

APPORT DE LA qPCR AU DÉPISTAGE DES INFECTIONS DES RUMINANTS PAR DES ANAPLASMATACEAE : ÉTUDE DE CAS AU PAYS BASQUE ET EN CORSE

CONTRIBUTION OF qPCR TO THE DETECTION OF INFECTIONS OF RUMINANTS WITH ANAPLASMATACEAE: CASE STUDY IN THE BASQUE COUNTRY AND IN CORSICA

Par Mustapha DAHMANI⁽¹⁾, Oleg MEDIANNIKOV⁽¹⁾, Frédéric ROUSSEAU⁽²⁾, Bernard FABRIZY⁽³⁾,
Sandrine FERRANDI⁽⁴⁾, Florence FENOLLAR⁽¹⁾ et Bernard DAVOUST^{(1)*}

(Communication présentée le 23 Juin 2016
Manuscrit accepté le 06 Septembre 2016)

RÉSUMÉ

Les *Anaplasmataceae* sont des bactéries intracellulaires transmises aux animaux et à l'homme, principalement par les tiques. Les *Anaplasma* spp. (*A. marginale*, *A. phagocytophilum*...) et les *Ehrlichia* spp. (*E. canis*, *E. ruminantium*...) en sont les principaux représentants d'importance économique et sanitaire. Les outils de diagnostic disponibles jouent un rôle déterminant dans leur identification. Nous proposons une approche globale par un système permettant d'identifier la plupart des espèces d'*Anaplasmataceae*. Il est basé sur le gène codant l'ARNr 23S ; il couple une qPCR et une PCR standard avec deux jeux d'amorces suivie d'un séquençage. Il est testé pour en vérifier la spécificité, puis mis en œuvre à partir de prélèvements de sang de ruminants et de tiques : dans les Pyrénées-Atlantiques, des brebis suspectes d'infection sont porteuses d'*A. ovis* et leurs tiques *Rhipicephalus bursa*, d'*A. ovis*, d'*A. phagocytophilum* et d'une nouvelle *ehrlichia*. En Haute-Corse, une forte prévalence d'infections par les *Anaplasmataceae* est détectée dans des élevages (bovins, ovins, caprins) où la symptomatologie rétrocede lors de traitements à l'oxytétracycline. La spécificité et la sensibilité du système de diagnostic utilisé et sa capacité à identifier de nouvelles espèces offrent des perspectives pour l'étude de l'épidémiologie des *Anaplasmataceae* et permettront de mettre en évidence de nouveaux réservoirs.

Mots-clés : Anaplasmataceae, anaplasmoses, tiques, ovins, bovins, chèvres, Pyrénées-Atlantiques, Corse.

(1) Unité de recherches en maladies infectieuses et tropicales émergentes, UMR CNRS 7278, INSERM U1015 – IRD 198 – Aix Marseille Université, Marseille, France

(2) Clinique vétérinaire d'Amikuze, Béhasque, France

(3) Clinique vétérinaire de Lupino, Bastia, France

(4) Clinique vétérinaire Amalthea, Ghisonaccia, France

* Adresse de correspondance : Dr Bernard DAVOUST, URMITE, Faculté de médecine, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France

Tél. : + 33 (0) 4 91 32 43 75

Email : bernard.davoust@gmail.com

ABSTRACT

The intracellular bacteria Anaplasmataceae are transmitted by ticks both to animals and to man. The most important species for the economy and for health are *Anaplasma* spp. (*A. marginale*, *A. phagocytophilum*...) and *Ehrlichia* spp. (*E. canis* and *E. ruminantium*...). Whilst current means of diagnosis are indispensable they could be improved. We therefore propose a global approach which will identify most of the species of Anaplasmataceae. It is based on the genetic code ARNr 23S and involves dividing a qPCR into a standard PCR and sequencing. This specificity has been tested, verified and demonstrated in blood samples from ruminants and ticks. Sheep (from Atlantic-Pyrenees) suspected of being infected, were shown to be carriers of *A. ovis* and their ticks (*Rhipicephalus bursa*) had *A. ovis*, *A. phagocytophilum* and also a new species of ehrlichia. In Corsica, a strong incidence of Anaplasmataceae was detected in the blood of cattle, sheep and goats in which symptoms antedated treatment with oxytetracycline. The specificity and sensibility of this method of diagnosis, as well as its ability to detect new species, are advantageous for further studies of Anaplasmataceae, and facilitate the search for new sources of infection.

Key words: Anaplasmataceae, anaplasmosis, ticks, sheep, cattle, goats, Atlantic-Pyrenees, Corsica.

INTRODUCTION

Les Anaplasmataceae sont des bactéries intracellulaires appartenant au sous-groupe des alpha-protéobactéries et incluses dans l'ordre des Rickettsiales. La famille des Anaplasmataceae comprend les genres *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Wolbachia* spp. et *Neorickettsia* spp. À l'exception des *Wolbachia* spp. qui sont des endosymbiotes, notamment des filaires, les autres genres sont impliqués dans des maladies communes à l'homme et à l'animal (Tête *et al.* 2013). L'impact mondial des infections dues aux Anaplasmataceae est illustré par les cas humains et animaux rapportés depuis un siècle et par l'identification de nouvelles espèces pathogènes. Ainsi, durant les deux dernières décennies, de nombreuses études rapportent l'émergence de ces agents pathogènes chez l'homme et les animaux domestiques (Doudier *et al.* 2010). Actuellement, ils sont connus comme responsables de maladies infectieuses transmises par les tiques chez l'homme (Dumler *et al.* 2001) et les animaux (Kocan *et al.* 2003 ; Kocan *et al.* 2015). Ils diffèrent d'une zone géographique à l'autre et peuvent changer, au fil du temps, en raison de nombreux facteurs. L'émergence résulte soit de l'importation d'un agent pathogène dans une région indemne, soit de la recrudescence d'un pathogène constamment présent dans la région avec une faible prévalence, souvent liée à un changement d'hôte et à l'adaptation à une espèce plus sensible ou encore de l'identification d'une nouvelle espèce inconnue et responsable d'une infection (Harrus *et al.* 2005).

