

TRANSMISSION DE *BARTONELLA* SPP PAR LES TIQUES : MYTHE OU RÉALITÉ ?

ARE *BARTONELLA* SPECIES TICK-BORNE PATHOGENS ?

Par Muriel VAYSSIER-TAUSSAT⁽¹⁾ et Didier RAOULT⁽²⁾
(Communication présentée le 23 Juin 2016,
Manuscrit accepté le 18 Août 2016)

RÉSUMÉ

Les bactéries du genre *Bartonella* infectent un très grand nombre d'espèces de mammifères y compris l'Homme au sein desquelles elle est transmise par le biais de la piqûre d'un arthropode hématophage. Les tiques sont les premiers vecteurs d'agents pathogènes en Europe et de nombreuses études ont suggéré leur rôle dans la transmission de certaines espèces de *Bartonella*. Chez l'Homme, les symptômes causés par l'infection par *Bartonella* sont très divers et dépendent de l'espèce incriminée et de l'état immunitaire de la personne infectée. Dans l'étude présentée ici nous avons isolé des espèces de *Bartonella* d'origine animale chez des patients souffrant de symptômes chroniques non spécifiques dont l'apparition était consécutive à une piqûre de tiques. Parmi ces espèces certaines n'avaient jamais été isolées chez l'homme.

Mots-clés : *Bartonella*, zoonose, tiques.

ABSTRACT

Bacteria of the genus Bartonella infect a large number of species of mammals including humans through the bite of blood-sucking arthropod. Ticks are the primary vectors of pathogens in Europe and many studies have suggested their role in the transmission of certain species of Bartonella to humans or animals. In humans, the symptoms caused by Bartonella infection are diverse and depend on the species and the immune status of the infected person. In the present study, we isolated in patients suffering from chronic non-specific symptoms secondary to tick bites animal specific Bartonella spp. Some of these had never been isolated from humans so far.

Key words: *Bartonella*, zoonosis, ticks.

INTRODUCTION

Durant ces vingt dernières années, un nombre croissant de bactéries appartenant au genre *Bartonella* a été identifié comme étant à l'origine d'une multitude de maladies humaines et animales, et plusieurs espèces de *Bartonella*, notamment *B. quintana*, sont considérées aujourd'hui comme des agents pathogènes émergents (Karem *et al.* 2000; Schroff 2010). Ce constat a donc déclenché un intérêt considérable auprès des chercheurs à l'égard de ces bactéries gram-négatif et intracellulaires facultatives. L'intensification des études portant sur les espèces de *Bartonella* a permis de découvrir que

ces microorganismes utilisent une stratégie unique pour coloniser leurs hôtes (Dehio, 2001; Seubert *et al.* 2002, Vayssier-Taussat *et al.* 2010) et qu'elles sont capables d'infecter une vaste diversité d'espèces de mammifères, comprenant plusieurs ordres : des primates, dont l'homme, des carnivores, des ongulés, des insectivores, des lagomorphes, des chiroptères et des rongeurs. Il est maintenant admis que chaque espèce de *Bartonella* est adaptée à un ou quelques hôtes réservoirs au sein desquels la bactérie établit une bactériémie intra-érythrocytaire pouvant persister plusieurs mois (Schulein *et al.*

(1) PhD, Directrice de Recherche à l'INRA, UMR Bipar, INRA ENVA ANSES, Equipe Vectotiq, Anses, 14 rue Pierre Curie, 94 700 Maisons-Alfort
Email : muriel.vayssier@vet-alfort.fr

(2) PhD, MD, Professeur IHU, Directeur de l'URMITE, URMITE CNRS, IRD, INSERM, 27 Bd Jean Moulin, 13 000 Marseille
Email : didier.raoult@gmail.fr

2001; Seubert *et al.* 2002). La transmission de ces bactéries d'hôte à hôte est assurée par des vecteurs arthropodes hématophages ou bien par contact direct avec un animal infecté (Billeter *et al.* 2008).

Les espèces appartenant au genre *Bartonella* sont incluses dans le phylum des alpha-proteobacteria et sont proches des bactéries du genre *Brucella*. À ce jour, une trentaine d'espèces de *Bartonella* ont été recensées. *B. quintana* et *B. bacilliformis* ont l'Homme pour seul hôte mammifère connu. Toutes les autres espèces infectent des animaux (carnivores, rongeurs et/ou ruminants, sauvages ou domestiques) mais peuvent être accidentellement transmises à l'Homme chez lequel elles provoquent des maladies dont les symptômes varient selon les espèces de bartonelles et l'état immunitaire de la personne infectée.

Les arthropodes hématophages jouent un rôle clé dans le cycle épidémiologique de l'infection par *Bartonella* spp. et chaque espèce est spécifiquement transmise par une ou quelques espèces d'arthropodes vecteurs (Billeter *et al.* 2008). Pour certaines espèces de *Bartonella* le vecteur est connu : la puce du chat pour *B. henselae*, le poux du corps et une espèce de phlébotome pour *B. quintana* et *B. bacilliformis*. Pour d'autres espèces de *Bartonella*, et bien qu'ils soient parfois suspectés, le(s) vecteur(s) n'ont pas été formellement identifiés.

