaines ayant une herbe haute et d'autres une herbe rase (cf. Annexe 7 et Figure 40-A).

Parmi les 273 individus ayant répondu à la question sur l'hétérogénéité des pâtures, 143 ont coché que leur cheval fréquente des prés uniformément enherbés, et 139 ont coché que leur cheval fréquente des prés hétérogènes, avec buissons, ronces, arbustes, etc. Ainsi, ce sont 9 individus qui ont coché les 2 réponses, à savoir que leur cheval va fréquenter des pâtures uniformes et des pâtures hétérogènes (cf. Annexe 7 et Figure 40-B).

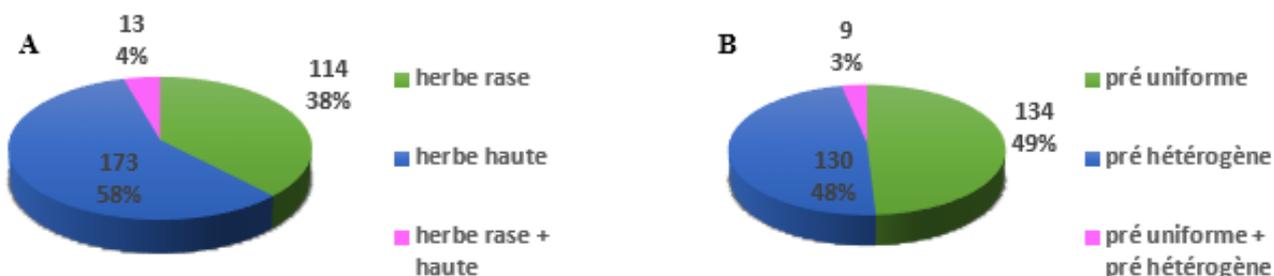


Figure 40 : Répartition des individus en fonction de la hauteur d'herbe des pâtures fréquentées (A) et de l'hétérogénéité des pâtures (B)

○ *Type de bordure*

Parmi les 310 individus ayant répondu à la question, il y a 148 chevaux qui fréquentent des pâtures entourées d'une clôture artificielle seule, 126 qui fréquentent des pâtures dont au moins un côté est bordé par des haies, et 97 qui fréquentent des pâtures dont au moins un côté est bordé par de la forêt. On peut également noter que 59 chevaux fréquentent des pâtures entourées de haies et de forêts (cf. Annexe 7 et Figure 41).

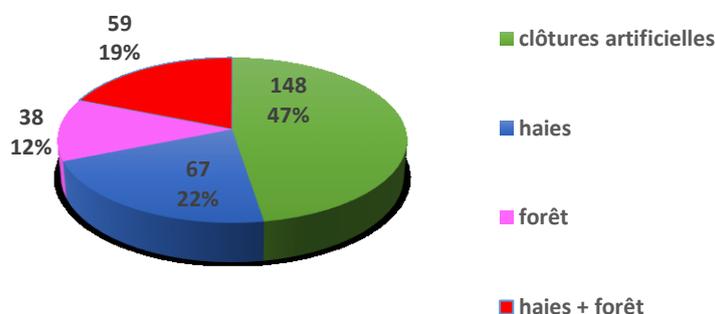


Figure 41 : Répartition des individus en fonction du type de bordure

○ *Humidité des pâtures*

Parmi les 306 individus ayant répondu à cette question, 113 fréquentent des pâtures présentant un point d'eau à proximité, accessible ou non aux chevaux, 40 fréquentent des pâtures partiellement inondées durant une partie de l'année, et 183 fréquentent des pâtures plutôt sèches, non inondées et sans point d'eau à proximité. Par ailleurs, 19 chevaux fréquentent des pâtures avec un point d'eau à proximité et inondées une partie de l'année (cf. Annexe 7 et Figure 42).

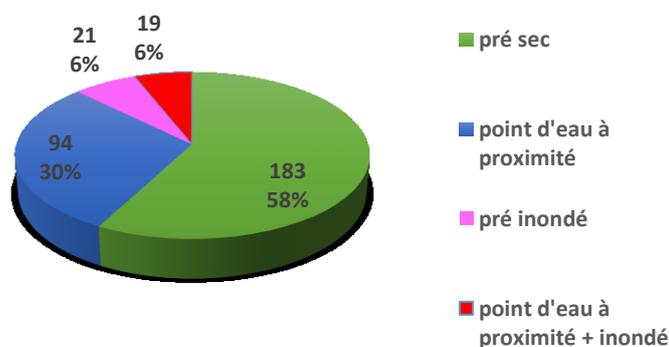


Figure 42 : Répartition des individus en fonction de l'humidité des pâtures qu'ils fréquentent

III.A.4.b. Description des interactions avec la faune sauvage

Parmi les 321 chevaux au pâturage et pour lesquels nous avons une réponse à cette question, ce sont 270 chevaux, soit 84% des individus, pour lesquels les propriétaires voient, plus ou moins régulièrement, des animaux sauvages ou leurs traces dans les prés. La fréquence de visualisation de ces animaux est assez variable (cf. Annexe 7).

Les différentes espèces proposées par le questionnaire sont observées dans des proportions assez variables (cf. Annexe 7). L'animal le plus fréquemment observé est le lapin, avec 214 individus en observant sur les 262 concernés. Il est suivi des cerfs, des sangliers et des renards, avec 162, 157 et 148 réponses positives respectivement. Enfin, les échassiers, les canards, les ragondins et les faisans sont moins fréquemment observés, avec 68, 68, 30 et 18 réponses positives respectivement.

III.A.4.c. Description des relations avec les tiques

- *Les tiques du cheval* (cf. Annexe 7)

Parmi les 330 individus ayant répondu à cette question, ce sont 228 qui ont déjà vu des tiques sur leur cheval, soit 69% des chevaux.

Ces tiques sont le plus souvent observées au printemps ($185/228 = 81\%$ des chevaux) et en été ($163/228 = 71\%$ des chevaux), et un peu moins fréquemment en automne ($116/228 = 51\%$ des chevaux) et en hiver ($82/228 = 36\%$ des chevaux).

Concernant la taille des tiques, sur les 227 réponses obtenues, nous pouvons noter que ce sont majoritairement des tiques de taille moyenne qui sont vues (« 2-3 mm » : $182/227 = 80\%$ des chevaux) et un peu moins fréquemment des tiques de petite taille (« 1-2 mm » : $155/227 = 68\%$ des chevaux) ou de grande taille (« > 3 mm » : $141/227 = 42\%$ des chevaux).

- *Les tiques du pré* (cf. Annexe 7)

Parmi les 293 individus ayant répondu à cette question, ce sont 113 qui ont déjà vu des tiques dans leurs prés, soit 39% des chevaux.

Ces tiques sont le plus souvent observées au printemps ($87/107 = 81\%$ des chevaux) et en été ($80/109 = 73\%$ des chevaux), et un peu moins fréquemment en automne ($58/107 = 54\%$ des chevaux) et en hiver ($40/99 = 40\%$ des chevaux). On peut voir que les effectifs totaux changent à chaque saison. En effet, cette question d'observation de tiques dans les prés fréquentés par le cheval ne concerne que les chevaux au pré. Ainsi, les chevaux vivant

au box à la saison concernée ne sont pas comptés dans l'effectif total, la question étant « sans objet » pour eux.

Concernant la taille des tiques, sur les 109 réponses obtenues, nous pouvons noter que les tiques les plus fréquemment observées sont les plus grosses. Des tiques de plus de 3 mm sont observées dans 76% des cas (83/109) ; des tiques de 2-3 mm sont observées dans 72% des cas (78/109) ; et des tiques de 1-2 mm sont observées dans 49% des cas (53/109).

III.A.4.d. Description des relations avec d'autres compagnons de pâture

Quelle que soit la saison considérée, on peut noter qu'une majorité des animaux vivent en groupe quand ils sont au pré. En effet, à chaque saison, c'est entre 78% et 79% des individus qui ont des compagnons de pâture (cf. Annexe 7).

Concernant les espèces avec lesquelles ces chevaux pâturent, ce sont très majoritairement d'autres équidés. En effet, quelle que soit la saison, parmi les chevaux qui pâturent en groupe, entre 96% et 97% le font avec d'autres équidés. On peut également noter que 6 individus pâturent avec des petits ruminants toute l'année ; qu'un individu pâture avec des bovins au printemps, en été et en hiver ; et enfin qu'un individu pâture aux côtés de lamas toute l'année (cf. Annexe 7).

III.A.4.e. Description des relations avec les animaux domestiques

Près de deux tiers des individus côtoient des chiens (222/319 = 70% des chevaux), et un peu moins de la moitié des individus côtoient régulièrement des chats (139/319 = 44%). Enfin, on peut noter que parmi ces individus, 55% des propriétaires voient des tiques sur ces animaux domestiques (cf. Annexe 7).

III.B. Résultats des analyses moléculaires

Les résultats de l'analyse PCR pour *T. equi* et *B. caballi* étaient compilés dans un fichier Excel au fur et à mesure de leur arrivée.

III.B.1. Résultats à l'échelle de la France

Sur les 343 chevaux participants :

- 130 étaient positifs à au moins l'un des deux parasites,
- 123 étaient positifs à *T. equi*,
- 10 étaient positifs à *B. caballi*.

Cela correspond à un taux de positivité moyen de 37,9% (IC₉₅ : [32,8 - 43,3]), dont 35,9% (IC₉₅ : [30,8 - 41,2]) de positivité à *T. equi*, 2,9% (IC₉₅ : [1,5 - 5,5]) de positivité à *B. caballi* et 0,9% (IC₉₅ : [0,2 - 2,5]) de positivité aux 2 parasites.

III.B.2. Résultats par école

III.B.2.a. Nantes

A Nantes, sur les 150 chevaux participants, 47 sont positifs à *T. equi* et aucun n'est positif à *B. caballi*. Cela correspond à un taux de positivité de 31,3% (IC₉₅ : [24,2 - 39,5]) pour *T. equi* et 0% pour *B. caballi* (cf. Figure 43).

III.B.2.b. Maisons-Alfort

A Maisons-Alfort, sur les 79 chevaux participants, 13 sont positifs à *T. equi* et 3 sont positifs à *B. caballi*. Cela correspond à un taux de positivité de 16,5% (IC₉₅ : [9,4 - 26,9]) pour *T. equi* et 3,8% (IC₉₅ : [0,8 - 10,7]) pour *B. caballi* (cf. Figure 43).

III.B.2.c. Lyon

A Lyon, sur les 80 chevaux participants, 46 sont positifs à *T. equi* et 7 sont positifs à *B. caballi*. Cela correspond à un taux de positivité de 57,5% (IC₉₅ : [46 - 68,3]) pour *T. equi* et 8,8% (IC₉₅ : [3,9 - 17,7]) pour *B. caballi*, dont 3,8% (IC₉₅ : [0,8 - 10,6]) de positivité aux 2 parasites (cf. Figure 43).

III.B.2.d. Toulouse

A Toulouse, sur les 34 chevaux participants, 17 sont positifs à *T. equi* et aucun n'est positif à *B. caballi*. Cela correspond à un taux de positivité de 50% (IC₉₅: [34,1 – 65,9]) pour *T. equi* et 0% pour *B. caballi* (cf. Figure 43).

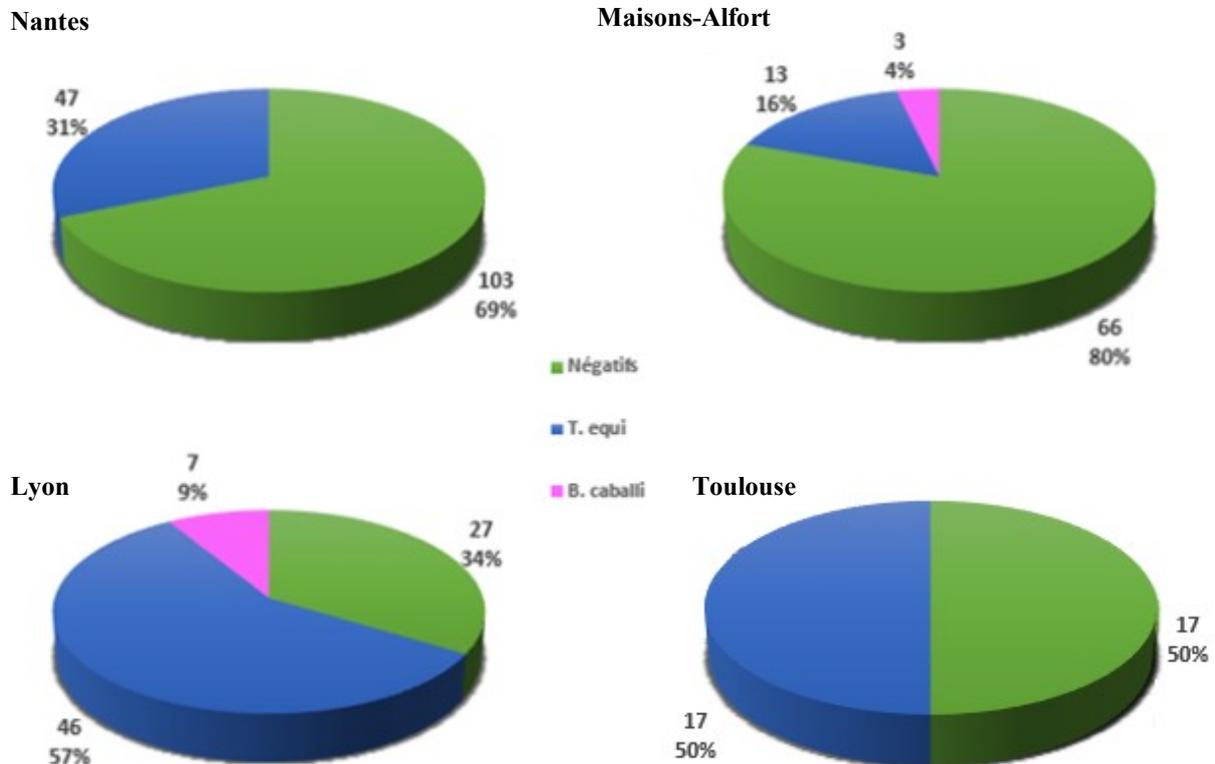


Figure 43 : Taux de positivité à *Theileria equi* et *Babesia caballi*

III.C. Approche statistique et modélisation du risque

Cette approche statistique a été réalisée dans l'objectif de trouver d'éventuelles variables explicatives de la positivité à *T. equi*. Avec seulement 10 individus positifs à *B. caballi*, l'approche de la positivité à ce parasite sera uniquement descriptive.

Les effectifs notés en gras correspondent aux effectifs anormalement élevés. Les p-value significatives ($< 0,05$) sont en rouge et gras et les tendances ($0,05 < p\text{-value} < 0,2$) sont en italique et gras.

III.C.1. Analyse univariée à l'échelle de la France

III.C.1.a. Données propres aux chevaux

Nous avons commencé par tester le lien entre la positivité à *T. equi* et les données propres aux chevaux. Pour les données d'activité et de déplacements à risque, nous avons utilisé le test exact de Fisher (cf. Tableau IX). Pour les données quantitatives d'âge et de taille, nous avons utilisé le test de Wilcoxon-Mann-Whitney (cf. Tableau X). Pour les données de sexe, de race, de robe, de département d'origine et d'école d'origine, nous avons utilisé le test du Khi2 ainsi que le test exact de Fisher pour les départements avec un effectif faible (cf. Tableau XI et XII).

Tableau IX : Lien entre utilisation du cheval, déplacements à risque et positivité à *Theileria equi*

		Positifs	Négatifs
Compétition	Oui	49	101
	Non	66	101
			0,24
Loisir	Oui	61	91
	Non	54	111
			0,20
Promenade	Oui	39	52
	Non	76	150
			0,16
Reproduction	Oui	6	9
	Non	109	193
			0,79
Retraite	Oui	6	12
	Non	109	191
			1
Déplacements à risque	Oui	14	26
	Non	94	159
			0,86

Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test exact de Fisher

Tableau X : Lien entre âge, taille et positivité à *Theileria equi*

	Positifs		Négatifs	
Âge (années)	11,42	0,38	10,84	
Taille (cm)	156,7	0,58	159,1	

Les valeurs correspondent à l'âge moyen et la taille moyenne de chaque effectif
 Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test de Wilcoxon-Mann-Whitney

Tableau XI : Lien entre sexe, race, robe, département et école d'origine et positivité à *Theileria equi*

		Positifs		Négatifs	
Sexe	Mâle	16	0,98	28	
	Femelle	56		97	
	Hongre	51		93	
Race	SF	34	0,037	74	
	TF	6		21	
	PS	7		12	
	ONC	17		10	
	OC	5		10	
Robe	Bai	41	0,46	89	
	Alezan	25		44	
	Gris	20		27	
	Noir	9		14	
Département d'origine	Loire-atlantique (44)	24	0,041	54	
	Rhône (69)	19		16	
	Yvelines (78)	3		16	
	Loir-et-Cher (41)	5		9	
Ecole d'origine	Nantes	47	2,51^{e-7}	103	
	Maisons-Alfort	13		66	
	Lyon	46		34	
	Toulouse	17		17	

Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test du Khi2

Tableau XII : Lien entre les départements 31 et 56 et la positivité à *Theileria equi*

		Positifs	Négatifs
Haute-Garonne (31)	Oui	8	4
	Non	115	200
		0,063	
Morbihan (56)	Oui	5	6
	Non	118	198
		0,75	

Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test exact de Fisher

Pour les données propres aux chevaux, on voit que 3 variables sont significativement liées à la positivité à *T. equi* : la race, le département d'origine et l'école d'origine.

L'étude des résidus standardisés de Haberman sur les tests du Khi2 nous montre que :

- La race « ONC » est plus souvent positive à *T. equi*,
- Les chevaux du département du Rhône (69) sont plus souvent positifs à *T. equi*,
- Les chevaux vus à Lyon sont plus souvent positifs à *T. equi*,
- Les chevaux vus à Toulouse ont tendance à être plus positifs à *T. equi*,
- Les chevaux vus à Maisons-Alfort sont plus souvent négatifs à *T. equi*,
- Les chevaux du département des Yvelines (78) sont plus souvent négatifs à *T. equi*.

Par ailleurs, le test exact de Fisher nous montre que :

- Les chevaux du département de la Haute-Garonne (31) ont tendance à être plus souvent positifs à *T. equi*.

Il est important de noter que de fortes corrélations existent entre plusieurs de ces variables. En effet, il est évident que les écoles d'origine et les départements d'origine sont intimement liés : le département 69 correspondant à la localisation de l'école de Lyon, le département 78 ne regroupant que des chevaux ayant consulté à Maisons-Alfort, le département 31 correspondant à la localisation de l'école de Toulouse. Ce qui semble ressortir au final, c'est que les départements du Sud semblent plus touchés par *T. equi* que ceux plus au Nord.

De plus, on peut noter que la répartition des races entre les écoles est hétérogène, les animaux de race « ONC » étant significativement plus fréquents à Lyon (cf. Tableau XIII).

Tableau XIII : Répartition des chevaux ONC entre Lyon et les autres écoles

		Lyon		Autre école	
ONC	Oui	11			16
	Non	59	0,024		241

La valeur au centre correspond à la p-value du test exact de Fisher

III.C.1.b. Antécédents de piroplasmose

Nous avons testé le lien entre l'existence d'un diagnostic antérieur de piroplasmose positif et la positivité à *T. equi* aujourd'hui, avec un test exact de Fisher (cf. Tableau XIV).

Tableau XIV : Lien entre positivité antérieure à la piroplasmose et positivité aujourd'hui à *Theileria equi*

		Positifs		Négatifs	
Diagnostic antérieur positif	Oui	15			15
	Non	99	0,11		188

La valeur au centre correspond à la p-value du test exact de Fisher

Il ne semble pas y avoir de lien statistique entre le fait d'avoir été un jour positif à la piroplasmose et le fait d'être positif à *T. equi* aujourd'hui. Les autres questions concernant l'existence d'un diagnostic antérieur positif de piroplasmose concernaient trop peu d'individus pour faire l'objet de tests statistiques (cf. III.A.3.).

III.C.1.c. Temps de pâturage

Pour tester le lien entre temps de pâturage et positivité à *T. equi*, nous avons, pour chaque saison, testé nos 2 variables « *alt_X* » et « *text_X* ». Cela nous a permis de tester deux niveaux de précision de cette information :

- la variable « temps en extérieur à la saison X », quantitative, avec le test de Wilcoxon-Mann-Whitney (cf. Tableau XV),

- la variable « alternance à la saison X », qualitative à 3 modalités (« 0 » pour les chevaux au box, « 1 » pour les chevaux pâturant entre 1 et 12h par jour, et « 2 » pour les chevaux 24/24h au pré) avec le test du Khi2 (cf. Tableau XVI).

Tableau XV : Lien entre temps de pâturage à chaque saison et positivité à *Theileria equi* (quantitatif)

	Positifs		Négatifs
Printemps	19,7	0,00049	16,0
Eté	20,2	0,0049	17,2
Automne	18,7	0,00096	15,0
Hiver	17,4	0,00051	13,3

Les valeurs correspondent à la moyenne en heure du temps passé en extérieur à chaque saison
 Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test de Wilcoxon-Mann-Whitney

Tableau XVI : Lien entre temps de pâturage à chaque saison et positivité à *Theileria equi* (qualitatif)

		Positifs		Négatifs
Printemps	0h	3		18
	[1h – 12h]	32	0,0036	79
	24h	85		111
Eté	0h	3		12
	[1h – 12h]	31	0,068	72
	24h	86		124
Automne	0h	4		19
	[1h – 12h]	42	0,0065	94
	24h	74		92
Hiver	0h	8		32
	[1h – 12h]	42	0,0013	93
	24h	70		79

Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test du Khi2

On peut noter qu'à chaque saison, on a un lien significatif entre passer du temps au pré et être positif à *T. equi*, mis à part pour la variable qualitative d'alternance en été, où on a une simple tendance ($0,05 < p\text{-value} < 0,1$). Plus les chevaux pâturent longtemps, plus le risque d'être positif à *T. equi* augmente.