Des changements démographiques, socio-économiques et environnementaux facilitent le déclenchement de telles émergences. Ils ne contribuent pas à l'apparition de nouveaux pathogènes ou d'une nouvelle maladie, mais jouent un rôle important en portant le nombre des cas d'infection à un niveau où leur reconnaissance est possible (Paddock *et al.* 2003). L'intervention humaine sur l'écosystème, pour créer des espaces constructibles ou des zones de pâturages, contribue à l'extension de l'habitat des réservoirs et des vecteurs

et augmente le risque de contact humain et animal avec des foyers naturels d'infection lors des activités professionnelles ou de loisir. Les forêts périphériques, à des stades intermédiaires de régénération, permettent des modifications de la diversité des hôtes vertébrés et ainsi de la prévalence des infections par *Anaplasma phagocytophilum* (Foley *et al.* 2009). Chez l'homme, l'émergence d'*Ehrlichia chaffeensis* aux États-Unis d'Amérique est expliquée par l'association des facteurs de changements environnementaux à l'augmentation de la taille, de la longévité et de l'état immunitaire de la population humaine (Ismail *et al.* 2010).

Chez les animaux, la persistance de l'infection permet à *A. marginale*, agent causal de l'anaplasmosé bovine, de maintenir le cycle épidémiologique en l'absence de transmission transovarienne chez les tiques (Suarez *et al.* 2011). L'adaptation à de nouveaux hôtes constitue une stratégie pour trouver des réservoirs alternatifs en l'absence de réservoir principal à la suite de changements écologiques (Kocan *et al.* 2004). Par exemple, les moutons, dans certains contextes, peuvent servir de réservoir principal d'*A. phagocytophilum* en l'absence d'autres hôtes importants comme les rongeurs ou les cerfs (Ogden *et al.* 2002).

La complexité de l'épidémiologie des infections par les Anaplasmataceae limite l'évaluation de leur implication précise dans les maladies humaines et animales. La recherche de nouveaux réservoirs et/ou de nouvelles espèces sensibles est donc d'actualité. Elle permet de préciser la cartographie de l'extension de ces pathogènes, ce qui conduit à identifier des populations à risque. Dans ce travail, on s'est focalisé sur l'identification et la caractérisation moléculaire d'Anaplasmataceae, par la mise en œuvre de nouveaux outils de dépistage et à partir de prélèvements de sang de ruminants et de tiques en provenance de deux régions de France où des foyers d'infections à transmission vectorielle ont été suspectés par des vétérinaires praticiens.

NOUVEAUX OUTILS DE DÉPISTAGE DES ANAPLASMATACEAE

La biologie moléculaire a aujourd'hui remplacé, pour une bonne part, l'observation microscopique de frottis colorés pour mettre en évidence les anaplasmes et les ehrlichiae dans le sang. L'amplification génique par polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode beaucoup plus sensible et spécifique. Pour les premiers dépistages des échantillons d'origine animale, nous avons utilisé des amorces amplifiant un fragment de 345 paires de bases (pb) du gène codant l'ARN ribosomique (ARNr) 16S des *Anaplasmataceae* (Parola *et al.* 2003). Mais au fur et à mesure de l'incrémentation de la base de données GenBank par des séquences d'ARNr 16S des *Anaplasmataceae*, la séquence ciblée par ces amorces a perdu en spécificité : le fragment de 345 bp n'était plus discriminatif pour distinguer les espèces proches comme par exemple *A. marginale* et *A. centrale*. Pour pallier cet inconvénient, nous avons utilisé les séquences d'*Anaplasmataceae* disponibles dans GenBank, pour concevoir un nouvel outil de diagnostic, basé sur le séquençage d'un long fragment du gène codant pour l'ARNr 23S. Avant de réaliser le séquençage, nous couplons une PCR quantitative (qPCR), ou PCR en temps réel, pour le dépistage primaire et la mise en évidence d'échantillons positifs, à une PCR standard réalisée avec deux autres jeux d'amorces (Dahmani *et al.* 2015a) (**tableau 1**). Les amorces de la qPCR ARNr 23S amplifient un fragment de 169 bp, alors que les deux jeux d'amorces utilisés pour la PCR standard amplifient, respectivement, un fragment de 493 pb et un de 693 pb. La validation de la spécificité de ce nouvel outil de diagnostic est faite en utilisant de l'ADN d'*A. phagocytophilum*, d'*A. marginale*, d'*A. centrale* et d'*A. ovis*, isolé à partir du sang d'un mouton malade, au Sénégal (Djiba *et al.* 2013). Nous avons aussi testé de l'ADN d'*A. platys* provenant d'un prélèvement de sang d'un chien malade dans le Gard, réalisé par le Dr Jean-Pierre Beaufils (courtoisie du Pr Luc Chabanne, VetAgro Sup Lyon). Cette séquence est nommée *A. platys* chien de France, en particulier dans les arbres phylogénétiques. Les ADN d'autres bactéries ont été analysés avec cette nouvelle PCR : *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ruminantium*, *Neorickettsia sennetsu*, *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia raoultii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus fae-*

cius, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus oralis*, *Citrobacter koseri*, *Haemophilus influenzae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Gardnerella vaginalis*, *Stenotrophomonas maltophilia* et de l'ADN humain. Jusqu'à présent, nous n'avons pas récupéré d'ADN d'*Anaplasma bovis* pour compléter nos données. Chaque ADN bactérien est testé d'abord par qPCR, puis par les jeux d'amorces de la PCR standard et enfin séquencé, si un amplicon est obtenu, pour en vérifier la spécificité. L'objectif est de vérifier que le système de diagnostic choisi n'amplifie que de l'ADN de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*.

Les réactions d'amplification de la qPCR sont effectuées sur un thermocycleur (CFX96 Touch Detection System, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) dans les conditions suivantes : activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 15 min, suivie de 40 cycles de 10 s de dénaturation à 95°C, l'hybridation et l'extension à 60°C. Les amplifications pour les PCR standard sont réalisées sur un autre thermocycleur (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) avec les conditions suivantes : activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 15 min, suivie de 40 cycles de dénaturation à 95°C, l'hybridation à 60°C pendant 1 min, l'extension à 72°C pendant 1 min, suivie d'un cycle d'extension finale à 72°C pendant 5 min. Enfin, les réactions sont refroidies à 15°C. L'eau distillée est utilisée comme témoin négatif alors que de l'ADN d'*Anaplasma phagocytophilum* de notre laboratoire est inclus dans chaque réaction comme témoin positif. Après migration sur gel d'agarose, les cas positifs sont séquencés sur Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer, en utilisant la trousse BigDye® Terminator (Perkin-Elmer) et en suivant les instructions du fabricant. Les séquences obtenues sont assemblées sur ChromasPro 1.7 (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australie), les fautes sont corrigées et les séquences d'amorces sont coupées. Les séquences sont comparées individuellement, en cherchant dans la base de données GenBank, par une approche BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En utilisant ClustalW, les séquences des bactéries identifiées sont alignées entre elles et avec d'autres séquences ARNr 23S d'*Anaplasmataceae* de référence disponibles sur GenBank. Les distances génétiques sont calculées par maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*) pour construire un arbre phylogénétique en utilisant le logiciel MEGA 7 (Tamura *et al.* 2007). Les branches internes de l'arbre sont construites par la technique statistique du bootstrap avec 1000 itérations.

Après amplification par la qPCR basée sur le gène ARNr 23S, le nouvel outil de dépistage n'amplifie que de l'ADN d'*A. phagocytophilum*, d'*A. ovis*, d'*A. platys*, d'*A. centrale*, d'*A. marginale*, d'*E. canis*, d'*E. ruminantium*, d'*N. sennetsu* et de *N. risticii* parmi les différents ADN testés. L'ADN des autres bactéries testées n'est pas amplifié. De plus, les résultats sont reproductibles en utilisant les deux jeux d'amorces basés sur le gène ARNr 23S (**tableau 1**). Chaque amplicon est

Type d'amorces	Nom des amorces	Séquences (5'-3')
Jeu 1 standard	Ana23S-212f	ATAAGCTGCGGGGAATTGTC
	Ana23S-753r	TGCAAAGGTACGCTGTCC
Jeu 2 standard	Ana23S-212f	ATAAGCTGCGGGGAATTGTC
	Ana23S-908r	GTAACAGGTTCCGGTCTCCA
PCR en temps réel	TtAna-f	TGACAGCTACCTTTGTCAT
	TtAna-r	GTAACAGGTTCCGGTCTCCA
	Sonde : TtAna-s	6-FAM- GGATTAGACCCGAAACCAAG -TAMRA
16S	Ehr-16S-D	GGTACCYACAGAAGAAGTCC
	Ehr-16S-R	TAGCACTCATCGTTACAGC

Tableau 1 : Séquences des jeux d'amorces ARNr 23S utilisés.

séquence et les résultats révèlent une amplification spécifique pour chaque espèce bactérienne. Pour toutes les amplifications, le témoin positif a toujours été positif et le témoin négatif, toujours négatif. Les résultats de la qPCR sont parfaitement corrélés à ceux de la PCR standard.

CAS D'INFECTIONS D'OVINS ET DE LEURS TIQUES AU PAYS BASQUE

Des tiques et du sang sont collectés, en 2013, dans un élevage d'ovins du Pays basque, par un vétérinaire praticien (FR) qui a suspecté un foyer d'infection transmise par des tiques. L'élevage de type traditionnel est situé sur la commune de Lantabat dans les Pyrénées-Atlantiques (N 43° 15' 2.88", E 1° 7' 24"). La zone est boisée et entourée de collines (300 m d'altitude). Le troupeau est composé de trois cents brebis laitières de la race « Manech tête rousse » qui pâturent toute l'année. Un syndrome de fièvre, répondant au traitement par les tétracyclines, a été observé chez certaines brebis. L'examen hématologique montre une anémie, une leucopénie et une baisse du nombre des thrombocytes. Des éleveurs dont deux troupeaux se mélangent lors de l'estive, notent que celui bénéficiant de deux traitements antiparasitaires externes (deltaméthrine) est plus fertile que celui qui ne reçoit qu'un traitement. Or l'infertilité et les avortements sont attribués à une maladie transmise par les tiques. Des éléments, pouvant faire penser à des anaplasmes, sont effectivement observés sur des frottis sanguins. Réalisant des PCR (gène *ms*) et des séquençages à partir du sang de 30 jeunes brebis, nous observons 100% d'infection sanguine par *A. ovis* (99,7% d'homologie avec les séquences déposées dans GenBank).