III.C.1.d. Caractéristiques des pâtures

Pour tester l'existence d'un lien entre les caractéristiques des pâtures et la positivité à *T. equi*, nous avons réalisé des tests exacts de Fisher (cf. Tableau XVII).

Tableau XVII : Lien entre les caractéristiques des pâtures et positivité à *Theileria equi*

		Positifs		Négatifs	
Paddock en sable	Oui	17	0,0075	54	
	Non	97		134	
Prairie semée	Oui	13	0,041	39	
	Non	101		149	
Prairie permanente	Oui	98	0,014	139	
	Non	16		49	
Herbe rase	Oui	53	0,23	74	
	Non	60		113	
Herbe haute	Oui	67	0,54	119	
	Non	46		68	
Enherbement homogène	Oui	57	0,80	86	
	Non	49		81	
Enherbement hétérogène	Oui	52	0,71	87	
	Non	54		80	

Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test exact de Fisher

Tableau XVII : Lien entre les caractéristiques des pâtures et positivité à *Theileria equi* (suite)

		Positifs	Négatifs
Clôture seule	Oui	47	101
	Non	68	
			<i>0,077</i>
Haies en bordure	Oui	52	74
	Non	63	121
			0,23
Forêt en bordure	Oui	42	55
	Non	73	140
			0,13
Point d'eau à proximité	Oui	51	62
	Non	63	130
			0,037
Pré inondé	Oui	15	25
	Non	99	167
			1
Pré sec	Oui	60	123
	Non	54	69
			0,054

Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test exact de Fisher

On voit que 6 variables sont significativement liées à la positivité à *T. equi* :

- les chevaux pâturent dans des paddocks en sable sont plus souvent négatifs,
- les chevaux pâturent dans des prairies semées sont plus souvent négatifs,
- les chevaux pâturent dans des prairies permanentes sont plus souvent positifs,
- les chevaux dont les pâtures sont entourées de clôtures artificielles seules ont tendance à être plus souvent négatifs,
- les chevaux pâturent dans des prés avec des points d'eau à proximité sont plus souvent positifs,
- les chevaux pâturent dans des prés secs ont tendance à être plus souvent négatifs.

On voit ici que l'on a 2 idées principales qui semblent être liées à la positivité à *T. equi* :

- l'opposition prairie avec herbe / prairie sans herbe,
- l'opposition pré humide / pré sec.

III.C.1.e. Relations avec la faune sauvage

Pour tester le lien entre les relations que peuvent avoir les chevaux qui pâturent avec la faune sauvage et la positivité à *T. equi*, nous avons réalisé un test exact de Fisher (cf. Tableau XVIII).

Tableau XVIII : Lien entre observation d'animaux sauvages dans les pâtures et positivité à *Theileria equi*

		Positifs	Négatifs
Observation d'animaux sauvages	Oui	100	170
	Non	17	34
		0,64	

La valeur au centre correspond à la p-value du test exact de Fisher

On voit qu'aucun lien statistique n'est observé entre l'observation d'animaux sauvages dans les pâtures fréquentées et la positivité du cheval à *T. equi*. D'autres tests exacts de Fisher, ainsi que des tests du Khi2 ont été réalisés pour tester l'existence d'un lien entre la fréquence d'observation de ces animaux sauvages et la positivité à *T. equi*, ainsi qu'entre les différentes espèces observées et la positivité à *T. equi*. Aucun lien statistique n'a pu être mis en évidence pour l'ensemble de ces variables.

III.C.1.f. Observation de tiques

Pour tester le lien entre l'observation de tiques sur son cheval ou dans ses prés et la positivité à *T. equi*, des tests exacts de Fisher ont été réalisés (cf. Tableau XIX).

Tableau XIX : Lien entre observation de tiques et positivité à *Theileria equi*

		Positifs	Négatifs
Observation de tiques sur son cheval	Oui	85	143
	Non	32	70
		0,32	
Observation de tiques dans ses prés	Oui	50	63
	Non	55	125
		0,024	

Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test exact de Fisher

L'observation de tiques sur son cheval n'apparaît pas comme lié à la positivité à *T. equi*. Nous avons également réalisé des tests exacts de Fisher concernant les données de saison et de taille des tiques observées sur les chevaux, ne montrant eux aussi aucun lien statistique avec la positivité à *T. equi*.

En revanche, on remarque que l'observation de tiques dans ses prés est significativement liée à une positivité supérieure à *T. equi*. Des tests exacts de Fisher ont ensuite été réalisés sur les données de saison et de taille de ces tiques, ne montrant pas d'influence d'une saison ou d'une taille de tique particulière. L'observation de tiques dans les pâtures signe un propriétaire plus attentif, mais également une infestation du milieu probablement importante, et donc un risque de rencontre entre le cheval et les tiques supérieur.

III.C.1.g. Compagnons de pâture

Pour tester l'existence d'un lien entre le fait de pâturer en groupe et la positivité à *T. equi*, nous avons, pour chaque saison, réalisé un test exact de Fisher (cf. Tableau XX).

Tableau XX : Lien entre le fait de pâturer en groupe à chaque saison et la positivité à *Theileria equi*

		Positifs	Négatifs
Printemps	Oui	96	136
	Non	17	50
Été	Oui	97	141
	Non	16	50
Automne	Oui	95	136
	Non	16	50
Hiver	Oui	92	127
	Non	15	44

Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test exact de Fisher

On voit que quelle que soit la saison, il existe un lien significatif entre le fait de pâturer en groupe et la positivité à *T. equi*, les chevaux pâturant seuls étant plus souvent négatifs.

III.C.1.h. Relations avec les animaux domestiques

Pour tester l'existence d'un lien entre la fréquentation de chiens, de chats, la présence de tiques sur ces animaux domestiques et la positivité à *T. equi*, nous avons réalisé des tests exacts de Fisher (cf. Tableau XXI).

Tableau XXI : Lien entre la fréquentation d'animaux domestiques, de leurs tiques et la positivité à *Theileria equi*

		Positifs	Négatifs
Chiens	Oui	82	140
	Non	33	64
		0,70	
Chats	Oui	46	93
	Non	69	111
		0,35	
Tiques sur les animaux domestiques	Oui	52	92
	Non	33	81
		0,23	

Les valeurs au centre des croisements correspondent à la p-value du test exact de Fisher

On voit que les animaux domestiques et leur infestation par des tiques n'influence pas la positivité à *T. equi*.

Bilan sur l'analyse univariée à l'échelle de la France

Si l'on fait un bilan de l'analyse univariée à l'échelle de la France, les variables suivantes apparaissent comme ayant un lien statistique significatif avec la positivité à *T. equi* :

- **la race** : les chevaux « ONC » sont plus souvent positifs,
- **la localisation** : les régions les plus au Sud sont plus touchées,
- **la durée de pâturage** : les chevaux pâturant plus longtemps sont plus souvent positifs, quelle que soit la saison,
- **le type de pâture** : les chevaux pâturant dans des prairies permanentes sont plus souvent positifs que ceux dans des paddocks en sable ou des prairies semées,
- **le type de bordures** : les chevaux dont les pâtures sont entourées de haies ou de forêts ont tendance à être plus souvent positifs que ceux dont les pâtures sont entourées de clôtures artificielles seules,
- **l'humidité des pâtures** : les chevaux dont les prés possèdent des points d'eau sont plus souvent positifs que ceux dont les prés sont secs,
- **l'observation de tiques dans les prés** : les chevaux dans des prés où on observe des tiques sont plus souvent positifs, sans influence particulière de la saison ou de la taille des tiques observées,
- **les compagnons de pâtures** : les chevaux pâturant avec d'autres chevaux sont plus souvent positifs.

III.C.2. Analyse univariée à l'échelle de l'école de Nantes

Une analyse statistique univariée a également été réalisée à l'échelle de l'école de Nantes uniquement. Avec 150 individus ayant participé, l'effectif de Nantes nous a paru suffisant pour réaliser une analyse statistique. Par ailleurs, cela nous a permis de tester la robustesse de notre analyse à l'échelle de la France, en regardant si les tendances restent les mêmes, ou si des différences ressortent.

La démarche a été totalement identique à celle utilisée pour l'analyse à l'échelle de la France, c'est pourquoi nous nous limiteront à présenter les résultats obtenus, synthétisés dans le tableau XXII.

Tableau XXII : Liens entre les variables influentes (p-values significatives ou tendances) et la positivité à *Theileria equi* à l'échelle de l'école de Nantes

		Positifs		Négatifs	
Âge (années)		11,8	<i>0,051</i>	9,8	
Race : Trotteur Français	Oui	1	<i>0,037</i>	14	
	Non	46		87	
Promenade	Oui	13	<i>0,019</i>	12	
	Non	32		86	
Diagnostic antérieur de piroplasmose positif	Oui	7	<i>0,060</i>	6	
	Non	36		95	
Temps de pâturage en hiver	[0h – 12h]	21	<i>0,051</i>	61	
	24h	26		37	
Observation de tiques sur le cheval en été	Oui	29	<i>0,010</i>	42	
	Non	6		31	
Observation de tiques dans les prés en automne	Oui	8	<i>0,095</i>	7	
	Non	6		18	
Observation de tiques dans les prés en hiver	Oui	6	<i>0,040</i>	3	
	Non	6		19	
Observation de tiques sur les animaux domestiques	Oui	22	<i>0,061</i>	44	
	Non	9		42	

Les valeurs de la première ligne correspondent à l'âge moyen de chaque effectif

La valeur au centre de la première ligne correspond à la p-value du test de Wilcoxon-Mann-Whitney

Les valeurs au centre des autres lignes correspondent à la p-value du test exact de Fisher

On remarque qu'il y a peu de similarité entre les 2 analyses statistiques. En effet, mis à part pour le pâturage long, mais uniquement en hiver, et pour l'observation de tiques dans les prés, mais uniquement en automne et en hiver, les autres variables influentes à Nantes ne l'étaient pas à l'échelle de la France. Les variables qui ressortent comme influentes à Nantes sur la positivité à *T. equi* sont les suivantes :

- les chevaux plus âgés ont tendance à être plus souvent positifs,
- la race « Trotteur Français » est plus souvent positive,
- les chevaux sortant en promenade sont plus souvent positifs,
- les chevaux ayant déjà eu un diagnostic de piroplasmose ont tendance à être plus souvent positifs,
- Les chevaux qui pâturent longtemps en hiver ont tendance à être plus souvent positifs,
- les chevaux sur lesquels on peut observer des tiques en automne ont tendance à être plus souvent positifs,
- les chevaux sur lesquels on peut observer des tiques en hiver sont plus souvent positifs,
- les chevaux fréquentant des animaux domestiques sur lesquels on peut observer des tiques ont tendance à être plus souvent positifs.

Ces différences marquées peuvent être le signe de différences entre les populations de chevaux côtoyant les écoles vétérinaires, mais aussi d'un certain manque de robustesse des tests statistiques sur la population de Nantes, avec des effectifs parfois faibles selon la question.

III.C.3. Etude des corrélations entre variables

III.C.3.a. Choix des variables d'intérêt

Afin de réaliser par la suite l'analyse statistique multivariée, une pré-sélection des variables d'intérêt doit être réalisée. Plusieurs critères vont intervenir dans cette pré-sélection, et il sera possible de distinguer 3 types de variables :

- **les variables significatives** à l'analyse univariée : avec $p\text{-value} < 0,05$
- **les variables ayant montré une tendance** à l'analyse univariée : avec $0,05 < p\text{-value} < 0,2$
- **Les variables forcées** : avec $p\text{-value} \geq 0,2$. Ces variables pourraient cependant avoir un impact sur la positivité à *T. equi*, selon les données bibliographiques disponibles.

Les variables retenues pour la suite de notre étude ont été listées dans le tableau XXIII.

Tableau XXIII : Choix des variables retenues pour la suite de notre étude

<p>Variables significatives (p-value < 0,05)</p>	<p>Ecole Paddock en sable / prairie semée / prairie permanente Point d'eau à proximité Compagnons de pré à chaque saison Durée de pâturage à chaque saison Observation de tiques dans les prés</p>
<p>Variables avec tendance (0,05 < p-value < 0,2)</p>	<p>Clôtures artificielles / forêt en bordure Pré sans point d'eau Promenade Diagnostic antérieur de piroplasmose</p>
<p>Variables forcées (p-value ≥ 0,2)</p>	<p><i>Age : de par la grande persistance de T. equi dans le cheval porteur, il serait envisageable que la positivité augmente avec l'âge des individus. Par ailleurs, à Nantes, l'âge apparaît comme un facteur de risque.</i></p> <p><i>Observation de tiques sur le cheval : facteur de risque le plus significatif de l'analyse à l'échelle de Nantes.</i></p>

La variable « *race* » n'a pas été retenue pour plusieurs raisons. D'une part, comme montré dans le tableau XIV, bien que la race « *ONC* » apparaisse comme significativement liée à une positivité supérieure à *T. equi*, sa distribution entre écoles n'est pas homogène, avec une sur-représentation à l'école de Lyon. De plus, la réalisation de tests exacts de Fisher et de tests du Khi2 nous montre des relations statistiques identiques pour les individus de Lyon vis-à-vis des variables, et pour les individus *ONC* vis-à-vis de ces mêmes variables. A ce stade, il nous est donc impossible de distinguer l'influence de Lyon de celle de la race « *ONC* ». Par ailleurs, il ne nous a pas paru pertinent que des contraintes biologiques, d'élevage ou d'activité particulières puissent expliquer une positivité supérieure de cette race par rapport aux autres. Enfin, le faible effectif de cette modalité (27 individus), mais également des autres modalités (la race « *SF* » étant largement sur-représentée, cf. III.A.2.), rendrait cette variable peu interprétable dans une analyse statistique multivariée.

La variable « *département* » n'a pas été retenue également. Cette variable étant très fortement corrélée à la variable « *école* », nous avons préféré garder cette dernière. En effet, les départements les plus fréquemment représentés sont ceux des 4 écoles vétérinaires, ou les départements limitrophes. Par ailleurs, la distribution des individus entre départements (avec de nombreux départements représentés par 1 ou 2 individus, cf. III.A.1.) rendrait difficile l'interprétation de cette variable dans les modèles statistiques multivariés.

III.C.3.b. Etude des corrélations entre variables

Après avoir pré-sélectionné les variables à garder, il est essentiel d'étudier les corrélations pouvant exister entre elles. Nous avons pour cela réalisé des tests de corrélation, synthétisés dans une matrice (cf. Annexe 8).

Plusieurs informations peuvent être tirées de cette étude :

- Il existe une corrélation positive forte entre les différentes saisons pour les variables « *compagnons de pâture* » et « *durée de pâturage* ». Les chevaux qui pâturent en groupe à une saison pâturent généralement en groupe aux autres saisons également. De même, les chevaux qui pâturent longtemps à une saison pâturent généralement longtemps aux autres saisons également.
- Il existe une corrélation positive, à toutes les saisons, mais plus marquée en été, entre le fait de pâture longtemps et le fait de pâture avec des compagnons.
- Il existe une corrélation positive entre le fait de pâture en groupe et le fait de pâture en prairie permanente.
- Il existe des corrélations négatives fortes évidentes entre les variables opposées (« *pré avec point d'eau* » et « *pré sans point d'eau* » ; « *prairie permanente* » et « *prairie semée* » ou « *paddock en sable* »).
- Il existe une corrélation négative entre le fait de pâture longtemps et le fait de pâture dans des paddocks en sable, dans des pâtures entourées de clôtures artificielles ou dans des pâtures sans point d'eau.
- Il existe peu de corrélations entre l'âge et les autres variables. De même, il existe peu de corrélations entre un diagnostic antérieur de piroplasmose et les autres variables, ou entre l'observation de tiques sur le cheval et les autres variables.

La variable « *école* » a également été étudiée, mais n'a pas pu être intégrée à cette « matrice de corrélation » de par sa nature de variable qualitative non ordonnée. Il existe des corrélations positives entre l'école de Lyon et le pâturage long, le pâturage en prairie permanente, et le pâturage en groupe. Il existe des corrélations positives entre l'école de Maisons-Alfort et le pâturage en paddock en sable, le pâturage court, et une corrélation négative entre l'école de Maisons-Alfort et le pâturage en groupe.

En conclusion, ce qu'il faut retenir de cette étude des corrélations est que l'on va distinguer 2 conduites d'élevage :

- Un pâturage plutôt long voire permanent, en groupe, dans des prairies naturelles, permanentes, avec des points d'eau, des forêts en bordure, et plutôt lié aux chevaux vus à l'école de Lyon,
- Un pâturage plus occasionnel, pour des durées plus courtes, dans des paddocks en sable, avec des clôtures artificielles, sans point d'eau, et plutôt lié aux chevaux vus à l'école de Maisons-Alfort.

III.C.4. Analyse multivariée

Après la réalisation de l'analyse univariée, nous avons réalisé une analyse multivariée, à partir des résultats précédemment obtenus et de l'étude des corrélations entre variables. L'intérêt de l'analyse multivariée est de confirmer et hiérarchiser l'influence des différentes variables, considérées cette fois-ci simultanément, en ajustant l'effet de chaque variable en fonction de l'effet des autres variables. Nous avons pour cela utilisé la méthode statistique de la régression logistique. Elle permet l'explication d'une variable qualitative, ici la positivité des chevaux à *T. equi*, à partir de plusieurs variables, qu'elles soient qualitatives ou quantitatives.

III.C.4.a. Création d'un modèle explicatif de la positivité des chevaux à *Theileria equi*

Un premier modèle, comprenant 11 variables, a été testé sur l'ensemble des chevaux de l'étude : école d'origine, âge, activité de promenade, diagnostic antérieur de piroplasmose, temps de pâturage au printemps, paddocks en sable, clôtures artificielles, présence de point d'eau dans les prés, observations de tiques sur le cheval, observation de tiques dans les prés, pâturage avec des compagnons (quelle que soit la saison). Pour les questions à choix multiple, comme le type de pâture, l'humidité ou le type de bordure, le choix de la modalité à intégrer au modèle s'est fait à partir du résultat de l'analyse univariée : la modalité pour laquelle la p-value était la plus faible a été intégrée au modèle. De plus, la saison « printemps » pour la variable « temps de pâturage » nous a paru la plus pertinente épidémiologiquement, en termes de présence particulièrement abondante de tiques dans l'environnement. Il est vite apparu que ce modèle était difficile à interpréter de par la présence des réponses « Sans objet » pour les individus vivant au box. Nous avons donc décidé de créer un sous-jeu de données excluant les 12 individus qui passent toute l'année au box.

Ce modèle a donc ensuite été appliqué aux 331 chevaux restants. Cependant, suite à de nouveaux obstacles à l'analyse dus à la présence de nombreux « NA », il a été décidé de retirer les chevaux pour lesquels des réponses étaient manquantes, et d'appliquer le modèle aux individus restants, soit 232 chevaux. Ce modèle a été sélectionné via 3 procédures : ascendante, descendante et mixte. Les 3 procédures aboutissent au même résultat, que nous appellerons "modèle 1", à savoir une influence statistique de l'école d'origine, du **temps de pâturage**, et du **type de pâture** (cf. Tableau XXIV). On voit que les modalités les plus influentes sont celles de l'école d'origine, où les individus de Lyon et Toulouse sont significativement plus positifs

que ceux de Maisons-Alfort. Le temps de pâturage est également très influent, dans le sens où plus les individus pâturent longtemps au printemps, plus la positivité à *T. equi* augmente. On peut également remarquer que les modalités « école de Nantes » et « paddock en sable » sont moins influents dans ce modèle, avec des p-value de 0,17 et 0,15 respectivement. Les chevaux vus à l'école de Nantes seraient légèrement plus à risque que ceux de Maisons-Alfort. Les chevaux vivant dans au moins un paddock en sable seraient légèrement moins à risque que ceux vivant uniquement dans des prairies semées ou permanentes. Par ailleurs, ce modèle explique dans sa globalité 13,2% de la variance totale.

Tableau XXIV : Résultats obtenus après application du premier modèle à notre population d'étude

	Estimate	Pr (> z)
Intercept	-2,22820	1,24.10 ⁻⁰⁵
Ecole : Lyon	1,85092	7,19.10 ⁻⁰⁵
Ecole : Nantes	0,57848	0,17356
Ecole : Toulouse	1,53318	0,00531
Durée de pâturage au printemps	0,05499	0,00509
Paddocks en sable	-0,59703	0,14545

L'intercept (modalité de référence) va correspondre ici :

- à l'école de Maisons-Alfort
- à une durée de pâturage nulle
- à la modalité « 0 » pour la question concernant la vie dans des paddocks en sable

Un « estimate » positif va correspondre à un facteur de risque, tandis qu'un « estimate » négatif va correspondre à un facteur protecteur, comparativement à l'intercept.

La colonne « Pr (> |z|) » correspond à la p-value du test de significativité

Il était ensuite nécessaire de vérifier l'adéquation du modèle. Pour cela nous avons tracé 4 graphiques mettant en évidence les différentes caractéristiques du modèle (cf. Figure 44).