Des tiques adultes, partiellement ou complètement gorgées, sont recueillies sur des brebis de ce troupeau. Leur identification morphologique est réalisée avec une loupe binoculaire par un entomologiste expérimenté (Jean-Michel Berenger). Leur classification (famille, genre, espèce) est menée à l'aide de clés taxonomiques et de tableaux morphométriques (Estrada-Peña et al. 2004 ; Walker et al. 2000). Les 76 tiques collectées sont toutes identifiées comme appartenant à l'espèce *Rhipicephalus bursa* : 60 mâles et 16 femelles (figure 1). Le dépistage par la qPCR 23S montre que la moitié d'entre elles (38/76)

contient de l'ADN d'*Anaplasmataceae*. Tous les échantillons d'ADN positifs sont amplifiés par une PCR standard utilisant les mêmes amorces (tableau 1). Les amplicons sont ensuite séquencés et comparés aux séquences déposées dans la base de données BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). On montre la présence d'*Anaplasma phagocytophilum* chez 17 tiques sur 38 avec 100% d'homologie avec la souche canine CP006618. Six tiques sur 38 contiennent de l'ADN d'*A. ovis* (100% homologue à la souche ovine sénégalaise KM021411) (figure 2). Par ailleurs, 15/38 tiques sont porteuses d'ADN d'une nouvelle espèce d'*Ehrlichia* sp., proche d'*Ehrlichia muris* (96,3% d'homologie avec la souche NR121968). Sur un arbre phylogénétique (figure 2), cette nouvelle *Ehrlichia* sp. se place avec les espèces du groupe d'*E. canis*/*E. chaffeensis*, tout en formant une branche distincte. Pour confirmer ce résultat, nous pratiquons une seconde PCR basée sur le gène codant une protéine du choc thermique : *groEL*. Elle permet avec des amorces spécifiques de dépister les infections par *Ehrlichia* spp. Nous obtenons les mêmes résultats, l'espèce la plus proche est *E. ewingii* (AF195273) avec 93,9% d'homologie tout en restant dans le groupe *E. canis*. Nous avons provisoirement nommé cette nouvelle bactérie des tiques d'ovins *Candidatus Ehrlichia urmitei Rh.bur02* (figure 2).

CAS D'INFECTIONS EN CORSE

Infections de bovins en Haute Corse

En 2015, une mortalité anormale est constatée dans un troupeau de bovins situé à Centu Mezzini (N 42° 34'58.242"E 8° 58' 38.015"), localité de La Balagne, région de Haute-Corse, située au nord-ouest de l'île. Ces bovins de race locale (croisés limousins/charolais) sont très anémiés (muqueuses blanches). Une infection transmise par les tiques ayant été suspectée par le vétérinaire (BF), du sang de 14 bovins (11 femelles et trois mâles) est recueilli sur tube EDTA. Le dépistage pour la recherche des *Anaplasmataceae* est effectué en ciblant le gène codant l'ARNr 23S. En utilisant les amorces et la sonde de la qPCR, les résultats montrent que 100% (14/14 des bovins) sont porteurs d'ADN de bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*.

Infections d'ovins et de caprins sur la côte orientale

Dans la commune de Ghisonaccia (N 42° 1' 3" N, E 9° 24' 20"), située dans la Plaine d'Aléria, en 2015, nous avons réalisé des prélèvements de sang chez 220 brebis de race ovine corse, en apparente bonne santé, âgées de un à sept ans, sédentaires et, selon l'éleveur, peu parasitées par des tiques. Les résultats de la qPCR ciblant le gène codant

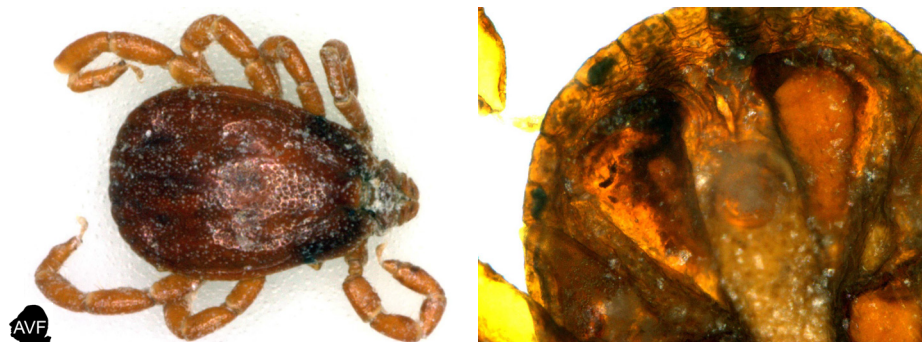


Figure 1 : Tique *Rhipicephalus bursa* recueillie sur une brebis du Pays basque (mâle, face dorsale et détail des larges plaques adanales) (photos Jean-Michel Bérenger).