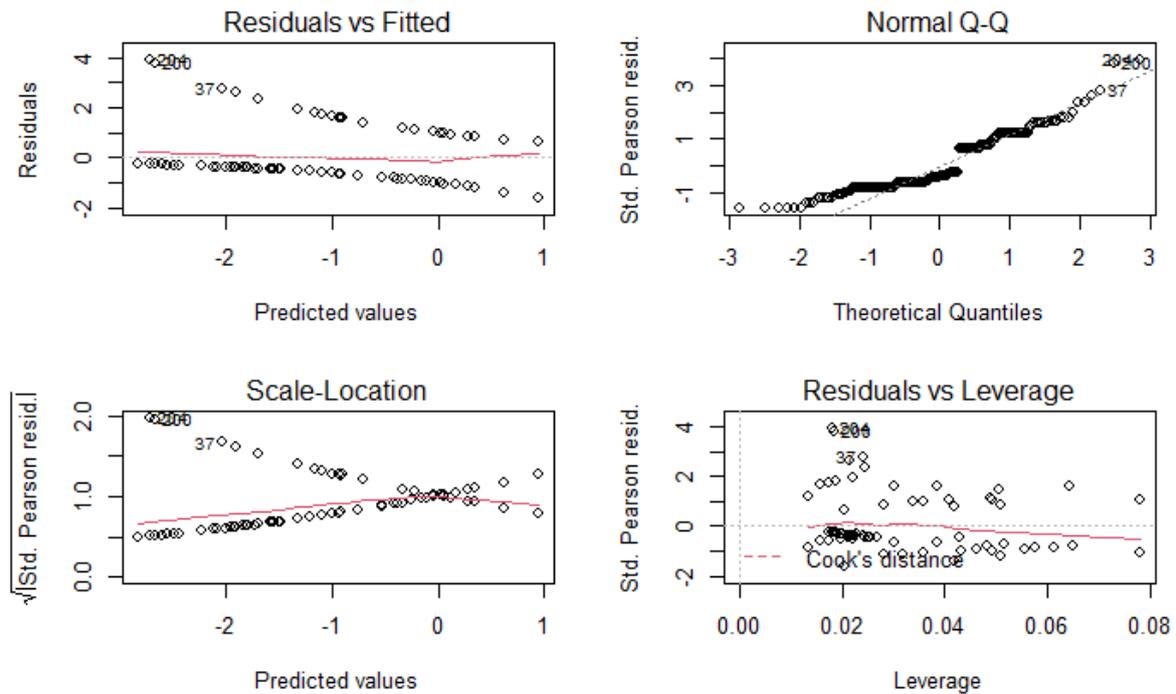


Figure 44 : Vérification graphique de l'adéquation du modèle 1

Les 2 graphiques de gauche, « Residuals vs Fitted » et « Scale-location », ont un intérêt relativement similaire, à savoir tester la distribution des résidus (part de variabilité non expliquée par le modèle). On peut voir tout d'abord que les résidus se répartissent de manière similaire le long de l'axe des abscisses (valeurs prédites), et que la ligne rouge est quasiment horizontale. Cela signifie que les résidus sont homoscedastiques. L'homoscedasticité est une propriété des modèles statistiques de régression signifiant que les résidus ont une variance similaire quelle que soit la valeur prédite. En d'autres termes, toutes les prévisions faites sur notre variable à expliquer (la positivité à *T. equi*) à partir de nos individus (de leur profil de réponse au questionnaire) ont le même degré de précision, ce qui est une très bonne chose.

Le graphique « Normal Q-Q » montre quant à lui la pertinence de l'ajustement de la distribution de notre population à notre modèle théorique. On voit que nos points suivent de manière très proche la droite de régression du modèle théorique (diagonale en pointillés). Cela signifie que la distribution de notre population d'étude est très proche de celle du modèle théorique.

Le dernier graphique, « Residuals vs Leverage », a pour principal but d'aider à identifier les individus atypiques, plus influents que les autres. Il utilise la distance de Cook, traduisant l'influence d'un individu sur la qualité du modèle. Plus la distance de Cook d'un individu est importante, plus celui-ci est influent. Il est ainsi possible de voir quels sont les individus ayant le plus grand impact sur notre modèle, et les examiner de manière plus approfondie. On voit ici que les individus 37, 200 et 204 apparaissent comme atypiques, et plus influents que les autres dans ce modèle. Une étude plus approfondie de ces 3 individus montre qu'ils sont tous positifs à *T. equi*, et présentent un profil de réponses « à l'inverse » des facteurs de risques précédemment déterminés :

- chevaux provenant de Maisons-Alfort pour 2 d'entre eux, et de Nantes pour le 3^e

- chevaux pâturant peu (2h, 3h et 4h par jour respectivement)
- chevaux vivant tous les 3 dans des paddocks en sable

Pour autant, bien qu'étant des individus atypiques, et donc influents, ce ne sont pas des individus aberrants, ne justifiant donc pas leur exclusion de ce modèle.

En complément de cette vérification d'adéquation du modèle, il est possible d'en tester la qualité en estimant le taux d'individus mal classés (faux positifs ou faux négatifs) lorsque leur statut (positif ou négatif à *T. equi*) est prédit par le modèle. On commence par calculer la probabilité prédite de positivité pour chaque individu de l'échantillon, puis on la compare à un seuil que l'on définit. Ici, le seuil choisi est de 0,5, c'est-à-dire que les individus pour lesquels la probabilité prédite est inférieure à 0,5 seront considérés par le modèle comme négatifs, et les autres seront considérés comme positifs. On compare ensuite ces résultats aux résultats réels, et on dresse le tableau de contingence (cf. Tableau XXV).

Tableau XXV : Estimation des individus mal classés par le modèle testé

	Positifs prédits	Négatifs prédits
Positifs réels	42	49
Négatifs réels	20	121

On voit que, avec ce modèle, le taux d'individus mal classés est de 29,7% (69/232). On voit également grâce à ce tableau que notre modèle manque de sensibilité, avec un taux d'individus faux-négatifs important, de 53,8% (49/(42+49)). La spécificité du modèle est quant à elle meilleure, avec un taux d'individus faux-positifs de 14,2% (20/(20+121)).

III.C.4.b. Essais d'autres modèles

Nous avons ensuite testé d'autres modèles, avec la même démarche. Nous avons pour cela remplacé le printemps par d'autres saisons de pâture, renseigné le type de bordures ou l'humidité des pâtures. Cependant, parmi tous les modèles testés, celui expliquant la plus grande variance totale et avec la meilleure sensibilité est le premier, décrit ci-dessus. Les autres modèles expliquant au mieux 12,3% de la variance totale et avec un taux de faux-négatifs au minimum de 56%, il a été décidé de garder le premier modèle comme modèle final.

III.C.4.c. Conclusion sur l'analyse multivariée

Parmi tous les modèles testés, et au vu des tests d'adéquation réalisés, le modèle final choisi est celui décrit en III.C.4.a. Il fait ressortir, parmi l'ensemble de nos variables, 3 principaux facteurs de risque de positivité d'un cheval à *T. equi* :

- l'école d'origine, assimilable au lieu de vie du cheval en France (gradient de risque croissant Nord-Sud)
- le type de pâture dans laquelle vit le cheval (les prairies herbées augmentent le risque)
- le temps de pâturage quotidien (augmentation du risque avec l'augmentation du temps de pâturage)

III.D. Approche descriptive de la positivité à *Babesia caballi*

Le faible nombre d'individus positifs à *B. caballi* ne permettant pas la réalisation de tests statistiques, nous nous limiterons à une description des 10 individus concernés, et leur profil de réponse au questionnaire (cf. Annexe 9).

III.D.1. Description des chevaux positifs à *Babesia caballi*

Les chevaux concernés ont été vus à l'école de Lyon pour 7 d'entre eux, et de Maisons-Alfort pour les 3 autres. Il s'agit de 7 chevaux mâles, dont 4 hongres et 3 étalons, ainsi que 3 femelles, avec un âge variable, allant de 10 mois à 19 ans. La race et la robe de ces chevaux sont également très variables, sans prédominance particulière. Ce sont en majorité des chevaux de club, avec une activité de loisir pour 6 d'entre eux et de compétition pour 4 d'entre eux.

III.D.2. Antécédents de piroplasmose

Seul un cheval sur les 10 a des antécédents de positivité à la piroplasmose. Il s'agit d'un diagnostic de babésiose, posé par sérologie en 2019, et traité au Carbésia. Par ailleurs, trois participants n'ont pas répondu à la question.

III.D.3. Description des environnements de vie

Ce sont principalement des chevaux qui pâturent 100% du temps. En effet, 7 des chevaux positifs à *B. caballi* passent tout leur temps en pâture. Un des chevaux est au pré pendant la journée au printemps et en été, et quelques heures de moins en automne et en hiver. Enfin, un cheval passe le printemps, l'automne et l'hiver au box, et vit entièrement en extérieur l'été. Par ailleurs, un participant n'a répondu à cette question que pour l'été.

Concernant le type de prairies occupées par ces chevaux, tous pâturent dans des prairies permanentes, et 2 pâturent parfois dans des paddocks en sable. Ils vivent pour 8 d'entre deux dans des prairies à herbes hautes, et 6 chevaux vivent dans des prairies entourées de haies ou de forêts. Seul un cheval vit dans des prairies entourées de clôtures artificielles. Six des 7 participants ayant répondu à la question disent que leur cheval vit dans des prés hétérogènes, un cheval vit dans un pré plutôt homogène, et un autre vit dans des prés hétérogènes et des prés homogènes. Parmi les 7 participants ayant répondu à la question, 5 affirment que leur cheval vit dans des pâtures avec des points d'eau à proximité, un cheval vit dans des prés inondés une partie de l'année, et un autre vit dans des prés secs, sans point d'eau.

Tous les participants qui ont répondu à la question voient régulièrement des animaux sauvages ou leurs traces dans les prés occupés par leur cheval. Des cerfs, des sangliers, des renards ou les lapins sont très fréquemment vus, tandis que seuls 3 individus voient également des canards ou des échassiers, et qu'aucun ne voit de ragondins ou de faisans.

III.D.4. Description des relations entretenues avec les tiques

Neuf propriétaires sur 10 voient ont déjà vu des tiques sur leur cheval, et 6 de ces propriétaires en voient à toutes les saisons. Deux propriétaires n'en voient qu'au printemps et en été, et le dernier n'en voit quant à lui qu'en hiver. Tous les propriétaires concernés disent voir des tiques de 2-3 mm. Tous les propriétaires concernés, à l'exception de 2, disent voir également des tiques de plus de 3 mm. Enfin, tous les propriétaires concernés, à l'exception de 3, disent voir également des tiques de 1-2 mm.

Parmi les 9 propriétaires ayant répondu à la question, seuls 4 disent voir des tiques dans les prés fréquentés par leur cheval. Trois de ces propriétaires en voient toute l'année, tandis que le dernier n'en voit qu'au printemps et en été. Ce sont principalement les tiques de grande taille qui sont observées, les 4 propriétaires concernés observant tous des tiques de 2-3 mm et de plus de 3 mm. Enfin, 2 propriétaires sur 4 voient également des petites tiques, de 1-2 mm.

III.D.5. Description des compagnons de pâture

Parmi les 7 participants qui ont répondu à la question, 5 possèdent un cheval qui pâture toute l'année avec d'autres chevaux. Un participant possède un cheval qui pâture toute l'année seul, et pour un autre participant, le cheval pâture également avec des bovins au printemps et en été. Enfin, le propriétaire du cheval qui ne pâture qu'en été a répondu que celui-ci pâture avec d'autres chevaux.

III.D.6. Description des relations avec les animaux de compagnie

Pour 4 participants, leur cheval côtoie régulièrement un chien, et seul 1 participant a un cheval qui côtoie un chat. Enfin, 3 participants disent avoir déjà vu des tiques sur leurs animaux de compagnie.

III.E. Approche statistique des résultats d'analyse hématobiochimiques

III.E.1. Cadre de l'analyse

Une analyse statistique a été réalisée sur les résultats des analyses hématologique et biochimique réalisées sur certains chevaux de notre étude. Les chevaux arrivant à la clinique équine de Nantes pour chirurgie ont systématiquement un bilan sanguin préopératoire, comportant l'évaluation d'un certain nombre de paramètres hématologiques et biochimiques. Dans un souci d'homogénéité des techniques de dosage, et afin d'obtenir des valeurs les plus comparables possible, seuls les chevaux vus à l'école de Nantes, et pour lesquels l'analyse a été réalisée à l'école de Nantes sont pris en compte dans cette étude. Comme pour l'étude principale, seule la positivité à *T. equi* a été testée statistiquement avec ces paramètres. L'idée est ici d'apprécier une éventuelle influence du portage asymptomatique de *T. equi* sur les paramètres hématologiques et biochimiques.

III.E.2. Présentation de la population d'étude et des variables analysées

III.E.2.a. Population d'étude

En fonction des paramètres mesurés, notre population d'étude varie de 38 à 78 individus, avec une majorité de paramètres mesurés sur une population de 68 individus. Tous ces individus, majoritairement venus à l'école de Nantes pour subir une chirurgie, font bien sûr partie de l'étude principale : leurs propriétaires ont donc également rempli un questionnaire et le cheval a fait l'objet d'une recherche PCR de *T. equi* et *B. caballi*.

III.E.2.b. Paramètres hématologiques mesurés

Les paramètres hématologiques mesurés ont été les suivants : taux de globules rouges, taux d'hémoglobine, hématocrite, VGM, TCMH, CCMH, taux de globules blancs, taux de granulocytes neutrophiles, taux de granulocytes éosinophiles, taux de granulocytes basophiles, taux de lymphocytes, taux de monocytes et taux de plaquettes.

III.E.2.c. Paramètres biochimiques mesurés

Les paramètres biochimiques mesurés ont été les suivants : taux de créatinine, taux d'urée, taux de PAL, taux de GGT, taux de bilirubine totale, taux de CK, taux d'ASAT, taux de protéines totales, taux d'albumine, taux de fibrinogène. Certains paramètres tels que le taux de glucose, le ionogramme ou le taux de lactates ont été mesurés chez quelques chevaux, mais trop peu pour faire l'objet d'une analyse statistique.

III.E.3. Présentation des résultats

III.E.3.a. Résultats de l'analyse hématologique

Seuls 2 paramètres ont montré une différence significative entre la population de chevaux positifs et la population de chevaux négatifs à *T. equi* : le taux de globules blancs et le taux d'hémoglobine (cf. Tableau XXVI).

Dans notre population d'étude, les chevaux positifs à *T. equi* ont un taux de globules blancs et d'hémoglobine significativement plus élevés que les chevaux négatifs.

Tableau XXVI : Paramètres hématologiques ayant montré un lien statistique avec la positivité à *Theileria equi*

	Positifs		Négatifs
Taux de globules blancs (10 ³ / µL)	11,14	0,039	9,59
Taux d'hémoglobine (g / L)	130,1	0,044	119,2

Les valeurs correspondent aux moyennes du taux de globules blancs et d'hémoglobine de chaque effectif
Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test de Wilcoxon-Mann-Whitney

III.E.3.b. Résultats de l'analyse biochimique

Six paramètres biochimiques ont montré un résultat statistique intéressant quant à leur lien avec la positivité à *T. equi* : le taux de protéines totales, le taux de CK, le taux de GGT, le taux de fibrinogène, le taux de PAL et le taux d'urée (cf. Tableau XXVII).

On peut noter à partir de notre population d'étude que les chevaux positifs à *T. equi* avaient statistiquement des taux de protéines totales, de CK et de fibrinogène plus élevés, et avaient tendance à avoir des taux de PAL et d'urée plus élevés et un taux de GGT plus bas que les chevaux négatifs.

Tableau XXVII : Paramètres biochimiques ayant montré un lien statistique (significatif ou tendance) avec la positivité à *Theileria equi*

	Positifs		Négatifs
Taux de protéines totales (g / L)	72,56	0,00073	66,29
Taux de CK (U / L)	515,7	0,032	319,8
Taux de GGT (U / L)	15	0,073	30,14
Taux de fibrinogène (g / L)	3,2	0,0018	2,4
Taux de PAL (U / L)	547,9	0,08	442,2
Taux d'urée (g / L)	0,38	0,06	0,32

Les valeurs correspondent aux moyennes des taux de chaque effectif
Les valeurs au centre correspondent à la p-value du test de Wilcoxon-Mann-Whitney

IV. Discussion

IV.A. Recrutement des participants à l'étude

A Nantes, le recrutement des participants se faisait directement à la clinique équine, au moment de la consultation. Le fonctionnement universitaire de l'école vétérinaire fait que ce sont directement les étudiants qui recevaient les consultations, et qui étaient donc en première ligne pour proposer aux propriétaires de participer à notre étude. Ainsi, en fonction de la discipline et du motif de consultation, il était plus ou moins simple de prendre le temps de proposer la participation à cette étude.

La majorité des chevaux participants à notre étude à Nantes sont ceux venus pour « entrée de chirurgie ». Plusieurs choses peuvent expliquer cela. D'une part, c'est un motif fréquent pour lequel les chevaux viennent à la clinique équine de l'école vétérinaire. En effet, de par son statut de clinique de référé, les chirurgies sont nombreuses. Enfin, les propriétaires amenant des chevaux pour chirurgie doivent le plus souvent remplir quelques documents : commémoratifs de l'animal, informations nécessaires à la chirurgie (statut vaccinal, assurances, exclusion de la filière bouchère, etc.), et il est également fréquent de réaliser une prise de sang préopératoire. Il était donc assez simple de proposer lors de la consultation un document en plus (le questionnaire à remplir), ainsi qu'un tube de sang en plus (pour la PCR).

Les autres motifs de consultation (médecine, orthopédie, visite extérieure, urgence, suivi chirurgical, dentisterie, etc.) étaient plus rarement à l'origine de participation à l'étude.

Par ailleurs, nous n'avons pas d'informations quant aux motifs exacts de consultations dans les autres écoles vétérinaires, ni sur le processus de sélection des participants.

Par conséquent, il existe un certain biais dans la sélection de notre population d'étude. En effet, à Nantes, la majorité des chevaux participants sont des animaux plutôt jeunes, en lien avec les motifs les plus récurrents de chirurgie, en particulier castration et arthroscopie.

IV.B. Construction du questionnaire

Le questionnaire a très peu évolué au cours de l'étude. Seule une question a été rajoutée : le lieu de vie du cheval. En effet, sur les premiers questionnaires de 2019, seule l'adresse du propriétaire était demandée. Nous nous sommes vite rendu compte que le lieu de vie du cheval pouvant être très différent de celui du propriétaire, il était nécessaire de rajouter cette information au questionnaire.

Concernant le type de pâture et le temps passé dans celles-ci, il aurait été possible d'affiner notre analyse de risque avec des informations plus précises. Lorsqu'un cheval fréquente plusieurs pâtures, ce qui est fréquent en élevage, en haras, ou même en centre équestre, nous n'avons pas d'information quant à la période ou à la durée passée à chaque endroit. Certains chevaux en zones marécageuses vont par exemple passer l'été dans des prairies permanentes herbées, mais passeront l'hiver dans des paddocks sans herbe car les prairies seront inondées. Une manière d'affiner notre analyse de risque serait la réalisation et l'étude d'un planning de pâturage précis au cours de l'année.

De la même manière, il serait possible d'affiner les informations concernant l'observation de tiques sur le cheval, ou dans les prés, avec une étude qualitative (détermination des espèces par un laboratoire) et quantitative (appréciation par le propriétaire). Afin d'éviter de considérer de la même manière un participant voyant une tique de manière sporadique sur son cheval ou dans ses prés, et un participant en région très infestée voyant très régulièrement de nombreuses tiques, une estimation *a minima* quantitative aurait pu être intéressante.

IV.C. Résultats des analyses PCR

Suite à notre étude, nous avons obtenu des valeurs de positivité de 37,9% à au moins l'un des deux parasites, avec 35,9% des chevaux positifs à *T. equi*, 2,9% des chevaux positifs à *B. caballi*, et 0,9% des chevaux positifs aux deux parasites (cf. III.B.1.).

Si nous comparons ces résultats aux différentes études épidémiologiques disponibles (cf. Tableau IV), nous pouvons noter une augmentation du pourcentage de positivité à *T. equi*. Cette hausse est cohérente avec les données bibliographiques rapportées dans ces précédentes études [45] [57] [107] [165] (cf. Tableau XXVIII). Plusieurs facteurs pourraient expliquer ce taux de positivité supérieur. Notre étude utilise une méthode de PCR afin de détecter les chevaux porteurs de piroplasmes, tandis que les précédentes études réalisées à cette échelle utilisent très majoritairement des techniques sérologiques (fixation du complément, immunofluorescence ou

ELISA). La PCR ayant montré une sensibilité très supérieure aux techniques sérologiques, la détection de chevaux porteurs sains, avec une parasitémie relativement faible, est possible. Toutefois, il est possible de noter que ces autres études épidémiologiques se sont faites, au moins partiellement, sur une population de chevaux suspects d'être infectés, car présentant des signes cliniques. Enfin, ces études ont montré que l'augmentation de prévalence au fil du temps d'accompagnait d'une remontée des parasites vers le Nord de la France, et donc d'une augmentation de la positivité dans les régions les plus au Nord.

La positivité à *B. caballi*, quant à elle, est inférieure dans notre étude à celle mesurée dans les études précédentes. Comme expliqué ci-dessus, l'une des principales différences entre notre étude et les précédentes est la population ciblée. En effet, notre étude ne s'intéresse qu'à des chevaux cliniquement sains de piroplasmose, tandis que les études précédentes d'effectuaient, au moins en partie, sur une population de chevaux suspects de piroplasmose, car en phase clinique. Nous avons vu par ailleurs dans notre première partie bibliographique que *B. caballi* est un parasite bien moins résistant que *T. equi*, puisqu'il est effectivement possible de débarrasser l'organisme de celui-ci. Ceci pourrait expliquer que notre population d'étude soit assez peu positive à *B. caballi*, ce parasite étant plus rarement à l'origine de portage asymptomatique que *T. equi*. De plus, dans son étude de 2007, Le Metayer note que l'augmentation de prévalence de *T. equi* est contrebalancée par une diminution de prévalence de *B. caballi*, ce qui est également cohérent avec nos résultats.

Tableau XXVIII : Evolution de la positivité à *Theileria equi* et *Babesia caballi* à l'échelle de la France

Etude	Taux de positivité à <i>Theileria equi</i>	Taux de positivité à <i>Babesia caballi</i>
Soulé (1998) [165]	12,2 %	9 %
Le Metayer (2007) [107]	13,78 %	9,24 %
RESPE (2014) [45]	27,01 %	23 %
Durand-Delacre (2017) [57]	30,9 %	17,1 %
Etude actuelle (2021)	35,9 %	2,9 %

IV.D. Réponses au questionnaire

La première chose que nous pouvons noter vis-à-vis des réponses au questionnaire est le taux de « non réponse » à au moins une question. Sur les 343 participants, seuls 127 ont répondu à toutes les questions posées, soit 37% des participants. En fonction de la question posée, il y a entre 2 et 77 participants ne répondant pas, avec en moyenne 29 réponses manquantes par question. Les raisons pouvant expliquer ces non réponses peuvent être diverses : questionnaire trop long, manque d'intérêt pour le projet, redondance des questions pour les propriétaires participant avec plusieurs de leurs chevaux, etc.

Il était demandé aux participants si leur cheval avait des antécédents de piroplasmose. Un cheval ayant été testé positif à *T. equi* par le passé devrait être plus souvent positif aujourd'hui, du fait du portage long voire permanent du parasite et de la grande difficulté à l'éliminer de l'organisme. Cependant, notre analyse statique ne met pas en avant la positivité antérieure à *T. equi* comme un facteur de risque significatif de positivité aujourd'hui. Il faut tout de même noter que très peu de participants semblent concernés par cette question, puisque seulement 7 individus ont été déclarés positifs à *T. equi* par le passé, rendant notre test statistique trop peu puissant pour être interprété.

Un diagnostic antérieur positif de piroplasmose apparaît quant à lui comme une tendance à augmenter le risque de positivité à *T. equi* (p-value = 0,11), sans présumer du parasite incriminé, de la technique diagnostique utilisée ou du traitement mis en place. Il faut par ailleurs noter que, parmi ces 30 individus concernés, 17 ne savent pas quel parasite a été incriminé dans cet ancien épisode de piroplasmose. En pratique, il est fréquent, en particulier dans les régions fortement touchées, comme dans le Sud de la France, de mettre en place un traitement piroplasmicide lors d'une suspicion de piroplasmose. Par conséquent, il est difficile de dire, parmi ces 17 individus qui ne savent pas quel parasite a infecté leur animal, s'il s'agit d'un réel manque ou oubli de cette information, ou s'il ne s'agissait que d'une suspicion qui n'a jamais été confirmée par un diagnostic (sérologique, PCR, frotti), voire qui aurait été infirmée sans que le propriétaire en soit prévenu. Au final, cette information quant à un éventuel diagnostic antérieur de piroplasmose est sans doute peu fiable, et ne concerne que trop peu d'individus pour être exploitée entièrement.

Pour les questions avec d'éventuelles réponses multiples (types de pâtures occupées, saison de visualisation des tiques sur le cheval ou dans le pré, animaux sauvages observés), il était demandé dans le questionnaire de les classer par ordre de fréquence :

Exemple : « Attention : si plusieurs réponses sont possibles car votre cheval fréquente différents prés, alors classez les types de pré par ordre de fréquentation décroissant (1 le plus fréquenté, 2 ou 3 le moins fréquenté) »

Cette donnée a été particulièrement compliquée à gérer, pour plusieurs raisons. Premièrement, une majorité des participants concernés n'ont pas pris en compte cette information, n'y ont pas répondu, et ont simplement coché les différentes réponses appropriées. De plus, cette information s'est révélée, au final, trop peu précise. En effet, dans le cas où toutes les réponses étaient cochées et classées, deux cas de figures étaient envisageables :

- Le pré « 1 » est le plus fréquenté par le cheval. Le pré « 2 » est un peu moins souvent fréquenté que le pré « 1 ». Le pré « 3 » est un peu moins fréquenté que le pré « 2 »,
- Le pré « 1 » est le plus fréquenté par le cheval. Le pré « 2 » est moins fréquenté que le pré « 1 ». Le pré « 3 » n'est pas du tout fréquenté, donc classé « 3 », bien que le cheval n'y aille pas du tout.

Cela posait donc un problème d'interprétation, dans le sens où l'on considèrerait de la même manière un cheval qui fréquente un certain type de pâture (même peu de temps) et un cheval qui ne fréquente pas du tout ce même type de pâture. Il a donc été décidé de ne pas prendre cette information en compte.

Certaines informations se sont également révélées difficiles à interpréter, car trop peu fiables. C'est le cas pour les questions concernant les différentes tailles de tiques observées sur le cheval ou dans le pré. Dans les régions très infestées, où les propriétaires voient et retirent régulièrement des tiques sur leurs animaux, cette question était assez facilement répondue. Cependant, pour les participants ne voyant que très rarement des tiques, cette question était plus compliquée, faisant parfois appel à des souvenirs éloignés. Très peu de participants ont coché la modalité « ne sait pas », bien que de nombreux participants nous aient dit être peu sûrs de leur réponse à ces questions.

Comme nous l'avons vu dans notre première partie bibliographique, il est généralement recommandé de retirer les tiques observées sur ses animaux, l'argument principal étant que le risque de transmission de maladies est réduit si les tiques sont retirées dans les 24-48h après leur fixation (cf. *Première Partie. VII.B.1.d.*). Si l'on considère qu'à partir du moment où le propriétaire voit la tique, il la retire, il semblerait que l'extraction manuelle des tiques observées soit une méthode insuffisante pour réduire significativement le risque d'être positif à *T. equi*.

Enfin, des réponses particulièrement compliquées à gérer ont été celles des questions ouvertes, avec les modalités « autre » (utilisation du cheval, lieux de potentiels déplacements à risque, animaux sauvages observés, animaux domestiques, etc.). Pour les animaux sauvages observés, les animaux domestiques côtoyés, ou les compagnons de près du cheval participant, il a été possible de trouver des réponses fréquentes permettant la création des variables « ragondins » et « faisans » par exemple, ou alors la faible diversité des réponses a rendu possible une analyse descriptive de celles-ci. Cependant, pour les lieux de déplacement à risque, ou les utilisations du cheval, la très grande diversité des réponses a rendu impossible l'exploitation de la question. En effet, pour les lieux de déplacement à risque, les réponses étaient variables au point de retrouver des villes, des départements, des régions, ou même des pays. C'est cette grande différence de précision entre toutes les réponses données qui a rendu la variable inexploitable pour notre étude.

IV.E. Démarche statistique

IV.E.1. Analyse univariée

Trois méthodes statistiques ont été utilisées dans notre étude. Premièrement, l'utilisation de tests univariés (test du χ^2 , test exact de Fisher bilatéral, test de Wilcoxon-Mann-Whitney) nous a permis une pré-sélection des variables intéressantes. Ces tests ont l'avantage d'être simples à utiliser et à interpréter, et permettent de faire ressortir les tendances statistiques fortes entre notre variable à expliquer et nos différentes variables explicatives. Cependant, ils ne présument pas des potentielles corrélations entre les différentes variables explicatives testées, qui peuvent induire la nécessité soit du renoncement à l'exploitation de certaines variables dans

les cas extrêmes, soit d'un ajustement aux effets conjoints des différentes variables que l'on souhaite conserver dans les autres cas.

IV.E.2. Etude des corrélations entre variables

C'est pourquoi nous avons utilisé des tests de corrélations, que l'on a pu faire apparaître visuellement sur une matrice de corrélations (cf. Annexe 8). L'utilisation de la matrice de corrélations a pour principal avantage l'aspect visuel des tests, la couleur nous indiquant le sens de la corrélation, et la taille du cercle, l'intensité de la couleur et le coefficient de corrélation nous indiquant la force de la corrélation. On distingue ainsi simplement, et rapidement, les variables corrélées. Il faut cependant garder à l'esprit que l'interprétation de ces tests et de cette matrice de corrélation est arbitraire, dans le sens où nous n'avons pas défini de seuil au-delà duquel nous considérons deux variables « trop corrélées » pour être utilisées simultanément. C'est à nous, à partir de cette matrice, de données bibliographiques et de notre bon sens, de décider si deux variables nous semblent trop corrélées ou non. C'est ainsi que nous avons choisi les variables à intégrer à notre modèle multivarié, et c'est pour cette raison que plusieurs modèles doivent être testés et comparés.

IV.E.3. Analyse multivariée

La comparaison de modèles va correspondre à l'analyse multivariée. C'est elle qui, à la fin, aura le plus de poids dans notre interprétation. L'analyse multivariée offre pour avantage majeur la possibilité d'ajuster les effets des variables du fait des corrélations pouvant exister entre elles. Nous avons pour cela utilisé la méthode de la régression logistique, qui est une méthode statistique donnant pour résultat une relation mathématique jugeant de manière quantitative l'impact de nos variables sur l'explication du modèle. C'est là l'intérêt principal de cette méthode : dire quelles variables sont influentes, dans quel sens et avec quelle force. Elle est plus compliquée à utiliser que les tests univariés, et nécessite au début de tester les modèles « pas à pas » en ajoutant une variable, en retirant une autre, ... Cette méthode offre également la possibilité de « forcer » des variables, bien qu'elles ne soient pas apparues comme significatives à l'analyse univariée. Il faut donc penser à comparer les résultats de l'analyse univariée aux données bibliographiques disponibles avec un regard critique, et ne pas hésiter à tester des modèles en forçant certaines variables, comme nous l'avons fait avec l'âge des chevaux par exemple : en effet, la logique voudrait que les chevaux âgés soient plus volontiers porteurs de *T. equi* du fait de sa longue persistance dans l'organisme ; même si cette variable ne ressort pas comme influente lors de l'analyse univariée, nous avons jugé important d'ajuster les effets des autres variables à l'âge des chevaux. C'est pourquoi nous avons gardé l'âge dans notre jeu de données initial, bien qu'au final, celui-ci ne soit pas considéré comme significatif par notre méthode de régression logistique.

Lors de notre analyse multivariée, nous avons dû tester nos modèles sur une sous-population des chevaux de l'étude, à savoir les chevaux pâturant au moins une saison dans l'année. En effet, parmi nos variables pré-sélectionnées pour tester nos modèles, la modalité de réponse « sans objet » posait un réel problème d'interprétation (type de pâtures, compagnons de pâture, etc.). C'est pourquoi nous avons dû écarter de l'analyse les 12 individus passant toute l'année au box, et qui n'étaient donc pas concernés par les questions sur les pâtures. Nous avons donc une certaine perte d'information suite à l'écartement volontaire d'une fraction de notre population d'étude.

Par ailleurs, il s'est révélé que les méthodes ascendante et descendante de sélection de modèle ne peuvent pas gérer les non réponses (« NA »). C'est pourquoi nous avons également dû écarter de l'analyse par régression logistique les individus ayant au moins une non réponse dans leur questionnaire. Cela représente 99 individus, soit presque 30% de notre population, et donc une énorme perte d'information.

Enfin, nous avons fait le choix de rester simple dans notre méthode d'estimation d'individus « mal classés » pour tester la qualité de notre modèle. Nous avons choisi un seuil de probabilité arbitrairement à 0,5, en considérant que les individus pour lesquels la probabilité prédite de positivité à *T. equi* est inférieure à 0,5 sont négatifs, et les autres positifs. Il aurait été possible, afin d'affiner notre prédiction d'utiliser la méthode de la courbe ROC (receiver operating characteristic) : cette méthode calcule les valeurs de sensibilité et de spécificité pour tous les seuils possibles, et permet ainsi de déterminer le seuil qui donne le meilleur couple sensibilité/spécificité, ce qui, pour notre modèle, nous donnerait le taux d'individus « mal classés » le plus faible possible.

IV.F. Facteurs de risque mis en évidence

IV.F.1. Pour *Theileria equi*

Trois principaux facteurs de risque ont été mis en évidence pour *T. equi* dans notre étude : la localisation géographique, la durée de pâturage et le type de pâtures utilisées.

Les chevaux ayant été vus dans les écoles vétérinaires les plus au Sud de la France (Lyon et Toulouse) sont significativement plus positifs à *T. equi* que les autres. Cette information est cohérente avec les données bibliographiques disponibles, à savoir que les départements les plus au Sud sont plus touchés par la piroplasmose que ceux plus au Nord [45][57][107][165]. Ce facteur de risque est apparu comme celui avec le plus fort impact, parmi ceux mis en évidence. Un découpage plus minutieux, par département, a également été réalisé (variable « *dpt* »), cependant, notre population d'étude n'étant pas assez bien répartie sur l'ensemble de la France, l'utilisation de cette variable dans nos modèles n'a pas été possible. En effet, les chevaux de notre étude étant ceux vus au sein des écoles vétérinaires, quelques départements étaient largement sur-représentés, comparativement aux autres, à savoir les départements dans lesquels

se trouvent les écoles vétérinaires, ou limitrophes à ceux-ci. La grande majorité des autres départements n'étaient représentés que par 1 ou 2 individus, rendant une exploitation statistique impossible. Nous nous sommes donc limités pour l'instant à l'information de l'école vétérinaire où l'animal a été vu, à l'origine d'une large perte d'information. A l'avenir, lorsque le projet PiroGOTick disposera de plus de chevaux et d'une meilleure couverture du territoire, une analyse statistique spatiale de la positivité à *T. equi* deviendra possible.

L'information « durée de pâturage » a été subdivisée en plusieurs variables. Une variable qualitative indiquait si le cheval pâturait tout le temps (24h/24), ne pâturait pas du tout (0h/24) ou pâturait une partie de la journée (1-23h/24), tandis qu'une variable quantitative, plus précise, indiquait la durée de pâturage en heures passées au pré chaque jour. Le choix de cette subdivision s'est fait suite aux nombreux manques de réponses à cette question. En effet, de nombreux participants cochaient la case « alternance box/pré » sans préciser le nombre d'heures passées en extérieur chaque jour. Dans notre analyse multivariée, c'est la variable quantitative qui permettait d'obtenir le meilleur modèle : c'est pourquoi nous l'avons gardée. Par ailleurs, cette information de « durée de pâturage » était également subdivisée par saison : printemps, été, automne et hiver. Notre analyse des corrélations a montré une forte corrélation entre ces 4 variables. Cela est logique et peut s'interpréter comme le fait que les chevaux passant tout leur temps en extérieur le font généralement à chaque saison, tandis que les chevaux pâturant peu pâturent peu toute l'année. Il nous a donc été impossible de rechercher statistiquement des différences entre la durée de pâturage à chaque saison. Nous avons donc choisi, pour notre modèle, la durée de pâturage au printemps, car c'est celle qui nous a semblé la plus justifiable biologiquement, quand on considère le cycle vie des tiques vectrices de piroplasmose : même si chaque espèce de tique a sa propre dynamique saisonnière, l'un dans l'autre, le printemps est la saison où l'on attend les plus fortes densités de tiques. Le modèle sélectionné donne pour résultat que quand la durée de pâturage augmente, le risque d'être positif à *T. equi* augmente également, ce qui peut être relié à l'augmentation de temps de contact potentiel entre tiques et cheval.

Enfin, le type de pâture était également une information subdivisée en plusieurs variables. La principale difficulté dans l'exploitation de cette variable a été le nombre important de réponses multiples (chevaux fréquentant plusieurs types de pâtures). C'est pourquoi nous avons créé une variable qualitative pour chacune des 3 possibilités de réponses. L'analyse univariée ayant fait ressortir une influence des modalités « paddock en sable » et « prairie permanente », ce sont elles que nous avons gardé pour la suite de notre étude. L'étude de la matrice des corrélations ayant montré une corrélation négative marquée entre ces deux modalités, et l'analyse univariée ayant montré une influence significativement plus importante pour le « paddock en sable », c'est cette modalité que nous avons choisie pour notre premier modèle. Nous avons tout de même testé la modalité « prairie permanente » dans d'autres modèles, mais le résultat obtenu étant moins bon, nous avons préféré garder la première. L'analyse multivariée donne pour résultat que les chevaux vivant, au moins en partie, dans des paddocks en sable sont plus souvent négatifs à *T. equi* que ceux ne vivant que dans des prairies semées ou permanentes. Il nous a fallu garder une certaine prudence dans l'interprétation de ce résultat. En effet, les nombreuses réponses multiples montrent que beaucoup de chevaux vivent dans plusieurs types de prés. N'ayant pas de calendrier de pâturage précis, il nous est impossible de dire combien de temps, à quel moment de l'année ou dans quelles conditions un cheval se trouve dans une pâture ou dans une autre. C'est pourquoi notre modèle oppose les chevaux passant au moins une partie de l'année dans un paddock en sable aux chevaux ne fréquentant pas ce type de pâture, mais

allant au moins une partie de l'année dans des prairies permanentes ou des prairies semées. Une analyse plus fine du mode de pâturage chez un grand nombre d'éleveurs « sentinelles », avec parallèlement un suivi temporel du statut des chevaux vis-à-vis de *T. equi*, devrait permettre à l'avenir d'en savoir plus sur les risques liés aux types de pâtures.

IV.F.2. Pour *Babesia caballi*

Pour *B. caballi*, la principale limite se trouve dans le manque d'individus concernés. Avec seulement 10 chevaux positifs à ce parasite, il nous était impossible de réaliser une analyse statistique. Nous nous sommes donc limités à une analyse purement descriptive, présentée dans la partie III.D. A terme, lorsque le nombre de cas deviendra conséquent, des facteurs de risque spécifiques à *B. caballi* pourront peut-être être détectés.

IV.G. Analyses hémato-biochimiques

L'analyse statistique des résultats des analyses hémato-biochimiques d'une partie des chevaux ayant participé à Nantes a montré des différences significatives entre chevaux porteurs et non porteurs de *T. equi* pour quelques paramètres. Les résultats obtenus sont parfois surprenants (taux d'hémoglobine supérieur chez les chevaux positifs à *T. equi*), ou sans véritable logique biologique (taux de GGT inférieur chez les chevaux positifs à *T. equi*). Nous leur accordons une confiance limitée, pour différentes raisons énumérées ci-dessous.

Premièrement, plusieurs des paramètres testés ont des causes multifactorielles de variation. Le taux de globules blancs, par exemple, peut augmenter suite à un processus infectieux, un transport ou même un stress.

De plus, notre population d'étude pour cette analyse est relativement petite, avec une soixantaine d'individus en moyenne pour chaque paramètre. En tenant compte du fait que certains paramètres peuvent varier de manière très importante (les CK, par exemple, peuvent varier d'un facteur 100, voire 1000 lors d'affection musculaire), il existe dans cette analyse à la fois un certain manque de puissance statistique (certains paramètres présentent peut-être des différences entre les deux groupes de chevaux sans que nous soyons en mesure de les détecter) et un risque de première espèce conséquent (en concluant abusivement à l'influence de certains paramètres).

En attendant mieux à terme, lorsque la population de chevaux testés sera plus conséquente, il nous est déjà possible de comparer les résultats trouvés aux intervalles de références des différents paramètres. Pour le taux d'urée par exemple, le test de Wilcoxon-Mann-Whitney nous dit que les chevaux positifs à *T. equi* ont tendance à avoir un taux d'urée supérieur aux

chevaux négatifs (0,38 g/L face à 0,32 g/L, p-value = 0,06). Nous restons cependant dans l'intervalle acceptable physiologiquement de [0,2 – 0,6 g/L]. Il est donc difficile d'interpréter biologiquement un tel résultat, quand bien même la différence entre les deux groupes se confirmait à l'avenir.

De manière générale, l'étude des paramètres hémato-biochimique n'étant pas au cœur de notre projet, il existe de nombreux biais dans notre jeu de données :

- Motifs de consultation hétérogènes : chevaux sains pour chirurgie, chevaux malades en consultation de médecine (affections respiratoires, cardiaques, etc.), chevaux vu en consultation d'orthopédie (inflammations articulaires, tendineuses, etc.)
- Moment du prélèvement influençant certains paramètres : juste après le transport, au cours de la consultation, après quelques jours d'hospitalisation
- Potentiels traitements en cours interagissant avec les paramètres : anti-inflammatoires, antibiotiques, etc.

C'est pourquoi nous nous garderons d'interpréter ces résultats en l'état. Une réelle étude dédiée avec un protocole précis quant aux animaux prélevés, au moment du prélèvement, aux paramètres testés et aux techniques utilisées sera nécessaire dans le but d'explorer le lien entre positivité à la piroplasmose et paramètres hémato-biochimiques du cheval porteur sain.

CONCLUSION

Dans une population de chevaux ne présentant pas de signes de piroplasmose, deux objectifs motivaient notre étude : la détermination d'une prévalence à *Theileria equi* et *Babesia caballi*, et la détermination de facteurs de risques liés à l'environnement de vie du cheval, via un questionnaire d'enquête rempli par le propriétaire. Nous avons pu, par un diagnostic PCR, déterminer une prévalence globale de 37,9% à l'un ou l'autre des deux parasites de la piroplasmose, avec un portage très majoritaire de *Theileria equi* (35,9%). Cette prévalence, cohérente avec les données bibliographiques disponibles, montre un portage sain non négligeable de piroplasmes en France.

Notre analyse du questionnaire d'enquête nous a permis de mettre en évidence trois principaux facteurs de risque :

- **La localisation géographique du cheval** : les chevaux vivant dans le Sud sont plus souvent porteurs que ceux vivant dans le Nord,
- **La durée quotidienne de pâturage** : les chevaux pâturant le plus sont plus souvent porteurs,
- **Le type de prés fréquentés** : les chevaux en prairies sont plus souvent porteurs que ceux en paddocks artificiels en sable.

Ces facteurs sont en accord avec la bibliographie, et montrent une augmentation du risque d'infection quand le temps de contact potentiel entre les tiques et l'animal augmente.