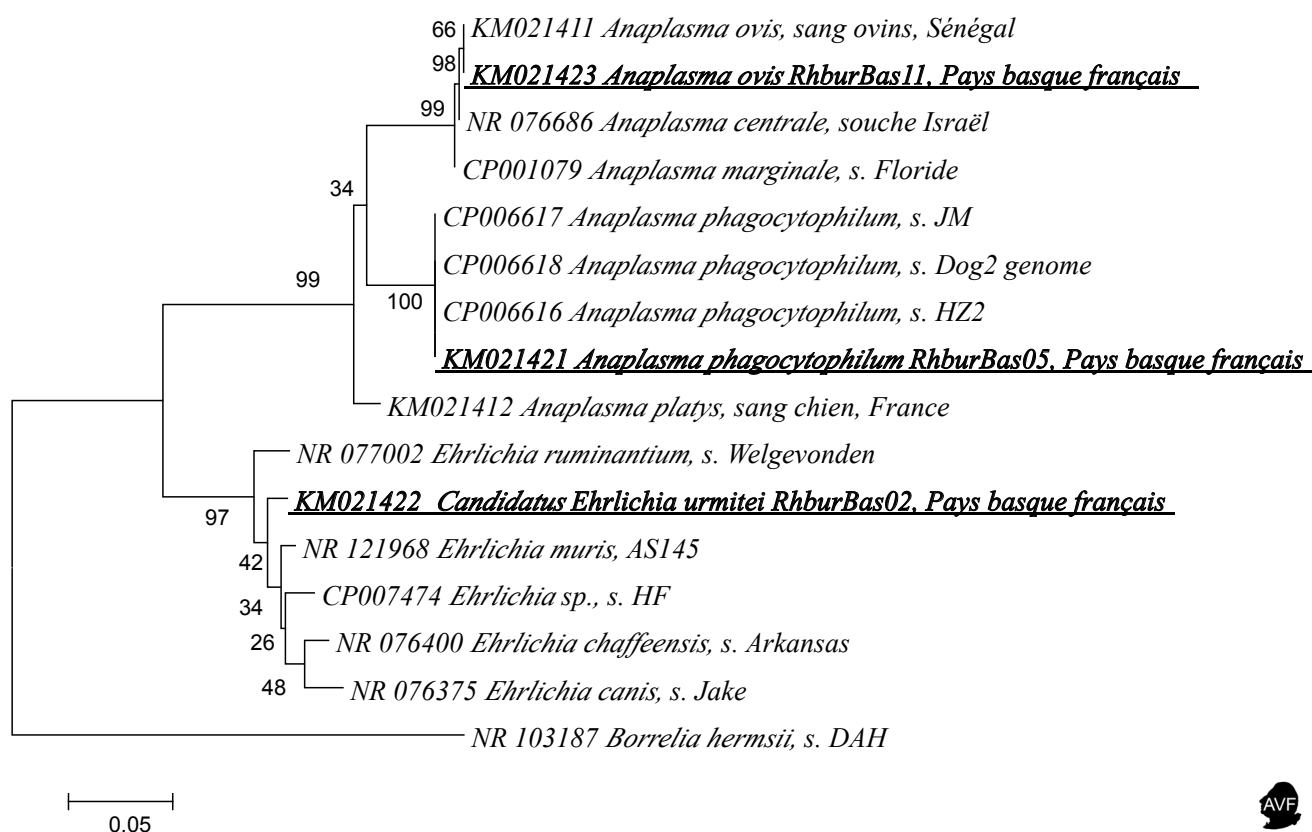


Figure 2 : Arbre phylogénétique montrant la position d'*A. phagocytophilum*, *A. ovis* et *Candidatus Ehrlichia urmitei* amplifié de *R. bursa* dans cette étude par rapport à d'autres espèces d'Anaplasmataceae. L'inférence phylogénétique est obtenue à l'aide de MEGA 6. Les séquences du gène 23S sont alignées à l'aide de CLUSTAL W. L'arbre génétique est construit en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance, suivant le modèle Kimura 2 paramètres. Les numéros d'accès de GenBank sont indiqués au début de chaque séquence et l'origine géographique de l'espèce est indiquée, si disponible, à la fin. La probabilité uniforme est utilisée pour modéliser les différences de taux d'évolution entre les sites. L'arbre initial pour la recherche heuristique est obtenu automatiquement en appliquant la méthode Parcimonie maximum. Les branches internes des arbres sont évaluées par la méthode de bootstrap avec 1000 itérations. Il y a un total de 485 positions pour l'ensemble final des données. La barre d'échelle représente une divergence des séquences nucléotidiques de 5%.

l'ARNr 23S montrent que 112 brebis (50,9%) sont infectées par des *Anaplasmataceae*. Des prélèvements sont aussi effectués (par le vétérinaire SF) chez cinq chèvres, de trois à cinq ans : elles font partie d'un troupeau d'une cinquantaine de têtes vivant dans le maquis de la Plaine orientale, présentant des signes cliniques (anémie, chute de la production laitière) qui rétrocèdent au traitement par l'oxytétracycline. Toutes les cinq sont positives au test et sont aussi infectées.

DISCUSSION

Développement d'un nouvel outil diagnostique

Nos premiers travaux réalisés en utilisant le système de l'ARNr 16S EHR ont permis d'orienter les recherches. Mais ce système manque de discrimination sur GenBank essentiellement du fait qu'il n'amplifie qu'un amplicon de 350 pb. L'expérimentation d'une nouvelle méthode, conçue à partir de l'unité ARNr 23S, a montré une spécificité et une sensibilité supérieures au système ARNr 16S EHR. En effet, l'unité ARNr 23S des *Anaplasmataceae* est assez conservée, ce qui permet de créer un

système de diagnostic large, et offre la possibilité d'identifier de nouvelles espèces. Ce système est composé de deux jeux d'amorces, un jeu qui amplifie un amplicon de 500 pb et l'autre un amplicon de 700 pb. Nous avons aussi créé un système en temps réel qui permet de dépister les échantillons pour identifier les cas positifs avant de poursuivre par le séquençage. Les deux systèmes, en temps réel et en PCR standard, sont concordants entre eux.

Les *Anaplasmataceae* sont connues comme des agents infectieux d'importance en médecine vétérinaire. Différentes espèces ont été isolées et caractérisées chez l'homme, les animaux domestiques et les tiques (Dumler *et al.* 1995 ; Perez *et al.* 1996 ; Bell-Sakyi, 2004 ; Zweygarth *et al.* 2013). Le développement des nouveaux outils de diagnostic contribue à la détection de l'émergence de nouvelles espèces de ces bactéries dans une région donnée et permet de mieux comprendre leur écologie et l'épidémiologie des infections qu'elles entraînent (Paddock *et al.* 2003). Le diagnostic des *Anaplasmataceae* est proposé en utilisant les gènes *rrs*, *rri*, *rpoB*, *gltA* et *groESl* (Brouqui *et al.* 2007). La plupart de ces systèmes ont besoin d'amplifier un

gène complet (*rrs*, *groESL*) pour être plus discriminatifs entre les espèces de la famille des *Anaplasmataceae* ; d'autres sont spécifiques pour une ou un groupe d'espèces d'*Anaplasmataceae*. Il est aussi proposé d'effectuer d'autres étapes d'amplification en PCR nichée mais cela conduit souvent à des contaminations et à des amplifications non spécifiques (Park *et al.* 2005 ; Viale *et al.* 1994).