Par ailleurs, certaines données, que l'on aurait pu attendre comme facteur de risque, ne ressortent pas de notre analyse statistique comme significatifs (humidité des pâtures, visualisation fréquente de tiques, etc.). Il serait intéressant de réaliser une étude environnementale plus précise afin de se s'affranchir des biais de réponse au questionnaire, du taux de non réponse parfois important ou encore de la difficulté d'interprétation de certaines réponses multiples. Par ailleurs, l'étude d'un calendrier de pâturage précis, avec le type de pâtures fréquentées, le temps passé sur chacune d'entre elles, la saison de fréquentation et les caractéristiques environnementales des pâtures au moment de leur fréquentation (humidité, hauteur d'herbe, relations avec la faune sauvage, etc.) pourrait également apporter de précieuses informations qui nous ont manquées dans notre étude.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Adam M., Pikalo J., Snyder A., Steinrigl A., Köller G., Fritz Schusser G. (2017). Equine Piroplasmosis – a case of severe *Babesia caballi* infection associated with acute renal failure. *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 130, 113–118.
- [2] Adams L. G. (1981). Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. *Research in Veterinary Science*, 31, 54–61.
- [3] Adamska M., Skotarczak B. (2017). Molecular detecting of piroplasms in feeding and questing *Ixodes ricinus* ticks. *Annals of Parasitology*, 63, 21–26.
- [4] Aeschlimann A. (1991). Ticks and disease: susceptible hosts, reservoir hosts and vectors. *Parasite-Host Association*, 8, 148–156.
- [5] AFSSA. (2009). Communiqué de presse. *Avis de la comission d'AMM du 27 Octobre 2009*.
- [6] Agoulon A., Butet A., Hoch T., Perez G., Plantard O., Verheyden H., Vourc'h G. (2015). 3. Dynamique des populations de tiques et liaison avec les facteurs environnementaux. In : McCoy K., Boulanger N. (2015). *Tiques et maladies à tiques. Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*. Marseille, IRD Editions, 85-112.
- [7] Ahmadi Afshar N., Malekifard F., Asri-Rezaei S., Tavassoli M. (2020). Hematological and biochemical changes in naturally occurring equine piroplasmosis in donkeys (*Equus asinus*) of Northwest of Iran. *Acta Parasitologica*, 65, 811-816.
- [8] Ahmadpour S., Esmailnejad B., Dalir-Naghadeh B., Asri-Rezaei S. (2020). Alterations of cardiac and renal biomarkers in horses naturally infected with *Theileria equi*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 71, 101502.
- [9] Alhabbab R. Y. (2018). Chapter 10 - Complement Fixation Test (CFT). In: Alhabbab R. Y. (2018). *Basic serological testing*. Springer, 63-75.
- [10] Alhabbab R. Y. (2018) Chapter 16 - Immunofluorescence (IF) Assay. In: Alhabbab, R. Y. (2018). *Basic Serological Testing*. Springer, 125-132.
- [11] Alhassan A., Govind Y., Tam N. T., Thekisoe O. M. M., Yokoyama N., Inoue N., Igarashi I. (2007). Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *in vitro* culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitology Research*, 100, 1165–1168.
- [12] Alhassan A., Pumidonming W., Okamura M., Hirata H., Battsetseg B., Fujisaki K., Yokoyama N., Igarashi I. (2005). Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Veterinary Parasitology*, 129, 43–49.
- [13] Alhassan A., Thekisoe O. M. M., Yokoyama N., Inoue N., Motloang M. Y., Mbatia P. A., Yin H., Katayama Y., Anzai T., Sugimoto C., Igarashi I. (2007). Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 143, 155–160.
- [14] Allsopp M. T. E. P., Lewis B. D., Penzhorn B. L. (2007). Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Veterinary Parasitology*, 148, 130–136.
- [15] Ambawat H. K., Malhotra D. V., Kumar S., Dhar S. (1999). Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. *Veterinary Parasitology*, 85, 319–324.
- [16] Anderson J. F., Magnarelli L. A. (2008). Biology of ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22, 195-215.
- [17] ANMV ANSES. Résumé des caractéristiques du produit : Carbésia [en ligne]. <http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=CARBESIA/>. Consulté le 20/11/2020.

- [18] ANMV ANSES. Résumé des caractéristiques du produit : Sébacil 50% solution [en ligne]. <http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=SEBACIL+50+%25+SOLUTION/>. Consulté le 23/11/2020.
- [19] Asgarali Z., Coombs D. K., Mohammed F., Campbell M. D., Caesar E. (2007). A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in thoroughbreds in Trinidad. *Veterinary Parasitology*, 144, 167–171.
- [20] Autier S. (2010). *La piroplasmose du cheval. Possibilité d'une recrudescence des infections transmises à l'homme et à l'animal et liées à la pullulation des tiques*. Thèse de doctorat en pharmacie. Limoge : Université de Limoge. 129p.
- [21] Avarzed A., De Waal D. T., Igarashi I., Saito A., Oyamada T., Toyoda Y., Suzuki N. (1997). Prevalence of equine piroplasmosis in Central Mongolia. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 64, 141–145.
- [22] Banerjee D. P., Singh B., Gautam O. P., Sarup S. H. A. (1977). Cell-mediated immune response in equine babesiosis. *Tropical Animal Health and Production*, 9, 153–158.
- [23] Barrera R., Carapeto M. V., Habela M. A., Zaragoza C. (2010). Electrophoretic pattern of serum proteins in horses with babesiosis. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42, 173–178.
- [24] Bashiruddin J. B., Cammà C., Rebêlo E. (1999). Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, 84, 75–83.
- [25] Bayer. Companion Vector-Borne Diseases. Tick taxonomy, distribution and epidemiology. [en ligne]. <https://cvbd.bayer.com/vectors/ticks/general/>. Consulté le 24/08/2020.
- [26] Belloli C., Crescenzo G., Lai O., Carofiglio V., Marang O., Ormas P. (2002). Pharmacokinetics of imidocarb dipropionate in horses after intramuscular administration. *Equine Veterinary Journal*, 34, 625–629.
- [27] Belozherov V. N., Fourie L. J., Kok D. J. (2002). Photoperiodic control of developmental diapause in nymphs of prostrate ixodid ticks (*Acari: Ixodidae*). *Experimental and Applied Acarology*, 28, 163–168.
- [28] Bhoora R., Quan M., Franssen L., Butler C. M., Van der Kolk J. H., Guthrie A. J., Zweygarth E., Jongejan F., Collins N. E. (2010). Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. *Veterinary Parasitology*, 168, 201–211.
- [29] Bonnet S., Huber K., Joncourt G., Martelet M., Stachurski F., Zenner L. (2015). 2. Biologie des tiques. In: McCoy K., Boulanger N. (2015). *Tiques et maladies à tiques. Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*. Marseille, IRD Editions, 53-84.
- [30] Böse R., Jorgensen W. K., Dalgliesh R. J., Friedhof, K. T., De Vos A. J. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 57, 61–74.
- [31] Bouattour A. (2009). Les changements climatiques et leur impact sur les systèmes vectoriels. In: *Bulletin de la société vétérinaire pratique de France*, 93, Avril/Mai/Juin 2009, 3-10.
- [32] Boulanger N., Stachurski F. (2015). 9. Contrôle des populations de tiques et prévention : aspects vétérinaires et humains. In: McCoy K., Boulanger N. (2015). *Tiques et maladies à tiques. Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*. Marseille, IRD Editions, 259-278.
- [33] Brüning A. (1996). Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. *British Veterinary Journal*, 152, 139–151.
- [34] Butler C. (2013). Can *Theileria equi* be eliminated from carrier horses? *Veterinary Journal*, 196, 279.
- [35] Camacho A. T., Guitian F. J., Pallas E., Gestal J. J., Olmeda A. S., Habela M. A., Telford S. R., Spielman A. (2005). *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. *Tropical Animal Health and Production*, 37, 293–302.

- [36] Camino E., De la Cruz M. L., Dominguez L., Carvajal K. A., Fores P., de Juan L., Cruz-Lopez F. (2018). Epidemiological situation of the exposure to agents causing equine piroplasmosis in spanish purebred horses in Spain: seroprevalence and associated risk factors. *Journal of Equine Veterinary Science*, 67, 81–86.
- [37] Cavalier-Smith T., De Waal D. T., Allsopp B. A. (1994). Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology*, 108, 147–152.
- [38] Chaudhry M., Rashid H., Khan M., Pervez K. (2014). Comparative efficacy of various drugs used against naturally infected horses with babesiosis. *Science International*, 26, 267–271.
- [39] Chevrier L., Soulé C., Dorchies P. (1979). Les piroplasmoses équine inapparentes. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 1, 37.
- [40] Cingi C. C., Utuk A. E., Karafakioglu Y. S., Balkaya I., Piskin F. C., Fidan A. F. (2012). Serum lipid and protein oxidation and antioxidant status in horses naturally infected with *Theileria equi*. *Revue de Medecine Veterinaire*, 163, 183–186.
- [41] Coultous R. M., Phipps P., Dalley C., Lewis J., Hammond T. A., Shiels B. R., Weir W., Sutton D. G. M. (2019). Equine piroplasmosis status in the UK: An assessment of laboratory diagnostic submissions and techniques. *Veterinary Record*, 184, 95.
- [42] Crampton A., McKay I., Barker S. C. (1996). Phylogeny of ticks (*Ixodida*) inferred from nuclear ribosomal DNA. *International Journal for Parasitology*, 26, 511–517.
- [43] Cumenge I. (2010). *Vademecum de thérapeutique en dermatologie chez les équidés*. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon 1 : Université Claude-Bernard. 172p.
- [44] Cunha C. W., McGuire T. C., Kappmeyer L. S., Hines S. A., Lopez A. M., Dellagostin O. A., Knowles D. P. (2006). Development of specific immunoglobulin G_a (IgG_a) and IgG_b antibodies correlates with control of parasitemia in *Babesia equi* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13, 297–300.
- [45] Daix C., Pitel P. H., Legrand L. (2014). Le syndrome « Piro-Like » en France : Étude des prévalences et de la répartition géographique à partir des données de laboratoire. *40e Journée de La Recherche Équine*.
- [46] Dantas-torres F., Figueredo L. A., Otranto D. (2011). Seasonal variation in the effect of climate on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* in southern Europe. *Parasitology*, 138, 527–536.
- [47] Dantas-Torres F., Latrofa M. S., Annoscia G., Giannelli A., Parisi A., Otranto D. (2013). Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* from the New and Old Worlds. *Parasites and Vectors*, 6, 1-17.
- [48] De Oliveira P. R., Bechara G. H., Denardi S. E., Saito K. C., Nunes E. T., Szabó M. P. J., Mathias M. I. C. (2005). Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (*Acari: Ixodidae*) ticks from Brazil and Argentina. *Veterinary Parasitology*, 129, 139–147.
- [49] De Waal D. T. (1992). Equine piroplasmosis : a review. *British Veterinary Journal*, 148, 6–14.
- [50] De Waal D. T., Van Heerden J. (2011). Chapter 26 : Equine Piroplasmosis. In: Coetzer J. A.W., Tustin R. C. (2011) *Infectious diseases of Livestock*, Oxford, 425–434.
- [51] De Waal D. T., Van Heerden J., Potgieter F. T. (1987). An investigation into the clinical, pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54, 561–568.
- [52] Dede S., Değer Y., Değer S., Tanritanir P. (2008). Plasma levels of zinc, copper, copper/zinc ratio, and activity of carbonic anhydrase in equine piroplasmosis. *Biological Trace Element Research*, 125, 41–45.

- [53] Delattre S. (2014). *Etude bibliographique et retrospective sur des chevaux testés positifs à la piroplasmose à la clinéquine*. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon 1 : Université Claude-Bernard. 140p.
- [54] Diana A., Guglielmini C., Candini D., Pietra M., Cipone M. (2007). Cardiac arrhythmias associated with piroplasmosis in the horse: A case report. *The Veterinary Journal*, 174, 193–195.
- [55] Donnelly J., Phipps L. P., Farm S. M. (1982). Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *Babesia caballi* in foals of seropositive mares. *Equine Veterinary Journal*, 14, 126–128.
- [56] Doyle R. L., Fritzen A., Bottari N. B., Alves M. S., da Silva A. D., Morsch V. M., Schetinger M. R. C., Martins J. R., Santos J. S., Machado G., Da Silva A. S. (2016). Imidocarb dipropionate in the treatment of *Anaplasma marginale* in cattle: Effects on enzymes of the antioxidant, cholinergic, and adenosinergic systems. *Microbial Pathogenesis*, 97, 226–230.
- [57] Durant-Delacré J. (2017). *Le sous-réseau “Piro-Like” du RESPE : mise en place, suivi des déclarations et exploitation statistique des données de Novembre 2013 à Juillet 2017*. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Université Paul Sabatier. 107p.
- [58] Estrada-Peña A., Bouattour A., Camicas J., Walker L. (2004). Ticks of domestic animals in the mediterranean region: a guide to identification of species. *University of Zaragoza, Spain*, 131.
- [59] Estrada-Peña A., Dehesa V., Sanchez C. (1990). The seasonal dynamics of *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus bursa* and *Dermacentor marginatus* (Acari, Ixodidae) on sheep of Pais Vasco (Spain). *Acarologia*, 31, 17–24.
- [60] Estrada-Peña A., Martínez Avilés M., Muñoz Reoyo M. (2011). A population model to describe the distribution and seasonal dynamics of the tick *Hyalomma marginatum* in the mediterranean basin. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58, 213–223.
- [61] European Center for Disease Prevention and Control. Tick maps [en ligne]. <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps/>. Consulté le 19/10/2020.
- [62] François J.-B. (2008). *Les tiques chez les bovins en France*. Thèse de doctorat en pharmacie. Nancy 1 : Université Henri Poincaré. 130p.
- [63] Friedhoff K. T., Soulé, C. (1996). An account on equine babesioses. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 15, 1191–1201.
- [64] Georges K. C., Ezeokoli C. D., Sparagano O., Pargass I., Campbell M., Abadie R. D., Yabsley M. J. (2011). A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Veterinary Parasitology*, 175, 363–366.
- [65] Gilot B., Laforge M., Pichot J., Raoult D. (1990). Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* complex ecology and mediterranean spotted fever epidemiology in France. *European Journal of Epidemiology*, 6, 357–362.
- [66] Gilot B., Perez-Eid C. (1998). Bio-écologie des tiques induisant les pathologies les plus importantes en France. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 28, 325–334.
- [67] Gilot B., Pichot J., Doche B. (1989). Les tiques du Massif Central (France). 1. Les Ixodides (Acariens, *Ixodoidea*) parasites des carnivores et d'ongulés domestiques sur la bordure orientale du massif. *Acarologia*, 30, 191–207.
- [68] Gilot B., Robin Y., Pautou G. (1974). Écologie et rôle pathogène de *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (*Ixodoidea*) dans le Sud-Est de la France. *Acarologia*, 16, 383–415.
- [69] Grause J. F., Ueti M. W., Nelson J. T., Knowles D. P., Kappmeyer L. S., Bunn T. O. (2013). Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses. *Veterinary Journal*, 196, 541–546.

- [70] Gray J. S., Dautel H., Kahl O., Lindgren E. (2009). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009.
- [71] Grech-angelini S., Stachurski F., Lancelot R., Boissier J., Allienne J., Marco S., Maestrini O., Uilenberg G. (2016). Ticks (*Acari: Ixodidae*) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica. *Parasites and Vectors*, 9, 1-11.
- [72] Guglielmone A. A., Robbins R. G., Apanaskevich D. A., Petney T. N., Estrada-Peña A., Horak I. G., Shao R., Barker S. C. (2010). The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (*Acari: Ixodida*) of the world: A list of valid species names. *Zootaxa*, 28, 1–28.
- [73] Guillot J. (2002). *Etude de la prévalence et des facteurs de risques de la babésiose sur la population des chevaux en Camargue*. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Université Paul Sabatier. 93p.
- [74] Guimaraes A. M., Lima J. D., Ribeiro M. F. B., Sciavicco C. J. S., Botelho A. C. C. (1997). Clinical and pathological aspects of splenectomized foals infected by *Babesia equi*. *Journal of Equine Veterinary Science*, 17, 211–216.
- [75] Hailat N. Q., Lafi S. Q., Al-Darraj A. M., Al-Ani F. K. (1997). Equine babesiosis associated with strenuous exercise: Clinical and pathological studies in Jordan. *Veterinary Parasitology*, 69, 1–8.
- [76] Hanafusa Y., Cho K. O., Kanemaru T., Wada R., Sugimoto C., Onuma M. (1998). Pathogenesis of *Babesia caballi* infection in experimental horses. *Journal of Veterinary Medical Science*, 60, 1127–1132.
- [77] Hines S. A., Ramsay J. D., Kappmeyer L. S., Lau A. O. T., Ojo K. K., Van Voorhis W. C., Knowles D. P., Mealey, R. H. (2015). *Theileria equi* isolates vary in susceptibility to imidocarb dipropionate but demonstrate uniform in vitro susceptibility to a bumped kinase inhibitor. *Parasites and Vectors*, 8, 1–11.
- [78] Holbrook A. A., Frerichs W. M., Allen P. C. (1973). Laboratory diagnosis of equine piroplasmosis. 3rd international conference, Paris. In: *Equine Infectious Diseases*, 467–475.
- [79] Holman P. J., Frerichs W. M., Chieves L., Wagner G. G. (1993). Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 698–701.
- [80] Holman P. J., Hietala S. K., Kayashima L. R., Olson D., Waghela S. D., Wagner G. G. (1997). Case report: Field-acquired subclinical *Babesia equi* infection confirmed by *in vitro* culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 474–476.
- [81] Hornok S. (2017). *Dermacentor marginatus* (Sulze, 1776) (Figs. 111-113). In: *Ticks of Europe and North Africa*, Springer, Cham, 281–285.
- [82] Hosseini-Chegeni A. (2019). *Dermacentor* (*Acari: Ixodidae*) species that we deal with in Iran: Polymorphic *D. marginatus* or more distinct species? *Persian Journal of Acarology*, 8, 271–275.
- [83] INRAE. CiTIQUE [en ligne]. <https://www.citique.fr/des-memos-fiches-sur-les-differents-genre-de-tique/>. Consulté le 19/10/2020.
- [84] Ikadai H., Nagai A., Xuan X., Igarashi I., Kamio T., Tsuji N. (2002). Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* infections in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64, 325–328.
- [85] Ikadai H., Rocio C., Xuan X., Igarashi I. (2000). Detection of *Babesia caballi* infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant 48-kDa merozoite rhoptry protein. *International Journal for Parasitology*, 30, 633–635.
- [86] Ikadai H., Sasaki M., Ishida H., Matsuu A. Y. A., Igarashi I., Fujisaki K., Oyamada T. (2007). Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76, 694–697.

- [87] Iori A., Gabrielli S., Calderini P., Moretti A., Pietrobelli M., Tampieri M. P., Galuppi R., Cancrini G. (2010). Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. *Veterinary Parasitology*, 170, 291–296.
- [88] Jaenson T. G. T., Talleklint L., Lundqvist L., Olsen B., Chirico J. A. N., Mejlom H. (1994). Geographical distribution, host associations, and vector roles of ticks (*Acari: Ixodidae*, *Argasidae*) in Sweden. *Journal of Medical Entomology*, 31, 240–256.
- [89] Kappmeyer L. S., Perryman L. E., Hines S. A., Baszler T. V., Katz J. B., Hennager S. G., Knowles D. P. (1999). Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2285–2290.
- [90] Kappmeyer L. S., Perryman L. E., Knowles D. P. (1993). A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62, 121–124.
- [91] Katayama T., Hayashi Y., Nagahira K., Konishi K., Yamaichi K., Oikawa S. (2003). Imidocarb, a potent anti-protozoan drug, up-regulates interleukin-10 production by murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309, 414–418.
- [92] Kawai S., Igarashi I., Abgaandorjiin A., Miyazawa K., Ikadai H., Nagasawa H., Fujisaki K., Mikami T., Suzuki N., Matsuda H. (1999). Ultrastructural characteristics of *Babesia caballi* in equine erythrocytes in vitro. *Parasitology Research*, 85, 794–799.
- [93] Kim C., Beatriz L., Blanco C., Alhassan A., Iseki H., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi, I. (2008). Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Veterinary Parasitology*, 151, 158–163.
- [94] Knowles D. P., Kappmeyer L. S., Perryman L. E. (1994). Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. *Infection and Immunity*, 62, 1909–1913.
- [95] Knowles D. P., Kappmeyer L. S., Stiller D., Hennager S. G., Perryman L. E. (1992). Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 3122–3126.
- [96] Knowles D. P., Perryman L. E., Goff W. L., Miller C. D., Harrington R. D., Gorham J. R. (1991). A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein epitope of *Babesia equi* merozoites. *Infection and Immunity*, 59, 2412–2417.
- [97] Knowles R. C. (1988). Equine babesiosis: Epidemiology, control and chemotherapy. *Journal of Equine Veterinary Science*, 8, 61–64.
- [98] Koch R. (1903). The cattle disease in Southern Rhodesia. *Transvaal Agricultural Journal*, 1, 112–117.
- [99] Koenhemi L., Alkan F. A., Morgantj G., Barutcu B. U., Or E. M. (2019). Evaluation of trace elements in equine piroplasmiasis. *Medycyna Weterynaryjna*, 75, 510–512.
- [100] Kumar S., Malhotra D. V., Dhar S., Nichani A. K. (2002). Vaccination of donkeys against *Babesia equi* using killed merozoite immunogen. *Veterinary Parasitology*, 106, 19–33.
- [101] Kumar S., Gupta A. K., Pal Y., Dwivedi S. K. (2003). In-vivo therapeutic efficacy trial with artemisinin derivative, buparvaquone and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65, 1171–1177.
- [102] Kurtenbach K., Hanincová K., Tsao J. I., Margos G., Fish D., Ogden N. H. (2006). Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 660–669.
- [103] Kurtti T. J., Munderloh U. (1983). The interaction of *Babesia caballi* kinetes with tick cells. *Journal of Invertebrate Pathology*, 42, 334–343.

- [104] Kuttler K. L., Aliu Y. O. (1984). Chemotherapy of babesiosis. In: *Malaria and Babesiosis*, Springer, 151–172.
- [105] Lamontellerie M. (1965). Les tiques du Sud-Ouest de la France. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 40, 87–100.
- [106] Laveran A. (1901). Contribution à l'étude de *Piroplasma equi*. *Compte-rendu de séances de la société de biologie et de ses filiales*, 12, 385-388.
- [107] Le Metayer G. (2007). *Séroprévalence des piroplamoses équine en France entre 1997 et 2005*. Thèse de doctorat vétérinaire. Maison-Alfort : Université de médecine de Créteil. 129p.
- [108] Leblond A., Chastagner A., Pradier S., Bailly X. (2012). La prévalence de l'anaplasmose dans le sud de la France. *Bulletin Épidémiologique, Santé Animale et Alimentation*, 49, 30–31.
- [109] Lei R., Wang X., Zhang D., Liu Y., Chen Q., Jiang N. (2020). Rapid isothermal duplex real-time recombinase polymerase amplification (RPA) assay for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Scientific Reports*, 10, 1–11.
- [110] Levin M., Gray, J., Dantas-torres F., Estrada-Peña A. (2013). Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4, 171–180.
- [111] Lewis B. D., Penzhorn B. L., Volkmann D. H. (1999). Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmosis? *Journal of the South-African Veterinary Association*, 70, 90–91.
- [112] Lobato I. M., O'Sullivan C. K. (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 98, 19–35.
- [113] Macaigne F., Perez-Eid C. (1993). *Hyalomma scupense*, Schulze, 1919 (*Acarina, Ixodoidea*) tique autochtone du Sud-Ouest de la France. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 68, 199–200.
- [114] Mahmoud M. S., Abu El-Ezz N. T., Abdel-Shafy S., Nassar S. A., El Namaky A. H., Khalil W. K. B., Knwoles D., Kappmeyer L., Silva M. G., Suarez, C. E. (2016). Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. *Parasites and Vectors*, 9, 1–10.
- [115] Martinod S., Gilot B. (1991). Epidemiology of canine babesiosis in relation to the activity of *Dermacentor reticulatus* in southern Jura (France). *Experimental & Applied Acarology*, 11, 215–222.
- [116] McHardy N. (1983). The prophylactic activity of imidocarb against tick-transmitted parasitic infections. *Veterinary Pharmacology and Toxicology*, 1, 247–254.
- [117] Mealey R. H., Kappmeyer L. S., Ueti M. W., Wagner B., Knowles D. P. (2012). Protective effects of passively transferred merozoite-specific antibodies against *Theileria equi* in horses with Severe Combined Immunodeficiency. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19, 100–104.
- [118] Mehlhorn H., Schein E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitology Research*, 84, 467–475.
- [119] Mehlhorn H., Walldorf V. (1988) Life cycles. In: *Parasitology*, Springer, Verlag, 1-147.
- [120] Metcalf E. S. (2001). The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Animal Reproduction Science*, 68, 229–237.
- [121] Moltmann U. G., Mehlhorn H., Schein E., Rehbein G., Voigt W. P., Zwegarth E. (1983). Fine structure of *Babesia equi* Laveran, 1901 within lymphocytes and erythrocytes of horses: An *in vivo* and *in vitro* study. *The Journal of Parasitology*, 69, 111.

- [122] Mostafavi E., Esmailnejad B., Meysam Abtahi Foroushani S. (2020). Evaluation of cytokines and sialic acids contents in horses naturally infected with *Theileria equi*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 70, 101453.
- [123] Motloang M. Y., Thekisoe O. M. M., Alhassan A., Bakheit M., Motheo M. P., Masangane F. E. S., Thibedi M. L., Inoue N., Igarashi I., Sugimoto C., Mbatia P. A. (2008). Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horses belonging to resource-poor farmers in the north-eastern Free State Province, South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 175, 141–146.
- [124] Nagai A., Yokoyama N., Matsuo T., Bork S., Hirata H., Xuan X., Zhu Y., Claveria F. G., Fujisaki K., Igarashi, I. (2003). Growth-inhibitory effects of artesunate, pyrimethamine, and pamaquine against *Babesia equi* and *Babesia caballi* in *in vitro* cultures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 800–803.
- [125] Nava S., Guglielmo A. A., Mangold A. J. (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience*, 14, 2857–2877.
- [126] Nicolaiewsky T. B., Richter M. F., Lunge V. R., Cunha C. W., Delagostin O., Ikuta N., Fonseca A. S., Da Sival S. S., Ozaki L. S. (2001). Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 101, 9–21.
- [127] Nizoli L. Q., Conceição F. R., Silva S. S., Dummer L. A., Santos Jr A. G., Leite F. P. (2009). Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18, 1–4.
- [128] Nuttal G., Strickland C. (1912). On the occurrence of two species of parasites in equine “Piroplasmosis” or “Biliary fever.” *Parasitology*, 5, 65.
- [129] Nzelu C. O., Kato H., Peters N. C. (2019). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of Leishmania infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13, 1–21.
- [130] OIE. (2018). Equine piroplasmosis. In *Terrestrial Manual, Chapter 3.5.8*, 1310–1319.
- [131] OIE. Wahis interface [en ligne].
https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist/. Consulté le 28/10/2020.
- [132] Oladosu L. A. (1988). Effects of intravenous corticosteroid on the pathogenicity of *Babesia equi* infection of donkeys *Equus asinus*. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 35, 509–514.
- [133] Onyiche T. G. E., Sukanuma K., Igarashi I., Yokoyama N., Xuan X., Thekisoe O. (2019). A review on equine piroplasmosis: epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 1736.
- [134] Perez-Eid C., Gilot B. (1998). Les tiques : cycles, habitats, hôtes, rôle pathogène, lutte. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 28, 335–343.
- [135] Pfeifer Barbosa I. B., Molnár L. É., Tavares Dias H. L. (2000). Determination of the serological prevalence of equine babesiosis by IFA test in the state of Pará, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 9, 7–10.
- [136] Phipps L., Otter A. (2004). Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 154, 406–408.
- [137] Pitel P. H., Pronost S., Scriver T., Léon A., Richard E., Fortier G. (2010). Molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in the bone marrow of asymptomatic horses. *Veterinary Parasitology*, 170, 182–184.
- [138] Pollet T. (2020). Le microbiome des tiques de l'identification à l'outil de lutte anti-vectorielle. Journée d'animation scientifique du Vectopole Sud. INRAE, UMR ASTRE.

- [139] Posnett E. S., Ambrosio R. E. (1991). DNA probes for the detection of *Babesia caballi*. *Parasitology*, 102, 357–365.
- [140] Posnett E. S., Fehrsen J., De Waal D. T., Ambrosio R. E. (1991). Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe. *Veterinary Parasitology*, 39, 19–32.
- [141] Punyua, D. (1984). Development periods of *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann (Acarina: Ixodidae) under field conditions. *International Journal of Tropical Insect Science*, 5, 247–250.
- [142] Purnell R. E., Lewis D., Young E. R. (1980). Investigations on the prophylactic effect of treatment with on *Babesia divergens* infections in splenectomized calves. *British Veterinary Journal*, 136, 452–456.
- [143] Radakovic M., Davitkov D., Borozan S., Stojanovic S., Stevanovic J., Krstic V., Stanimirovic Z. (2016). Oxidative stress and DNA damage in horses naturally infected with *Theileria equi*. *Veterinary Journal*, 217, 112–118.
- [144] Rageau J., Mouchet, J. (1970). Les tiques de la Camargue et leur rôle éventuel dans l'épidémiologie des arbovirus. *Folia Parasitologica*, 17, 349–353.
- [145] Rampersad J., Cesar E., Campbell M. D., Samlal M., Ammons D. (2003). A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Veterinary Parasitology*, 114, 81–87.
- [146] Ramsay J. D., Ueti M. W., Johnson W. C., Scoles G. A., Knowles D. P., Mealey R. H. (2013). Lymphocytes and macrophages are infected by *Theileria equi*, but T cells and B cells are not required to establish infection in vivo. *PLoS ONE*, 8.
- [147] RESPE. Piroplasmose [en ligne]. <https://respe.net/maladie-equine/piro-like/piroplasmose/>. Consulté le 28/10/2020.
- [148] RESPE. Piro-like [en ligne]. <https://respe.net/maladie-equine/piro-like/>. Consulté le 30/10/2020
- [149] Ribeiro I. B., Câmara A. C. L., Bittencourt M. V., Marçola T. G., Paludo G. R., Soto-Blanco B. (2013). Detection of *Theileria equi* in spleen and blood of asymptomatic piroplasm carrier horses. *Acta Parasitologica*, 58, 218–222.
- [150] Ristic M., Oppermann J., Sibinovic S., Phillips T. N. (1964). Equine piroplasmosis - a mixed strain of *Piroplasma caballi* and *Piroplasma equi* isolated in Florida and studied by the fluorescent-antibody technique. *American Journal of Veterinary Research*, 25(104)
- [151] Rizk M. A., El-sayed S. A. E., Nassif M., Mosqueda J., Xuan X., Igarashi I. (2019). Assay methods for *in vitro* and *in vivo* anti-babesia drug efficacy testing: Current progress, outlook and challenges. *Veterinary Parasitology*, 279, 109013.
- [152] Robert N., Walzerdr C., Rüeggdr S., Kaczensky P., Ganbaatarmsc O., Stauffer C. (2005). Pathologic findings in reintroduced przewalski's horses (*Equus caballus przewalskii*) in southern Mongolia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36, 273–285.
- [153] Rothschild C. M. (2013). Equine Piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(7), 497–508.
- [154] Rothschild C. M., Knowles D. P. (2007). Chapter 60: Equine Piroplasmosis. In: Sellon D., Long M. T. (2007). *Equine Infectious Diseases*, Saunders, 465–473.
- [155] Rubel F., Brugger K., Pfeffer M., Chitimia-dobler L., Didyk Y. M., Leverenz S., Dautel H., Kahl, O. (2016). Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 224–233.
- [156] Rudolph D., Knülle W. (1974). Site and mechanisms of water vapour uptake from the atmosphere in Ixodid ticks. *Nature*, 249, 84–85.

- [157] Rudolph W., Correa J., Zurita L., Manley W. (1975). Equine piroplasmosis: Leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. *British Veterinary Journal*, *131*, 601–609.
- [158] Sant C., Abadie R., Pargass I., Basu A. K., Asgarali Z., Charles R. A., Georges K. C. (2016). Prospective study investigating transplacental transmission of equine piroplasmosis in thoroughbred foals in Trinidad. *Veterinary Parasitology*, *226*, 132–137.
- [159] Schuster F. L. (2002). Cultivation of *Babesia* and *Babesia*-like blood parasites: Agents of an emerging zoonotic disease. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*, 365–373.
- [160] Schwint O. N., Ueti M. W., Palmer G. H., Kappmeyer L. S., Hines M. T., Cordes R. T., Knowles D. P., Scoles G. A. (2009). Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*, 4327–4332.
- [161] Scoles G. A., Ueti M. W. (2015). Vector ecology of equine piroplasmosis. *Annual Review of Entomology*, *60*, 561–580.
- [162] Short M. A., Clark C. K., Harvey J. W., Wenzlow N. (2012). Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *240*, 588–595.
- [163] Singh B., Banerjee D. P., Gautam O. P. (1980). Comparative efficacy of diminazene diaceturate and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. *Veterinary Parasitology*, *7*, 173–179.
- [164] Sonenshine D., Roe M. (2014). *Chapter 4: External and Internal Anatomy of Ticks*. In: Sonenshine D., Roe M. (2014). *Biology of ticks. Volume 1*. New-York, Oxford University Press, 74-98.
- [165] Soulé C., Perret C., Carrouée O., Fabien J. F., Dorchie P. (1998). Répartition géographique des babésioses équine latentes en France. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *28*, 403–404.
- [166] Stachurski F., Vial L. (2018). *Installation de la tique Hyalomma marginatum, vectrice du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, en France continentale*. In: Bulletin épidémiologique Santé animale et Alimentation, *84*, 1-5.
- [167] Tamzali Y. (2013). Equine piroplasmosis: An updated review. *Equine Veterinary Education*, *25*, 590–598.
- [168] Tarav M., Tokunaga M., Kondo T., Kato-mori Y., Hoshino B. (2017). Problems in the protection of reintroduced przewalski's horses (*Equus ferus przewalskii*) caused by piroplasmosis. *Journal of Wildlife Diseases*, *53*, 911–915.
- [169] Tenter A., Friedhoff K. T. (1986). Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Veterinary Parasitology*, *20*, 49–61.
- [170] Uhel F., Zafrani L. (2019). Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Médecine Intensive Réanimation*, *28*, 464–472.
- [171] Uilenberg G. (2006). Babesia-A historical overview. *Veterinary Parasitology*, *138*, 3–10.
- [172] USDA. (2010). A literature review of equine piroplasmosis. Retrieved from Animal and Plant Health Inspection Service website. [en ligne] https://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/piroplasmosis/downloads/ep_literature_review_september_2010.pdf. Consulté le 08/09/2020.
- [173] USDA, Gauthier J., Harris R., James A., Voelker L. (2011). Equine piroplasmosis domestic pathways assessment. *Wildlife Disease and Zoonotics*, *181*, 62p.
- [174] Valcárcel F., González J., González M. G., Sánchez M., Tercero J. M., Elhachimi L., Carbonell J. D., Sonia Olmeda, A. (2020). Comparative ecology of *Hyalomma lusitanicum* and *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 (*Acarina: Ixodidae*). *Insects*, *11*, 303.

- [175] Vatanssever Z. (2017). *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, 1878 (Figs. 117-119). In: *Ticks of Europe and North Africa*, Springer, Cham, 299–303.
- [176] Vercammen F., Deken R. De, Maes L. (2000). Prophylactic activity of imidocarb against experimental infection with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 63, 195–198.
- [177] Vetodiag. Le syndrome piro-like équin [en ligne]. <https://www.vetodiag.fr/wp-content/uploads/2018/02/Piro-like-Equin.pdf>/ Consulté le 17/11/2020.
- [178] Vial H. J., Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138, 147–160.
- [179] Vial L., Stachurski F., Leblond A. (2016). Strong evidence for the presence of the tick *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 in southern continental France. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 1162–1167.
- [180] Votýpka. Jan. 2011. *Babesiidae*. Version 18 May 2011 (under construction). [en ligne] <http://tolweb.org/Babesiidae/68076/2011.05.18> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>. Consulté le 07/08/2020.
- [181] Weiland G. (1986). Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Veterinary Parasitology*, 20, 43–48.
- [182] Wise L. N., Kappmeyer L. S., Mealey R. H., Knowles D. P. (2013). Review of equine piroplasmosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27, 1334–1346.
- [183] Wise L. N., Knowles D. P., Rothschild C. M. (2013). Chapter 56 – Piroplasmosis. In: Sellon D., Long M. T. (2013). *Equine Infectious Diseases* (Second Edition), Saunders, 467-474.
- [184] Wise L. N., Pelzel-McCluskey A. M., Mealey R. H., Knowles D. P. (2014). Equine piroplasmosis. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 30, 677–693.
- [185] Wright J. E. (1969). Photoperiodic induction of diapause in larvae of the winter tick, *Dermacentor albipictus*. *Annals of the Entomological Society of America*, 62, 285–287.
- [186] Xuan X., Larsen A., Ikadai H., Tanaka T., Igarashi I. (2001). Expression of *Babesia equi* merozoite antigen 1 in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 705–709.
- [187] Zaemi M., Razmi G. R., Mohammadi G. R., Abedi V., Yaghfoori S. (2016). Evaluation of serum biochemical profile in Turkoman horses and donkeys infected with *Theileria equi*. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 167, 302–309.
- [188] Zapf F., Schein E. (1994). New findings in the development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the salivary glands of the vector ticks, *Hyalomma* species. *Parasitology Research*, 80, 543–548.
- [189] Zapf F., Schein E. (1994). The development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the gut and the haemolymph of the vector ticks, *Hyalomma* species. *Parasitology Research*, 80, 297–302.
- [190] Zobba R., Ardu M., Niccolini S., Chessa B., Manna L., Cocco R., Pinna Parpaglia M. L. (2008). Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28, 301–308.
- [191] Zwegarth E., Ahmed S., Rehbein G., Voigt W. P. (1983). Cell-mediated immune response to *Babesia equi*-transformed lymphoblastoid cells *in vitro*. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten Und Parasitologie*, 254, 281–289.
- [192] Zwegarth E., Just M. C., De Waal D. T. (1996). *In vitro* cultivation of *Babesia equi*: detection of carrier animals and isolation of parasites. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 64, 51–56.

[193] Zweygarth E., Lopez-Rebollar L., Nurton J., Guthrie A. J. (2002). Culture, isolation and propagation of *Babesia caballi* from naturally infected horses. *Parasitology Research*, 88, 460–462.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre d'information sur le projet

Lettre d'information - Enquête sur la piroplasmose équine dans le Grand-Ouest de la France

A conserver par le propriétaire

Les objectifs de cette enquête et du projet de recherche associé sont de caractériser les zones dans le Grand-Ouest où la piroplasmose équine est présente, de définir des facteurs de risque pour la piroplasmose équine et d'analyser les agents infectieux et leur génétique afin d'améliorer à terme le diagnostic et proposer des candidats vaccin.

Vous pouvez nous y aider avec plusieurs niveaux possibles d'implication.

Niveau 1 : le questionnaire et la prise de sang de votre cheval

Nous allons vous poser des questions sur votre cheval, ses habitudes de vie et son environnement. Nous essayons de définir le risque acarologique, c'est à dire le risque qu'a votre cheval dans les conditions dans lesquelles il vit de rencontrer des tiques susceptibles de lui transmettre la piroplasmose. Même si votre cheval n'a pas eu à votre connaissance la piroplasmose, il est un témoin essentiel d'un environnement non favorable à la présence de la maladie et votre réponse au questionnaire est toute aussi importante. En parallèle des questionnaires, nous allons effectuer un diagnostic gratuit de la piroplasmose sur votre animal et nous analyserons l'ensemble de ces données. Grâce aux nombres de chevaux analysés (500 minimum) provenant de diverses parties de l'Ouest de la France, nous allons définir la fréquence de cette maladie et sa répartition géographique.

Niveau 2 : les tiques et l'infection

Si vous voyez fréquemment des tiques gorgées sur votre cheval, vous pouvez les collecter pour nous. Demandez le kit tique-tiques gratuit ainsi qu'un tube de collecte pour mettre les tiques et une notice explicative. Grâce à l'enveloppe pré-affranchie, vous pouvez nous renvoyer les tiques collectées que nous identifierons et analyserons pour leur portage d'agents de la piroplasmose.



Niveau 3 : les tiques de l'environnement

Si vous êtes très intéressés par la piroplasmose, et que vous savez qu'il y a des tiques dans l'environnement de votre cheval, vous pouvez les collecter à l'oeil au bout des brins d'herbe ou avec un drapeau comme ci-dessous :

Un morceau de molleton blanc, un bâton pour l'accrocher, on balaye les zones où on voit habituellement des tiques : elles s'y accrochent comme sur les jambes de votre cheval ou sur votre bas de pantalon.

Une pince pour les en décrocher.

Un tube, la date, la référence de votre cheval dans notre étude, une enveloppe et vous aurez contribué encore plus à cette enquête.



Niveau 4 : une étude sur le site de vie de votre cheval

Si l'environnement de votre cheval présente des risques avérés de piroplasmose (cheval testé positif, tiques positives), et si bien sûr vous êtes intéressés, nous ferons peut être appel ultérieurement à votre participation pour une analyse plus approfondie de l'environnement de votre cheval. Une équipe pourra alors être amenée à se déplacer chez vous pour collecter des tiques sur les prés de votre cheval ou aux abords immédiats.

Les résultats vous seront envoyés à la fin de l'étude, grâce à l'adresse que vous nous aurez communiquée sur la lettre de consentement. Cette étude est validée par le Comité d'éthique animale d'Oniris, le CERVO.

Quel que soit votre degré d'implication, nous vous remercions
par avance de votre aide pour cette enquête.

La référence de votre cheval : CV19-

Contact : laurence.malandrin@oniris-nantes.fr

Annexe 2 : Lettre de consentement éclairé

Enquête sur la piroplasmose équine dans le Grand-Ouest de la France

Lettre de consentement éclairé

Référence cheval pour l'enquête : CV19-

Coller Etiquette CLOVIS :

« Je, soussigné(e) (Nom Prénom), demeurant
.....(Adresse)
à(Localité)

reconnais avoir reçu de la part de(Nom Prénom)
l'information :

- sur l'intégralité des procédures mises en jeu lors de l'enquête « **Piroplasmose équine Grand-Ouest** »
- sur les bénéfices attendus et les risques potentiels (cf tableau au verso de cette page) de l'enquête
- toutes les réponses à mes questions.

Dans ces conditions, j'accepte librement que soit inclus dans l'étude « **Piroplasmose équine Grand-Ouest** »
l'animal dont je suis le propriétaire* ou le représentant dûment mandaté ou le détenteur* :

.....(Nom),
.....(type et numéro d'identification),
.....(espèce),
de race, de sexe..... et âgé de an(s).

J'ai noté que la participation à l'enquête n'occasionne aucun frais supplémentaire à ma charge et qu'elle ne s'accompagne pas non plus d'une rémunération associée.

J'ai été prévenu(e) que j'ai le droit à tout moment et pour quelque raison que ce soit de retirer mon animal de l'étude.

J'autorise les équipes de recherche d'Oniris et/ou leurs partenaires à utiliser les données et les prélèvements de mon animal de manière anonyme dans le but d'améliorer l'état des connaissances scientifiques et techniques sur le sujet. Je consens cependant à la levée de l'anonymat si celle-ci est demandée par les autorités publiques.

Bénéfices attendus	Contraintes éventuelles
Prévalence de la piroplasmose équine Bio-collection d'agents pathogènes Recherche de candidats vaccin	Prélèvement sanguin de 5-10 ml.