Par notre méthode, nous pouvons amplifier la plupart des espèces d'*Anaplasmataceae* reconnues jusqu'à présent, à l'exception d'*A. bovis*, dont nous n'avons pas d'ADN. Elle cible toutes les espèces d'*Anaplasmataceae* en réalisant une seule qPCR suivie de séquençage, sans recours à des méthodes supplémentaires. Elle nous a déjà permis de décrire des infections par *A. platys* et *E. canis* à partir d'échantillons en provenance d'Algérie et de la Guyane française (Dahmani *et al.* 2015b,c). Elle est utilisée en routine au laboratoire pour le diagnostic des infections par *Anaplasmataceae* et la description des nouvelles espèces (Dahmani *et al.* 2015a). Nous estimons qu'après standardisation du protocole, il sera possible de la mettre au service des praticiens : un diagnostic rapide peut-être rendu en moins de 24 heures, leur permettant de mettre en œuvre rapidement le traitement adéquat dans les élevages atteints.

Mise en œuvre sur le terrain

Au Pays basque

Nous avons identifié des *Anaplasmataceae* chez 38/76 (50%) des tiques *R. bursa*, récoltées sur les 30 brebis prélevées au Pays basque. Il s'agit d'*A. ovis*, d'*A. phagocytophilum* et d'une nouvelle espèce : *Candidatus Ehrlichia urmitei* Rh.bur05. Les analyses conduites en utilisant un deuxième gène, *groEL*, ont confirmé la découverte de cette nouvelle bactérie (figure 2). L'espèce la plus proche, dans la base de données pour l'ARNr 23S, est *E. muris*, alors que dans la base de *groEL*, cette espèce est plutôt proche d'*E. ewingii*. Cette différence est due au fait que la séquence de l'ARNr 23S d'*E. ewingii* n'est pas disponible dans GenBank. D'autres investigations sont, ici encore, nécessaires pour évaluer le potentiel infectieux de cette ehrlichia chez les ovins, les autres animaux et l'homme.

Sur les échantillons en provenance du Pays basque français, nous avons aussi identifié *A. ovis* chez les 30 jeunes brebis (100%) dépistées. *A. ovis* est rapportée, pour la première fois en France, en 1935 chez des ovins (Cuille & Chelle, 1936). En 2007, un cas humain d'infection clinique par *A. ovis* est décrit à Chypre (Chochlakis *et al.* 2010). L'infection expérimentale des ovins par *A. ovis* induit des changements biochimiques et hématologiques (Ahmadi-Hamedani *et al.* 2013 ; Ciani *et al.* 2013). La gravité de l'infection dépend de la souche d'*A. ovis* et de la race des ovins, bien que l'infection des érythrocytes n'excède pas 2 à 3% (Hornok *et al.* 2007 ; Ciani *et al.* 2013). Les vecteurs potentiels d'*A. ovis* rapportés dans la littérature sont : *R. bursa*, *Melophagus ovinus* et *Lipoptena cervi* (Hornok *et al.* 2011 ; Renneker *et al.* 2013). Néanmoins, la prévalence des tiques contenant de l'ADN d'*A. phagocytophilum* de 22%

(17/76) dans notre étude, est relativement surprenante. En effet, le principal vecteur d'*A. phagocytophilum* en Europe est *Ixodes ricinus*, tique largement distribuée en Europe centrale et au Royaume Uni (Stuen *et al.* 2013). La présence d'*A. phagocytophilum* a déjà été rapporté au Pays basque chez les ovins mais jamais chez les tiques d'ovins *R. bursa* (Razimbaud 2006 ; Joncour *et al.* 2008), bien que *R. bursa* ait été signalée chez des ovins au Pays basque espagnol (Estrada-Peña *et al.* 1990). La prévalence observée dans ces tiques peut être le reflet de la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* contenu dans le repas sanguin. La capacité vectorielle de *R. bursa* pour *A. phagocytophilum* nécessite donc d'être confirmée par des travaux supplémentaires.

Chez les ovins, en plus d'*A. ovis*, *A. phagocytophilum* provoque une maladie, appelée : fièvre due aux tiques (TBF pour *Tick-Borne Fever* des anglo-saxons). Au moins 300 000 cas d'ehrlichiose granulocytaire ovine sont rapportés, chaque année au Royaume Uni (Dugat *et al.* 2015). La maladie est accompagnée d'une forte fièvre, d'une neutropénie, de la réduction de la production laitière et d'avortements chez les animaux non immunisés (Lillini *et al.* 2006). Ces symptômes sont dus au fait qu'un ovin infecté développe une surinfection par *Staphylococcus aureus* ou bien d'autres infections comme par exemple la pasteurellose ou la listériose (Dugat *et al.* 2015).