Fait à Oniris, le 2019

Signature de l'investigateur principal
Laurence Malandrin

Signature du propriétaire* ou du représentant dûment
mandaté du propriétaire* ou du détenteur* de l'animal

* rayer la mention inutile

Annexe 3: Questionnaire donné aux participants

Votre cheval et son environnement

Votre cheval, sa référence dans notre enquête : CV19-

Lieu de résidence du cheval : commune code postal

Age ans Sexe : mâle femelle mâle castré

Race Robe

Taille garrot cm

Utilisation : Plusieurs réponses possibles

compétition loisir promenade reproduction autre, précisez

Votre cheval vit dans le même environnement depuis quelle durée ? an(s)

Votre cheval et la piroplasmose

Votre cheval a-t'il déjà été diagnostiqué positif pour la piroplasmose ?

oui non

Si oui, il y a combien de temps ? an(s)

Si oui, savez-vous quelle méthode a été utilisée pour le diagnostic ? plusieurs choix possibles

ne sais pas frottis sanguin sérologie (IFI, ELISA) PCR, qPCR autre :

Si oui, savez-vous quel était l'agent infectieux responsable

ne sais pas *Babesia caballi* *Theileria equi*

Si oui, quel traitement a-t'il reçu :

Carbesia Oxytetracycline autre, précisez ne sais pas ou plus

Votre cheval et ses déplacements

Avez-vous acheté votre cheval ?

oui non

Connaissez-vous les régions/pays fréquentés par votre cheval avant son achat ?

oui non

Si oui, lesquels ?

Depuis que vous avez votre cheval, change-t'il souvent de lieu de vie (c'est à dire plus d'une fois/an, sur une distance supérieure à 10km) ?

oui non

Si oui, est-ce pour des durées de plus d'une semaine et dans des environnements à risque de présence de tiques : boisements, haies, prés peu entretenus ?

oui non

Si oui, est-ce ?

en France : quelle(s) région(s) ? en Europe : quel(s) pays ? hors Europe : quel(s) pays ?

Votre cheval et sa vie extérieure

Votre cheval change peut être souvent de prés, en fonction des périodes de l'année, en fonction des années. Essayez de définir le type le plus fréquent de pâtures dans lesquelles il va. Ces informations nous renseignent sur le risque qu'à votre cheval de rencontrer des tiques. Elles sont donc très importantes.

Sur une année, vous estimez que votre cheval est :

- toujours dehors (pré avec un abri) jamais dehors (au box)
 1/2 de son temps dehors 1/3 de son temps dehors ¼ de son temps dehors

Quand votre cheval est-il au pré ?

	Printemps (avril-juin)	Été (juillet-septembre)	Automne (octobre-novembre)	Hiver (décembre-mars)
Soit Box 24/24 (cochez si oui)				
Soit Pré 24/24 (cochez si oui)				
Soit alternance box/pré (Indiquez approximativement le nombre d'heures en extérieur /jour)				

Type de prés

Attention : Si plusieurs réponses possibles car votre cheval fréquente différents prés, alors classez les types de pré par ordre de temps de fréquentation décroissant (1 le plus fréquenté, 2 ou 3 le moins fréquenté)

Type d'enherbement : sélectionnez au moins une réponse

- Paddock sans herbe Prairie semée Prairie permanente



Dans le pré, l'herbe est-elle ? sélectionnez au moins une réponse

- toujours rase parfois haute



Délimitation des prés : sélectionnez au moins une réponse

- Clôture artificielle seule Haie, sur un ou plusieurs côtés de la pâture Forêt ou bosquet sur un ou plusieurs côtés de la pâture



Entretien des pâtures : sélectionnez au moins une réponse

- Pré uniformément enherbé Pré hétérogène
(ronces, arbrisseaux, épineux, orties, fougères en milieu de pâtures)



Humidité des pâtures : sélectionnez au moins une réponse

- Proximité (moins de 10 m) d'un point d'eau naturel (accessible ou non aux chevaux) Pré inondé une partie de l'année Pas de point d'eau naturel



Voyez-vous ou avez-vous déjà vu des animaux sauvages ou des traces de leur passage sur les prés fréquentés par votre cheval ou aux alentours immédiats?

(crottes de lapin, labourage de sangliers, empreintes de chevreuils, plumes ...)

- oui non

Si oui, chaque fois que vous rendez visite à votre cheval ?

- oui non

C'est à dire :

- 1 fois/an 5 à 6 fois/an tous les mois toutes les semaines tous les jours

Si oui, lesquels (animaux ou traces identifiables)?

Attention : Si plusieurs réponses possibles, alors classez les animaux sauvages ou leurs traces par ordre décroissant (1 le plus souvent vu, 6 le moins souvent vu ou jamais vu)

- cervidés sangliers renards lapins
 échassiers canards autres, précisez

Votre cheval et les tiques

Avez-vous vu des tiques sur votre cheval ?

- oui non

Si oui, à quelle période ?

Attention : Classez les périodes par ordre de fréquence décroissant : 1 le plus fréquent, 4 le moins fréquent

- printemps été automne hiver ne sais plus

Si oui, quelle taille ?

Attention : Classez par ordre de fréquence décroissant : 1 le plus fréquent, 3 le moins fréquent

- 1-2 mm 2-3 mm > 3 mm ne sais pas, plus



Avez-vous vu des tiques dans ou autour des prés fréquentés par votre cheval ?

- oui non

Si oui, à quelle(s) période(s) ?

Attention : Classez les périodes par ordre de fréquence décroissant : 1 le plus fréquent, 4 le moins fréquent

- printemps été automne hiver ne sais pas

Si oui, quelle taille ?

Attention : Classez par ordre de fréquence décroissant : 1 le plus fréquent, 3 le moins fréquent

- 1 mm 2 mm > 3 mm ne sais pas



Annexe 4 : Protocole de préparation des échantillons sanguins

  UMR 1300 BioEpAR	Mode Opérateur	Réf : TiBoDi-MO-74
	Protocole de traitement du sang en vue de la détection d'agents pathogènes	Version : 1.0 Date : 20/01/2021 Page : 1 / 2

Mis à disposition : (exemples)
Sharepoint/Commun/Groupes_transversaux/Qualité/Doc Qualité BIOEPAR/Biologie Moléculaire)

Service responsable	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Equipe TiBoDi (Tick & Tick-Borne Diseases) UMR 1300 BIOEPAR	Nom : Maggy Jouglin Fonction : AI Visa : 20/01/2021	Nom : Nathalie De la Cotte Fonction : TR Visa : 20/01/2021	Nom : Laurence Malandrin Fonction : CR Visa : 20/01/2021

Objectif

Laver et préparer des prélèvements de sang pour des protocoles de mise en culture cellulaire et /ou d'analyse en biologie moléculaire des culots sanguins.

1. Réactifs

- o Milieu de culture RPMI1640 (Ozyme BE12-115F)
- o Gentamicine 10 mg/ml conservé à 4°C (Ozyme 17-519L)
- o Amphotéricine B 25mg/ml aliquoté en 0,5 ml et conservé à -20°C (Lonza 17-836E)
- o Pour limiter les contaminations fongiques et bactériennes, préparer un flacon de RPMI 1640 + G + A : à un flacon de 500ml, additionner de 2,5 ml de gentamycine 10 mg/ml et 0,5 ml d'amphotéricine B
- o Colorant Diff Quick Heama coloration rapide (Labo Technik, Berlin), solution de fixation (LT008/S), solution de coloration I rouge (LT003), solution de coloration II bleue (LT004)
- o PBS 1X fait à partir du Phosphate Buffered Saline 10X en le diluant au 1/10 (Sigma D1408)
- o Alcool 70%

2. Equipements

- o PSM Poste de sécurité microbiologique
- o Micro pipettes et cônes dédiés
- o Tube falcon stérile 15 ml
- o Tube à hémolyse stérile 5 ml
- o Pipettes stériles 5 ou 10 ml
- o Pipeteur
- o Lames porte objet et étaleurs
- o Centrifugeuse
- o Microtubes 1,5 ml stérile (type eppendorf)

Mode opératoire

Dès leur réception, les tubes de prélèvements de sang réalisés en anticoagulant « type EDTA ou héparine » sont nettoyés à l'extérieur sous l'eau et pulvérisés avec de l'alcool 70 °C, avant d'être placés sous le PSM.

- o Puis deux étalements de sang direct sont réalisés avec 3 µL de sang (noter SD).
- o Les prélèvements sont ensuite centrifugés (2200 rpm, pendant 10 minutes).
- o Le plasma est collecté dans 1 tube à hémolyse (1 à 2 ml) et un microtube de 1,5ml (200 µl).

  <i>UMR 1300 BioEpAR</i>	Mode Opérateur	Réf : TiBoDi-MO-74
	Protocole de traitement du sang en vue de la détection d'agents pathogènes	Version : 1.0 Date : 20/01/2021 Page : 2 / 2

- Prélever environ 1.8 ml de sang au pipeteur (buffy coat + globules rouges) et transférer dans un falcon de 15 ml contenant 5 ml de PBS 1X (noter P pour lavage PBS 1X stérile).
- Et mettre le reste du culot avec la même pipette dans 1 tube falcon de 15 ml contenant 5 ml de RPMI 1640 + G + A (noté C pour la mise en culture), puis bien mélanger les tubes falcon avant centrifugation (2200 rpm, pendant 10 minutes).
- Avant la mise en culture, il est préférable de réaliser un second lavage du tube noté C avec 5 ml de RPMI 1640 + G + A. Puis centrifuger de nouveau (2200 rpm, 10 minutes), enlever 3 ml de surnageant et maintenir à 4 °C pour la mise en culture.
- Enlever la totalité du surnageant (PBS 1X stérile) dans le tube noté P. Rajouter le même volume de PBS 1X que de globules rouges (1/1). Puis les globules rouges, le buffy coat et le PBS 1X sont homogénéisés (va et vient avec la pipette) et aliquotés en tubes eppendorf (étiquetés).
- Un tube de 200 µl et deux tubes eppendorf de 1500 µl sont réalisés. Les tubes sont stockés à -20°C. L'extraction d'ADN sera réalisé sur un volume total de 200 µl (100 µl GR + 100µl de PBS 1X). Les deux autres tubes sont stockés à -20°C en prévision d'un besoin ultérieur.
- Réaliser 2 étalements « GR » de globules rouges + buffy coat + PBS 1X avec 5 µl.

Les étalements sanguins « SD et GR » sont colorés au May-Grünwald-Giemsa (MGG) (Diff Quick) et observés au microscope optique pour la détection de parasites ou de bactéries. Pour cela, déposer les lames sur un support et colorés comme si dessous :

- solution de fixation LT008/S, 12 secondes
- solution de coloration rouge LT003, 12 secondes
- solution de coloration bleue LT004, 30 secondes
- Rincer les lames colorées avec de l'eau du robinet et pulvériser avec un peu d'alcool 70% pour éliminer les dépôts de colorants. Laisser sécher les lames et observer au microscope optique X100, sous immersion (huile à immersion RAL, indice de réfraction 1,513+/- 0,005).
- Deux lames « SD et GR » sont stockées dans une boîte porte lames.

Annexe 5 : Protocole d'extraction d'ADN

  <i>UMR 1300 BioEpAR</i>	Mode Opérateur	Réf : TiBoDi-MO-76
	Extraction d'ADN génomique avec le kit Macherey Nagel NucleoSpin Blood	Version : 1.0 Date : 20/01/2021 Page : 1 / 2

Mis à disposition : (exemples)

- Sharepoint/Commun/Groupes_transversaux/Qualité/Doc Qualité BIOEPAR/Biologie Moléculaire)

Service responsable	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Equipe TiBoDi (Tick & Tick-Borne Diseases) UMR 1300 BIOEPAR	Nom : Maggy Jouglin Fonction : AI Visa : 20/01/2021	Nom : Nathalie De la Cotte Fonction : TR Visa : 20/01/2021	Nom : Laurence Malandrin Fonction : CR Visa : 20/01/2021

1. Principe de la méthode

Extraction d'ADN génomique à partir d'un prélèvement de sang d'hôtes suspectés d'être contaminés par des parasites ou des bactéries, en utilisant le kit Macherey Nagel « NucleoSpin Blood ».

2. Réactifs

Kit Macherey Nagel : NucleoSpin blood Genomic DNA (ref fournisseur : 740951.250 preps)
Protéinase K fournie dans le kit : additionner 3,35 ml de tampon protéinase, aliquoter en 200 µL et stocker à -20°C, la solution Protéinase K est stable 6 mois.
Tampon B5, dès l'ouverture du kit, ne pas oublier d'ajouter 200ml d'éthanol 99% au contenu du tampon B.
PBS 1X à partir du Phosphate Buffered Saline 10X (Sigma D1408)
Ethanol 99%

3. Equipements

Micro colonne NucleoSpin
Tube collecteur de 2 ml
Microtube 1,5 ml stérile (type eppendorf)
Micro pipettes dédiées à la biologie moléculaire
Centrifugeuse de paillasse
Bain à sec 70°C

4. Hygiène et sécurité (précautions à prendre)

Tout d'abord, préchauffer le tampon d'éluion BE aliquoté au volume utile, à 70°C, dans un eppendorf stérile.
Puis afin d'éviter la contamination des solutions en prélevant directement dans les flacons, transvaser le volume nécessaire à chaque étape dans un tube falcon stérile.

Mode opératoire

Les prélèvements, qu'il s'agisse de puits de culture cellulaire ou de culots de globules rouges, sont préalablement lavés avec du PBS 1X stérile et congelés si nécessaire. Faire l'extraction sur un volume total de 200 µL.

  UMR 1300 BioEpAR	Mode Opérateur	Réf : TiBoDi-MO-76
	Extraction d'ADN génomique avec le kit Macherey Nagel NucleoSpin Blood	Version : 1.0 Date : 20/01/2021 Page : 2 / 2

Décongeler les échantillons de sang et ajuster, si le volume est inférieur à 200 μ L, avec du PBS 1X

Ajouter 25 μ L de protéinase K

Ajouter 200 μ l de solution B3 du kit Macherey-Nagel

- Agiter au vortex le mélange pendant 10-20 secondes
- Incubation 10 à 15 min à 70°C, bain sec. Il est possible d'augmenter le temps d'incubation jusqu'à 30 minutes et de vortexer durant l'incubation.
- Pendant l'incubation, le lysat devient marron avec le tampon B3.

Ajouter 210 μ L éthanol (96-100%)

Agiter par vortex pour homogénéiser le mélange

Placer une colonne sur un collecteur et déposer la solution faite précédemment, soit 635 μ L

Centrifuger 1 min à 11 000g.

Si l'échantillon n'est pas passé complètement à travers la membrane de la colonne, il est alors possible d'augmenter la force centrifuge à 15 000g max.

- Jeter le collecteur

Placer un nouveau collecteur sous la colonne et déposer 500 μ L de tampon BW pour effectuer le premier lavage.

- Centrifuger 1min à 11 000g
- Jeter le réservoir

Placer un nouveau collecteur sous la colonne et déposer 600 μ L de tampon B5 pour effectuer le second lavage.

- Centrifuger 1min à 11 000g
- Vider le réservoir et re-centrifuger 1 min à 11 000g cela permet d'enlever les résidus d'alcool présent sur la colonne

Jeter le réservoir

Placer un tube eppendorf stérile de 1,5 ml sous la colonne

Première élution : déposer 50 μ L de tampon BE préchauffé à 70°C

- Incuber 1 min à température ambiante
- Centrifuger 3 min à 11 000g

Ne pas vider l'éppendorf car il contient l'ADN

Deuxième élution : déposer 50 μ L de tampon BE préchauffé à 70°C

- Incuber 1 min à température ambiante
- Centrifuger 3 min à 11 000g

Placer les extraits d'ADN à 4°C, en attente d'amplification par PCR pour la détection de potentiels agents pathogènes.

Annexe 6 : Protocole de PCR nichée pour la détection des agents de piroplasmose

  UMR 1300 BioEPar	Mode Opérateur		Réf : TiBoDi - MO - 75
	PCR Nichée pour détection de <i>Theileria equi</i> - <i>Babesia caballi</i>		Version : 1.1 Date : 19/01/2021 Page : 1 / 5

Mis à disposition :

- Sharepoint/Commun/Groupes_transversaux/Qualité/Doc Qualité BIOEPAR/Biologie Moléculaire

Service responsable	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Equipe TiBoDi (Tick & Tick-Borne Diseases) UMR 1300 BIOEPAR	Nom : Maggy Jouglin Fonction : AI Visa : 05/01/2021	Nom : Florian Berquier Fonction : Stagiaire Master 2 Visa : 21/01/2021	Nom : Laurence Malandrin Fonction : CR Visa : 19/01/2021

OBJECTIF :

Cette technique consiste à réaliser deux PCR successives (la seconde dite PCR2 nichée sur la première PCR1), en utilisant des couples d'amorces différents en vue de détecter les piroplasmes de type *Theileria equi* et *Babesia caballi* et caractériser leur diversité génétique chez des chevaux. Différents couples d'amorces sélectionnés sur le gène 18S ADN ont été testés en amont et sur différents extraits de sangs de chevaux contaminés et seuls deux couples sont retenus dans ce mode opératoire.

I – REACTIFS

- Désoxyribonucléotides :
 - solution mère Mix dNTPs à 100 mM (Eurobio : réf GEA PCR 11-5D)
 - solution de travail à 2 mM : diluer la solution mère au 1/50^{ème} dans l'eau, 5µl + 245µl d'eau sigma
- Eau (sigma W4502-1L) : eau stérile aliquotée en tube Eppendorf stérile sous PSM (salle de culture cellulaire)
- GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase 5 U/µl (Promega : réf M7805, 500U)
- Tampon 5 X (green ou colorless) fourni avec la GoTaq polymerase
- MgCl₂ à 25 mM fourni avec la GoTaq polymerase.
- Amorces : diluer les amorces dans de l'eau (sigma : W4502-1L)
 - solution mère : 100µM
 - solution de travail : 25µM

↳ 1^{er} couple d'amorces externes (PCR 1)

Pour *Theileria equi* et *Babesia caballi* :

CryptOF (5' AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCAT 3')

CryptOR (5' GCTTGATCCTTCTGCAGGTTCACTAC 3')

↳ 2^{ème} couple d'amorces en interne (PCR 2)

Pour *Theileria equi* :

TeqF3 (5' TCAGTTGCGTTTATTAGAC 3')

TeqR5 (5' CACAAAACCTCCCTAGACG 3')

Pour *Babesia caballi* :

BabF4 (5' TTGTAATTGGAATGATGGC 3')

BabR4 (5' TCCCTACAACCTTYTCGRTGT 3')

  UMR 1300 BioEpAR	Mode Opérateur	Réf : TiBoDi - MO - 75 Version : 1.1 Date : 19/01/2021 Page : 2 / 5
	PCR Nichée pour détection de <i>Theileria equi</i>-<i>Babesia caballi</i>	

Contrôle positif : 7 µL ADN génomique issus d'extraits de sangs de chevaux détectés positifs (ex : CV19-07, CV19-08, CV19-16)
 Contrôle de tampons d'extraction pour valider l'absence de contamination externe durant l'extraction (cf. TiBoDi-MO-76)
 Contrôle négatif de PCR (water sigma : W4502-1L)
 Marqueur taille : Euro ladder XL (Eurobio GEPMQR05) ou 100bp DNA Ladder (Solis Biodyne, 0,1 µg/µl, range 100-3000bp)
 Agarose (Dutscher, 4905009)
 Bromure d'éthidium :

- o solution mère à 10 mg/ml
- o solution fille diluée à 0,5 mg/ml (0,5 ml dans 10 ml d'eau distillée)

II - PETIT MATERIEL

Gants sans poudre
 Pipettes et pointes à filtres dédiées
 Microtubes PCR individuels 0,2 mL (conseillés pour éviter les contaminations de tube à tube)

III - APPAREILLAGE

Thermocycleur Biorad TCA et TCB (96 puits)
 Dispositif pour couler les gels (cf. VIPA-MO-54)
 Cuve à électrophorèse Apelex (cf. VIPA-MO-54)
 Générateur PolyLabo PS600-800 et cordons d'alimentation
 Hotte chimique CaptairChem, Erlab
 Micro-ondes
 Système d'acquisition d'image en UV

IV - MODE OPERATOIRE

Réalisation des PCR

Une PCR externe (PCR1) est tout d'abord réalisée sur les extraits d'ADN de sangs de chevaux, puis elle est suivie d'une PCR nichée (PCR2) avec les amorces spécifiques des piroplasmes recherchés.

IMPORTANT :

⇒ Afin d'éviter toute contamination avec le contrôle positif, il est plus judicieux de le manipuler en dernier.

IV-1 Première PCR1 CryptOF/OR

Réalisation d'un MIX :

Réactifs qsp 30 µL volume final PCR	1 tube
H ₂ O (water free sigma)	7,05 µL
Tampon 5X Colorless	6 µL
MgCl ₂ 25 mM	2,4 µL
dNTPs 2mM chaque	5µL
Amorce CryptOF (25µM)	1,2 µL
Amorce CryptOR (25µM)	1,2 µL
GoTaq Flexi (5 U/µl)	0,15 µL

Salle mix

  UMR 1300 BioEpaR	Mode Opérateur	Réf : TiBoDi - MO - 75 Version : 1.1 Date : 19/01/2021 Page : 3 / 5
	PCR Nichée pour détection de Theileria equi-Babesia caballi	

Soit un volume de 20 µL de mix par microtube
 Ajouter 7 µL d'ADN : pour chaque extrait, possibilité de faire la PCR en Duplicate } Salle échantillons

Programme du thermocycleur :

1 - Température initiale	95°C	3 min
2 - Dénaturation	95°C	30 sec
3 - Hybridation	58°C	40 sec (30 à 60 sec. max)
4 - Elongation	72°C	30 sec
5 - Retour à l'étape 2 :	39 fois (40 cycles)	
6 - Elongation finale	72°C	3 à 5 min
7 - Maintien	15°C	∞

Facultatif :

On peut faire migrer 6 µL de produit d'amplification avec 2 µL de tampon de charge (si vous avez utilisé un tampon non coloré) sur un gel d'agarose à 1%.

Déposer 5µl de marqueur de poids moléculaire Eurobio XL dans un puits.

Le poids moléculaire attendu du produit d'amplification est d'environ 1700 paires de bases.

IV-2 PCR Nichée

IMPORTANT

⇒ Pour la préparation de la PCR nichée, l'opérateur doit s'installer dans la salle clonage. La paillasse, le jeu de pipettes et la centrifugeuse sont décontaminés à l'eau de javel diluée.

⇒ Si les 2 PCR sont réalisées le même jour, préparer le mix de la PCR2 en même temps que celui de la PCR 1. Le conserver à 4°C (réfrigérateur entrée PFBM) jusqu'à utilisation.

Préparation des produits amplifiés en PCR1 :

Centrifuger la barette de tube ou la plaque avant toute ouverture
 Faire une dilution (1/100^{ème}) pour les échantillons et les témoins « extraction et négatif PCR »
 Dans un nouveau tube, préparer une dilution au 1/100^{ème} en water free
 ↳ 198 µL d'eau
 Puis prendre 2 µL de chaque tube (duplicate) de PCR1
 ↳ Les déposer dans un tube de dilution, soit 200 µL total. } Salle clonage

Le reste du produit amplifié est stocké à 4°C. } Salle clonage

  UMR 1300 BioEpAR	Mode Opérateur	Réf : TiBoDi - MO - 75 Version : 1.1 Date : 19/01/2021 Page : 4 / 5
	PCR Nichée pour détection de <i>Theileria equi</i>-<i>Babesia caballi</i>	

Réalisation d'un MIX avec les amorces spécifiques de chaque agent pathogène recherché

Pour *Theileria equi*

Réactifs qsp 30 µL volume final PCR	1 tube
H ₂ O (water free sigma)	4,05 µL
Tampon 5X Green	6 µL
MgCl ₂ 25 mM	2,4 µL
dNTPs 2mM chaque	5 µL
Amorce TeqF3 (25µM)	1,2 µL
Amorce TeqR5 (25µM)	1,2 µL
GoTaq Flexi (5 U/µl)	0,15 µL

Salle mix

Pour *Babesia caballi*

Réactifs qsp 30 µL volume final PCR	1 tube
H ₂ O (water free sigma)	4,05 µL
Tampon 5X Green	6 µL
MgCl ₂ 25 mM	2,4 µL
dNTPs 2mM chaque	5 µL
Amorce BabF4 (25µM)	1,2 µL
Amorce BabR4 (25µM)	1,2 µL
GoTaq Flexi (5 U/µl)	0,15 µL

Salle mix

Soit un volume de 20 µL de mix par microtube.

Ajouter 10 µL du pool des duplicatas produits de PCR PCR 1 dilué au 1/100^{ème}
 Prévoir 10 µL pour chaque témoin (dilué au 1/100^{ème})

Salle
échantillons

Programme du thermocycleur :

- 1 - Température initiale 95°C 3 min
- 2 - Dénaturation 95°C 30 sec
- 3 - Hybridation 54°C 30 sec (la température est identique pour les deux piroplasmes)
- 4 - Elongation 72°C 40 sec
- 5 - Retour à l'étape 2 : 39 fois (40 cycles)
- 6 - Elongation finale 72°C 3 min

Faire migrer 5 µL de produit d'amplification avec 2 µL de tampon de charge sur un gel d'agarose à 1% (si vous avez utilisé un tampon non coloré) sur un gel d'agarose à 1%. Dans le cas contraire, faire migrer 7 µL de produit d'amplification.

Utiliser 5 µl de marqueur Euroladder ou 3 µl de marqueur Solis Biodyne.

Le poids moléculaire attendu du produit d'amplification est d'environ 1250 pb (*Theileria equi*) et 910 pb (*Babesia caballi*).

Le reste du produit PCR est stocké à 4°C.

Salle clonage

  UMR 1300 BioEpaR	Mode Opérateur	Réf : TiBoDi - MO - 75 Version : 1.1 Date : 19/01/2021 Page : 5 / 5
	PCR Nichée pour détection de Theileria equi-Babesia caballi	

Annexe : support pour la réalisation des PCR

Date :

N° des échantillons :

Témoin extraction :

Témoin négatif :

Témoin positif :

Préparation du mix de la PCR1 (si nécessaire duplicate pour chaque échantillon) :

Réactifs qsp 30 µL volume final PCR	1 tube	x ... tubes
H ₂ O Q	7,05 µL	
Tampon 5X colorless	6 µL	
MgCl ₂ 25 mM	2,4 µL	
dNTPs 2mM chaque	5 µL	
Amorce Ext OF (25µM)	1,2 µL	
Amorce Ext OR (25µM)	1,2 µL	
GoTaq Flexi (5 U/µl)	0,15 µL	

Programme PCR 1 =

Date :

Préparation du mix de la PCR2 : dil 1/100^{ème} sur PCR1

Réactifs qsp 30 µL volume final PCR	1 tube	x ... tubes
H ₂ O (EPPi stérile)	4,05 µL	
Tampon 5X Green	6 µL	
MgCl ₂ 25 mM	2,4 µL	
dNTPs 2m M chaque	5 µL	
Mix TeqF3 et Mix BabF4 (25µM)	1,2 µL	
Mix TeqR5 et Mix BabR4 (25µM)	1,2 µL	
GoTaq Flexi (5 U/µl)	0,15 µL	

Programme PCR 2 =

Annexe 7 : Résumé des données du questionnaire après codage

```

id          ecole          age          sexe          toute_race  race_freq          robe
Length:343  alfort : 79  Min.   : 0.6  fem :153  sf :108  sf :108  bai :130
Class :character  lyon  : 80  1st Qu.: 6.0  hong:144  onc  : 27  autre : 97  alezan : 69
Mode :character  nantes :150  Median :10.0  mal : 44  tf  : 27  onc  : 27  gris  : 47
                toulouse: 34  Mean   :11.1  NA's: 2  ps  : 19  tf  : 27  noir  : 23
                3rd Qu.:15.0  (other):131  (other): 49  (other): 22
                Max.   :31.0  NA's : 7  NA's : 16  NA's : 16  NA's : 37
                NA's   :7

robe_freq   tail_cv          comp          lois          prom          repr          util_aut  duree_environ
bai :130  Min.   : 80.0  0 :167  0 :165  0 :226  0 :302  0 :277  Length:343
alezan : 69  1st Qu.:152.0  1 :150  1 :152  1 : 91  1 : 15  retraite :18  Class :character
gris : 47  Median :160.5  NA's: 26  NA's: 26  NA's: 26  NA's: 26  elevage : 5  Mode :character
noir : 23  Mean   :158.2  NA's: 26  NA's: 26  NA's: 26  NA's: 26  spectacles: 4
isabelle: 15  3rd Qu.:168.0  NA's: 26  NA's: 26  NA's: 26  NA's: 26  1 : 3
(other) : 22  Max.   :180.0  NA's: 26  NA's: 26  NA's: 26  NA's: 26  (other) : 11
NA's : 37  NA's   :77  NA's: 26  NA's: 26  NA's: 26  NA's: 26  NA's : 25

duree_envt  cp          dpt          dpt_freq          dant          dant_tem  danttt_fro  danttt_ser  danttt_pcr
0 : 33  Min.   : 1110  44 : 78  autre :146  0 :287  0 : 8  0 : 28  0 : 12  0 : 24
1 :112  1st Qu.:41190  69 : 35  44 : 78  1 : 30  1 :10  1 : 1  1 : 17  1 : 5
2 : 80  Median :44740  78 : 19  69 : 35  NA's: 26  2 : 6  SO :290  SO :290  SO :290
3 : 62  Mean   :53955  41 : 14  78 : 19  NA's: 26  3 : 4  NA's: 24  NA's: 24  NA's: 24
NA's: 56  3rd Qu.:70803  31 : 12  41 : 14  NSP : 1
                Max.   :95880  (Other):169  (Other): 35  SO :290
                NA's   :25  NA's : 16  NA's : 16  NA's: 24

danttt_nsp  danttp_bab  danttp_thei  danttp_nsp  danttm_carb  dantm_oxy  dantm_aut  dantm_nsp  achat  dep_rsq
0 : 20  0 : 23  0 : 22  0 : 12  0 : 10  0 : 24  0 : 25  0 : 24  0 : 69  0 :253
1 : 9  1 : 6  1 : 7  1 : 17  1 : 18  1 : 4  rien: 3  1 : 5  1 :247  1 : 40
SO :290  NA's: 27  NA's: 50
NA's: 24  NA's: 24  NA's: 24  NA's: 24  NA's: 25  NA's: 25  NA's: 25  NA's: 24

alt_prin    text_prin    alt_ete    text_ete    alt_autom    text_autom    alt_hiv    text_hiv
0 : 21  Min.   : 0.00  0 : 15  Min.   : 0.00  0 : 23  Min.   : 0.00  0 : 40  Min.   : 0.00
1 :111  1st Qu.: 9.00  1 :103  1st Qu.:12.00  1 :136  1st Qu.: 8.00  1 :135  1st Qu.: 4.25
2 :196  Median :24.00  2 :210  Median :24.00  2 :166  Median :24.00  2 :149  Median :24.00
NA's: 15  Mean   :17.35  NA's: 15  Mean   :18.22  NA's: 18  Mean   :16.39  NA's: 19  Mean   :14.85
                3rd Qu.:24.00  NA's: 15  3rd Qu.:24.00  NA's: 18  3rd Qu.:24.00  NA's: 19  3rd Qu.:24.00
                Max.   :24.00  NA's: 15  Max.   :24.00  NA's: 18  Max.   :24.00  NA's: 19  Max.   :24.00
                NA's   :28  NA's: 15  NA's : 27  NA's : 54  NA's : 53

padd_sable  pra_sem    pra_perm    herb_rase    herb_haute    clot    hale    foret    pre_uni    pre_hetero
0 :231  0 :250  0 : 65  0 :173  0 :114  0 :162  0 :184  0 :213  0 :130  0 :134
1 : 71  1 : 52  1 :237  1 :127  1 :186  1 :148  1 :126  1 : 97  1 :143  1 :139
SO : 12  SO : 12  SO : 12  SO : 31  SO : 31  SO : 12  SO : 12  SO : 12  SO : 29  SO : 29
NA's: 29  NA's: 29  NA's: 29  NA's: 12  NA's: 12  NA's: 21  NA's: 21  NA's: 21  NA's: 41  NA's: 41

pre_eauprox  pre_inond  pre_seau  anx_sau  anx_an  anx_bimens  anx_mens  anx_sem  anx_jour  cer
0 :193  0 :266  0 :123  0 : 51  0 :226  0 :188  0 :175  0 :184  0 :183  0 :100
1 :113  1 : 40  1 :183  1 :270  1 : 14  1 : 51  1 : 64  1 : 55  1 : 56  1 :162
SO : 12  SO : 12  SO : 12  SO : 12  SO : 63  SO : 63
NA's: 25  NA's: 25  NA's: 25  NA's: 10  NA's: 40  NA's: 41  NA's: 41  NA's: 41  NA's: 41  NA's: 18

```

sang	ren	lap	ech	can	rag	fais	tcv	tcv_prin	tcv_ete
0 :105	0 :114	0 :48	0 :194	0 :194	0 :232	0 :244	0 :102	0 :43	0 :65
1 :157	1 :148	1 :214	1 :68	1 :68	1 :30	1 :18	1 :228	1 :185	1 :163
SO :63	NA's:13	SO :102	SO :102						
NA's:18		NA's:13	NA's:13						

tcv_autom	tcv_hiv	tcv_nsp	tailtcv_12mm	tailtcv_23mm	tailtcv_3mm	tailtcv_nsp	tpre	tpre_prin
0 :112	0 :146	0 :223	0 :72	0 :45	0 :86	0 :219	0 :180	0 :20
1 :116	1 :82	1 :5	1 :155	1 :182	1 :141	1 :8	1 :113	1 :87
SO :102	SO :102	SO :102	SO :102	SO :102	SO :102	SO :102	SO :12	SO :195
NA's:13	NA's:13	NA's:13	NA's:14	NA's:14	NA's:14	NA's:14	NA's:38	NA's:41

tpre_ete	tpre_autom	tpre_hiv	tpre_nsp	tailtpre_12mm	tailtpre_23mm	tailtpre_3mm	tailtpre_nsp	comp_prin
0 :29	0 :49	0 :59	0 :105	0 :56	0 :31	0 :26	0 :100	0 :67
1 :80	1 :58	1 :40	1 :4	1 :53	1 :78	1 :83	1 :9	1 :232
SO :193	SO :195	SO :203	SO :193	SO :193	SO :193	SO :193	SO :193	SO :21
NA's:41	NA's:41	NA's:41	NA's:41	NA's:41	NA's:41	NA's:41	NA's:41	NA's:23

comp_prin_cv	comp_prin_bv	comp_prin_pr	comp_prin_aut	comp_ete	comp_ete_cv	comp_ete_bv	comp_ete_pr
0 :2	0 :207	0 :202	0 :207	0 :66	0 :2	0 :211	0 :206
1 :206	1 :1	1 :6	lama:1	1 :238	1 :210	1 :1	1 :6
SO :88	SO :88	SO :88	SO :88	SO :15	SO :81	SO :81	SO :81
NA's:47	NA's:47	NA's:47	NA's:47	NA's:24	NA's:50	NA's:50	NA's:50

comp_ete_aut	comp_autom	comp_autom_cv	comp_autom_bv	comp_autom_pr	comp_autom_aut	comp_hiv	comp_hiv_cv
0 :211	0 :66	0 :2	0 :206	0 :200	0 :205	0 :59	0 :2
lama:1	1 :231	1 :204	SO :89	1 :6	lama:1	1 :219	1 :193
SO :81	SO :23	SO :89	NA's:48	SO :89	SO :89	SO :39	SO :98
NA's:50	NA's:23	NA's:48		NA's:48	NA's:48	NA's:26	NA's:50

comp_hiv_bv	comp_hiv_pr	comp_hiv_aut	chien	chat	tdom
0 :194	0 :189	0 :194	0 :97	0 :180	0 :114
1 :1	1 :6	lama:1	1 :222	1 :139	1 :144
SO :98	SO :98	SO :98	NA's:24	NA's:24	SO :55
NA's:50	NA's:50	NA's:50			NA's:30

Annexe 9 : Résumé des réponses au questionnaire des 10 individus positifs à *Babesia caballi*

```

id          ecole      age      sexe      toute_race  race_freq      robe      robe_freq
Length:10  alfort:3      Min.   : 0.800  fem :3  sf      :3  autre:4  alezan :1  alezan :1
Class:character  lyon :7      1st Qu.: 2.000  hong:4  bwp    :1  oc      :1  bai    :1  autre  :1
Mode :character      Median : 6.000  mal :3  connemara:1  onc  :1  gris   :1  bai    :1
                        Mean   : 6.756  cruza:1  pfs    :1  isabelle:2  gris  :1
                        3rd Qu.: 9.000  oc     :1  sf     :3  palomino:1  isabelle:2
                        Max.   :19.000  onc    :1  pie    :1  pie     :1  pie    :1
                        NA's   :1      (Other):2  NA's   :3  NA's   :3
tail_cv     comp      lois      prom      repr      util_aut  duree_environ  duree_envt  cp      dpt
Min. :135.0  0 :3  0 :1  0 :4  0 :7  0 :7  Length:10  1 :6  Min. :18300  18:1
1st Qu.:140.5  1 :4  1 :6  1 :3  NA's:3  NA's:3  Class :character  2 :1  1st Qu.:69228  42:1
Median :146.0  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  Mode :character  NA's:3  Median :69430  69:4
Mean :152.5
3rd Qu.:167.2
Max. :175.0
NA's :4
dpt_freq    dant      dant_tem  dantt_fro  dantt_ser  dantt_pcr  dantt_nsp  dantp_bab  dantp_thei  dantp_nsp  dantm_carb  dantm_oxy
69 :4  0 :6  0 :1  0 :1  1 :1  0 :1  0 :1  1 :1  0 :1  1 :1  0 :1
autre:6  1 :1  SO :6  SO :6
NA's:3  NA's:3

dantm_aut  dantm_nsp  achat      dep_rsq    alt_prin   text_prin   alt_ete    text_ete    alt_autom   text_autom
0 :1  0 :1  0 :3  0 :6  0 :1  Min. : 0.00  1:2  Min. : 7.0  0 :1  Min. : 0.00
SO :6  SO :6  1 :4  1 :1  1 :1  1st Qu.:24.00  2:8  1st Qu.:24.0  1 :1  1st Qu.:24.00
NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  2 :7  Median :24.00  NA's:1  Median :24.0  2 :7  Median :24.00
                        NA's:1  Mean :19.56  Mean :20.7  NA's:1  Mean :19.22
                        3rd Qu.:24.00  3rd Qu.:24.0  3rd Qu.:24.00
                        Max. :24.00  Max. :24.0  Max. :24.00
                        NA's :1  NA's :1

alt_hiv     text_hiv   padd_sable  pra_sem  pra_perm  herb_rase  herb_haute  clot      haie      foret      pre_uni  pre_hetero
0 :1  Min. : 0  0:8  0:10  1:10  0:8  0:2  0 :6  0 :3  0 :2  0 :5  0 :1
1 :1  1st Qu.:24  1:2  1:2  1:8  1 :1  1 :4  1 :5  1 :2  1 :6
2 :7  Median :24  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3
NA's:1  Mean :19
      3rd Qu.:24
      Max. :24
      NA's :1

pre_eauprox  pre_inond  pre_seau  anx_sau  anx_an  anx_bimens  anx_mens  anx_sem  anx_jour  cer      sang      ren
0 :2  0 :5  0 :6  1 :9  0 :7  0 :5  0 :6  0 :4  0 :6  0 :3  0 :2  0 :3
1 :5  1 :2  1 :1  NA's:1  NA's:3  1 :2  1 :1  1 :3  1 :1  1 :6  1 :7  1 :6
NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:1  NA's:1  NA's:1

lap          ech          can          rag          fais         tcv          tcv_prin  tcv_ete  tcv_autom  tcv_hiv  tcv_nsp  tailtcv_12mm  tailtcv_23mm
0 :3  0 :8  0 :7  0 :9  0 :9  0:1  0 :1  0 :1  0 :3  0 :2  0 :9  0 :3  1 :9
1 :6  1 :1  1 :2  NA's:1  NA's:1  1:9  1 :8  1 :8  1 :6  1 :7  SO:1  1 :6  SO:1
NA's:1  NA's:1  NA's:1  NA's:1  NA's:1  SO:1  SO:1  SO:1  SO:1  SO:1

tailtcv_3mm  tailtcv_nsp  tpre      tpre_prin  tpre_ete  tpre_autom  tpre_hiv  tpre_nsp  tailtpre_12mm  tailtpre_23mm
0 :2  0 :9  0 :5  1 :4  1 :4  0 :1  0 :1  0 :4  0 :1  1 :4
1 :7  SO:1  1 :4  SO :5  SO :5  1 :3  1 :3  SO :5  1 :3  SO :5
SO:1  NA's:1  NA's:1  NA's:1  SO :5  SO :5  NA's:1  SO :5  NA's:1

tailtpre_3mm  tailtpre_nsp  comp_prin  comp_prin_cv  comp_prin_bv  comp_prin_pr  comp_prin_aut  comp_ete  comp_ete_cv
1 :4  0 :4  0 :1  1 :5  0 :4  0 :5  0 :5  0 :1  1 :6
SO :5  SO :5  1 :5  SO :2  1 :1  SO :2  SO :2  1 :6  SO :1
NA's:1  NA's:1  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3

comp_ete_bv  comp_ete_pr  comp_ete_aut  comp_autom  comp_autom_cv  comp_autom_bv  comp_autom_pr  comp_autom_aut  comp_hiv
0 :5  0 :6  0 :6  0 :1  1 :5  0 :5  0 :5  0 :5  0 :1
1 :1  SO :1  SO :1  1 :5  SO :2  SO :2  SO :2  SO :2  1 :5
SO :1  NA's:3  NA's:3  SO :1  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  SO :1
NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3

comp_hiv_cv  comp_hiv_bv  comp_hiv_pr  comp_hiv_aut  chien  chat  tdom  anidom  comp.1  pcr_te  pcr_bc
1 :5  0 :5  0 :5  0 :5  0 :3  0 :6  0 :1  0 :3  0 :1  negatif:7  positif:10
SO :2  SO :2  SO :2  SO :2  1 :4  1 :1  1 :3  1 :4  1 :6  positif:3
NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3  NA's:3

```


PRÉVALENCE ET FACTEURS DE RISQUE DE LA PIROPLASMOSE ÉQUINE – ÉTUDE PROSPECTIVE

RESUME

Cette étude a été menée sur 343 chevaux sains vus en consultation dans l'une des quatre écoles vétérinaires françaises (Nantes, Maisons-Alfort, Lyon, Toulouse). Une prise de sang pour un diagnostic PCR de piroplasmose était réalisée, associée à un questionnaire d'enquête interrogeant les participants sur l'environnement de vie de leur cheval.

Une prévalence de 37,9% à la piroplasmose équine a été ainsi déterminée, avec 35,9% de portage sains de *Theileria equi*, 2,9% de portage sain de *Babesia caballi*, et 0,9% de portage sain des deux parasites. Trois facteurs de risque ont pu être mis en évidence grâce au questionnaire distribué : la localisation géographique (plus les chevaux vivent au Sud, plus le risque de portage augmente), le type de pâtures fréquentées (les prairies herbeuses sont plus à risques que les paddocks), la durée quotidienne de pâturage (plus les chevaux pâturent longtemps, plus le risque de portage augmente).

MOTS CLES

- Enquête épidémiologique
- Etude épidémiologique
- Facteurs de risque
- Prévalence
- Theilériose
- Babésiose équine

JURY	Président	Monsieur Michel BOURIN Professeur à la faculté de médecine de Nantes
	Rapporteur	Monsieur Albert AGOULON Maître de conférence à Oniris
	Assesseur	Madame Anne COUROUCE Professeur à Oniris
	Membre invité d'honneur	Madame Laurence MALANDRIN Chargée de recherche INRAE à Oniris

ADRESSE DE L'AUTEUR

19 rue Etienne Pédron
10 000 TROYES

Imprimeur : Impression Thèse