En Corse

Nous avons identifié des infections à *Anaplasmataceae* chez 100% des bovins (14/14), 51% des ovins (112/220) et 100% des caprins (5/5) testés. Ce résultat partiel nécessite d'autres investigations, en utilisant notre nouvelle méthode, afin de déterminer les espèces bactériennes concernées. En Europe, l'ehrlichiose/anaplasmose bovine est principalement due à *A. phagocytophilum* (Stuen *et al.* 2013). Des enquêtes de prévalence, relatives à l'ehrlichiose granulocytaire due à *A. phagocytophilum*, sont menées depuis 1999 dans des élevages d'abord en Bretagne, puis dans de nombreux départements, à l'initiative de Guy Joncour avec l'appui des Groupements techniques vétérinaires (Matsumoto *et al.* 2006). La sérologie, par immunofluorescence indirecte, a précédé l'emploi, en biologie moléculaire, des trousse PCR en temps réel (Ana Pha, Adiavet®, France). En 2013, le réseau d'épidémiologie mis en place signale 5000 élevages bovins affectés dans 66 départements (le sud-est étant épargné) (Joncour, 2015). Contrairement aux souches d'*A. phagocytophilum* américaines, les souches européennes sont pathogènes pour les bovins (Stuen *et al.* 2013 ; Chastagner *et al.* 2014). Par ailleurs, d'autres espèces d'*Anaplasmataceae* sont impliquées dans l'anaplasmose bovine, il s'agit d'*A. marginale*, d'*A. centrale* et d'*A. bovis*. *A. marginale* est largement distribuée de la région méditerranéenne (Ceci *et al.* 2014), jusqu'à la latitude de la Hongrie, de l'Autriche et de la Suisse (Hornok *et al.* 2012). *A. centrale* est décrite chez des bovins en Sicile et chez des chevrettes en Espagne (Ceci *et al.* 2014), alors qu'*A. bovis* est rapportée en Italie et en Espagne (Ceci *et al.* 2014 ; Zobba *et al.* 2014).

CONCLUSION

Nos résultats préliminaires apportent des informations originales concernant la répartition des infections à *Anaplasmataceae* dans le sud de la France. Ainsi, nous confirmons l'émergence mondiale de ces agents pathogènes, associée à leur capacité d'adaptation à de nouveaux hôtes. La spécificité et la sensibilité de la méthode originale utilisée et sa capacité à identifier de nouvelles espèces offrent des perspectives pour l'étude de l'épidémiologie des *Anaplasmataceae*, en permettant d'identifier de nouveaux réservoirs. Les taux de prévalence des infections par *Anaplasmataceae* que nous avons observés nous conduisent à penser que les animaux domestiques ne constituent que des hôtes de « maintien » du cycle épidémiologique. De futures études doivent aborder la question de la capacité d'adaptation des *Anaplasmataceae* aux nouveaux hôtes et le rôle épidémiologique joué par les vertébrés et les arthropodes. Actuellement, il est nécessaire que les enquêtes épidémiologiques se focalisent aussi sur le rôle de la faune sauvage comme réservoir d'*Anaplasmataceae*. Ces recherches sur la faune permettront de mieux connaître la dynamique par laquelle les animaux domestiques jouent le rôle de réservoir alternatif et les tiques celui d'hôtes intermédiaires entre les deux.

À l'heure actuelle, les cultures cellulaires offrent la possibilité d'étudier le phénomène de l'émergence dans son aspect global, définie par les phénomènes d'adaptation, de prolifération puis de maintien à long terme. Il existe plusieurs systèmes cellulaires issus de lignées de tiques ou bien de cellules endothéliales, permettant de mettre en place des modèles expérimentaux *in vitro*. Ces modèles, associés au séquençage à haut débit NGS (*Next Generation Sequencing*), permettront de clarifier les faits observés sur le plan génétique.

Les animaux constituent des sentinelles qui témoignent de la circulation des *Anaplasmataceae* et assurent leur cycle épidémiologique. L'homme se définit comme un hôte, la plupart de temps, « accidentel ». Peu d'études se sont intéressées à l'évaluation de l'impact économique des infections par *Anaplasmataceae* sur l'élevage du bétail, surtout dans les pays méditerranéens et les pays du Sud. La plupart des recherches concernent la détection des bactéries et leur impact sur la santé de l'homme et des animaux domestiques. Notre travail constitue une « étude pilote » qui permet d'attirer l'attention des autorités compétentes sur cette question.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmadi-Hamedani M, Fathi E, Sani RN. Comparison of selected biochemical parameters between naturally infected and non-infected goats with *Anaplasma ovis*. *Comp Clin Pathol*. 2013; 23:989–92.
- Bell-Sakyi L. *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four ixodid tick genera. *J Comp Pathol*. 2004; 130:285–93.
- Brouqui P & Matsumoto K. Bacteriology and phylogeny of *Anaplasmataceae*. In: Raoult D, Parola P, editors. *Rickettsial diseases*. New York, NY: Taylor & Grancis Group LLC, 2007, p. 179–198.
- Ceci L, Iarussi F, Greco B, Lacinio R, Fornelli S, Carelli G. Retrospective study of hemoparasites in cattle in Southern Italy by reverse line blot hybridization. *J Vet Med Sci*. 2014; 76:869–75.
- Chastagner A, Dugat T, Vourc'h G, Verheyden H, Legrand L, Bachy V *et al*. Multilocus sequence analysis of *Anaplasma phagocytophilum* reveals three distinct lineages with different host ranges in clinically ill French cattle. *Vet Res*. 2014; 45:114.
- Chochlakakis D, Ioannou I, Tselentis Y, Psaroulaki A. Human anaplasmosis and *Anaplasma ovis* variant. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16(6):1031-2.
- Ciani E, Alloggio I, Petazzi F, Pieragostini E. Looking for prognosticators in ovine anaplasmosis: discriminant analysis of clinical and hematological parameters in lambs belonging to differently susceptible breeds experimentally infected with *Anaplasma ovis*. *Acta Vet Scand*. 2013; 55:71.
- Cuille J & Chelle PL. L'anaplasmosé du mouton en France. *Rev Gén Méd Vét*. 1936; 45:129-40.
- Dahmani M, Davoust B, Benterki MS, Fenollar F, Raoult D, Mediannikov O. Development of a new PCR-based assay to detect *Anaplasmataceae* and the first report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattles from Algeria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2015a; 39:39-45.
- Dahmani M, Loudahi A, Mediannikov O, Fenollar F, Raoult D, Davoust B. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015b; 6(2):198-203.
- Dahmani M, Marié JL, Mediannikov O, Raoult D, Davoust B. First Identification of *Anaplasma platys* in the blood of dogs from French Guiana. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2015c; 15(2):170-2.
- Djiba ML, Mediannikov O, Mbengue M, Thiongane Y, Molez JF, Seck MT *et al*. Survey of *Anaplasmataceae* bacteria in sheep from Senegal. *Trop Anim Health Pro*. 2013; 45(7):1557-61.
- Doudier B, Olano J, Parola P, Brouqui P. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. *Vet Parasitol*. 2010; 167(2):149-54.
- Dumler JS, Chen SM, Asanovich K, Trigiani E, Popov VL, Walker H. Isolation and characterization of a new strain of *Ehrlichia chaffeensis* from a patient with nearly fatal monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(7):1704–11.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC *et al*. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Inter J Systematic Evol Microbiol*. 2001; 51(6):2145-65.
- Dugat T, Lagrée A, Maillard R, Boulouis HJ, Haddad N. Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015; 5:1–18.
- Estrada-Peña A, Dehesa V, Sánchez C. The seasonal dynamics of *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus bursa* and *Dermacentor marginatus*.

- tus (Acari: Ixodidae) on sheep of Pais Vasco (Spain). *Acarologia*. 1990; 31(1):17-24.
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species. Ed. Pub. University of Zaragoza, España, 2004, 131 p.
 - Foley JE, Nieto NC, Foley P. Emergence of tick-borne granulocytic anaplasmosis associated with habitat type and forest change in northern California. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 81(6):1132.
 - Harrus S & Baneth G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *Int J Parasitol*. 2005; 35(11):1309-18.
 - Hornok S, Elek V, de La Fuente J, Naranjo V, Farkas R, Majoros G *et al*. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet Microbiol*. 2007; 122:316–22.
 - Hornok S, de La Fuente J, Biró N, Fernández de Mera IG, Meli ML, Elek V *et al*. First molecular evidence of *Anaplasma ovis* and *Rickettsia* spp. in keds (Diptera: Hippoboscidae) of sheep and wild ruminants. *Vector Borne Zoon Dis*. 2011; 11:1319–21.
 - Hornok S, Micsutka A, Fernández de Mera IG, Meli ML, Gönözi E, Tánözos B *et al*. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Res Vet Sci*. 2012; 92:30–5.
 - Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med*. 2010; 30(1):261-92.
 - Joncour G. L'ehrlichiose granulocytaire ovine en France. *Bull Acad Vét France*. 2008; 161(2):131-8.
 - Joncour G. Ehrlichiose granulocytaire bovine : généralités, diagnostic et avortements tardifs, traitements et prévention. In « Maladies vectorisées par les tiques », Rencontres de Belle Ile en Mer, GTV Bretagne, 2015; 23-36.
 - Kocan KM, de La Fuente J, Guglielmono AA, Meléndez RD. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(4):698-712.
 - Kocan KM, de La Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitol*. 2004; 129(S1):S285-S300.
 - Kocan KM, de La Fuente J, Cabezas-Cruz A. The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Rev Sci Tech Of Int Epiz*. 2015; 34(2):577-86.
 - Lillini E, Macri G, Proietti G, Scarpulla M. New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1081:360–70.
 - Matsumoto K, Joncour G, Davoust B, Pitel PH, Chauzy A, Collin E *et al*. *Anaplasma phagocytophilum* infection in cattle in France. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1078:491-94.
 - Ogden NH, Casey ANJ, French NP, Bown KJ, Adams, JDW, Woldehiwet Z. Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep 'carriers' to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks. *Parasitol*. 2002; 124(2):127-36.
 - Perez M, Rikihisa Y, Wen B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:2133–9.
 - Paddock CD & Childs JE. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16:37–64.
 - Park HS, Lee JH, Jeong EJ, Park TK, Kim TY, Chae JS *et al*. Differentiation of *Anaplasmataceae* through partial groEL gene analysis. *Microbiol Immunol*. 2005; 49:655–62.
 - Parola P, Cornet JP, Sanogo YO, Miller RS, Thien HV, Gonzalez JP *et al*. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(4):1600-8.
 - Razimbaud F. Evaluation de la participation d'*Anaplasma phagocytophilum* dans le syndrome « fièvres des montagnes » ou Belarjoa des ovins du Pays Basque français. Thèse Médecine Vétérinaire Toulouse; n°72, 2006, 103 p.
 - Renneker S, Abdo J, Salih DEA, Karagenc T, Bilgic H, Torina A *et al*. Can *Anaplasma ovis* in small ruminants be neglected any longer? *Transbound Emerg Dis*. 2013; 60 Suppl 2:105–12.
 - Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*, a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3:31.
 - Suarez CE & Noh S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet Parasitol*. 2011; 180(1):109-25.
 - Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007; 24(8):1596-9.
 - Tête H, Davoust B, Brouqui P. Ehrlichioses et anaplasmoses humaines. *EM-Consulte et EMC Maladies infectieuses* 2014; 11(4) [8-037-I-25].
 - Viale AM, Arakaki AK, Soncini FC, Ferreyra RG. Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *Inter J Syst Bacteriol*. 1994; 44: 527–33.
 - Walker JB, Keirans JE, Horak IG. The Genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2000, 643 pp.
 - Zobba R, Anfossi AG, Pinna P, Parpaglia ML, Dore GM, Chessa B, Spezzigu A *et al*. Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasma* spp. in Mediterranean ruminants reveal the presence of neutrophil-tropic strains closely related to *A. platys*. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80:271–80.
 - Zwegarth E, Shöl H, Lis K, Cruz AC, Thiel C, Silaghi C *et al*. *In vitro* culture of a novel genotype of *Ehrlichia* sp. from Brazil. *Transbound Emerg Dis*. 2013; 60:86–92.