Depuis longtemps les tiques sont suspectées être les vecteurs de certaines espèces de *Bartonella* spp. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence la présence d'ADN de *Bartonella* spp. chez des Ixodidae (appelées couramment tiques dures). Par exemple, nous avons récemment montré que plus de 15% des tiques prélevées dans les forêts ardennaises portaient de l'ADN de *B. henselae* (Moutailler *et al.* 2016). Nous avons préalablement montré que la tique *Ixodes ricinus*, vectrice d'une grande variété d'agents pathogènes et espèce la plus répandue en Europe, était capable de transmettre cette bactérie en condition de laboratoire sur un modèle d'infection artificiel *ex vivo* (Cotte *et al.* 2008). Enfin, de l'ADN appartenant à différentes espèces de *Bartonella* spp. a été mis en évidence dans le sang de patients ou d'animaux, après piqûre de tiques. Toutefois, aucun de ces nombreux travaux n'a, jusqu'ici, permis l'isolement de bactéries vivantes chez

les différents hôtes examinés (Breitschwerdt *et al.* 2007; Maggi *et al.* 2013). Ces travaux font par conséquent l'objet de beaucoup de controverse et malgré les nombreuses preuves indirectes de la transmission de *Bartonella* spp par les tiques, ce sujet est toujours fortement débattu. Dans l'étude présentée ici, nous avons entrepris d'isoler des bactéries du genre *Bartonella* dans le sang de patients se plaignant de symptômes chroniques divers apparaissant à la suite de piqûres de tiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Patients

Soixante-six patients séronégatifs pour la maladie de Lyme qui avaient consulté leur médecin pour des symptômes chroniques apparaissant après une morsure de tique ont été recrutés (**tableau 1**). Tous les patients vivaient à la campagne, où les tiques sont abondantes et où le contact avec des animaux sauvages est possible. Les patients ont indiqué qu'ils n'avaient pas subi de traitement antibiotique au cours des trois mois précédant l'étude et ont signé un consentement éclairé pour l'utilisation des échantillons à des buts de recherches. Le protocole d'étude a été entièrement approuvé par le comité d'éthique de l'Institut Fédératif de Recherche (Protocole numéro 48 référence 13-022-1). Pour chaque patient un échantillon de sang, prélevé en présence d'anticoagulant, a été utilisé pour tenter l'isolement de *Bartonella* spp. Soixante-dix donneurs de sang anonymes, en bonne santé et vivant à Paris, ont été utilisés comme groupe témoin de « personnes en bonne santé ».

Isolement de *Bartonella* spp.

Le sang de patients ou des donneurs sains a été directement étalé sur des boîtes de gélose au sang de mouton. Les boîtes ont été incubées pendant 45 jours à 35°C en présence de 5% de CO₂. La détection de la présence de colonies a été réalisée dès le septième jour de culture, puis successivement chaque semaine et jusqu'à 45 jours de culture. Le nombre d'unités formant colonies (UFC) a été compté et la bactériémie (nombre de colonies visualisées après mise en culture/ml de sang) a été

Case-patient/sex/age	<i>Bartonella</i> spp.	Tick bite date	Pets	Wild animal contact	Main complaints	Bacteremia
1/F/49	<i>B. henselae</i>	Multiple since 2008	Cats, dogs, horses	Rats, fish	Fatigue, muscle pain, headache	50 CFU/ml
2/M/58	<i>B. henselae</i>	2011	Birds, rabbits	No	Fatigue, muscle pain	70 CFU/ml
3/F/47	<i>B. henselae</i>	2012	Dog, hamster	No	Fatigue, generalized pain, insomnia	80 CFU/ml
4/F/45	<i>B. doshiae</i>	2009	No	No	Fatigue, blurred vision, arthralgia	50 CFU/ml
5/M/64	<i>B. tribocorum</i>	2012	Dog	Game animals (hunter)	Fatigue, muscle pain, headache	60 CFU/ml
6/F/40	<i>B. schoenbuchensis</i>	2011	No	No	Fatigue, muscle pain, fever	850 CFU/ml

Tableau 1 : Fiche descriptive des patients pour lesquels des souches de *Bartonella* ont été isolées à partir du sang, d'après Vayssier-Taussat *et al.* 2016.

calculée. Les cultures ont été considérées comme négatives lorsqu'aucune colonie n'a pu être identifiée après 45 jours de culture et ceci en l'absence de contamination.

Séquençage des souches isolées

Nous avons extrait l'ADN génomique de chaque souche isolée en utilisant le système EZ1 automatisé d'extraction (QIAGEN, Hilden, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. L'ADN génomique bactérien a ensuite été séquençé sur un séquenceur MiSeq en utilisant la trousse Nextera ADN XT et séquence (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

Les génomes ont été assemblés et les parties codantes et non codantes annotées (Vayssier-Taussat *et al.* 2016).

Identification des espèces isolées

Pour déterminer la classification taxonomique des isolats, nous avons utilisé comme décrit précédemment (La Scola *et al.* 2003), les séquences des gènes *gltA* et *rpoB*. Les séquences de gènes de chaque souche ont été comparées à celles des espèces de *Bartonella* publiées et validées. Ces critères classent un isolat au sein d'une espèce décrite s'ils partagent plus de 96% et 95,4% de similarité de séquence nucléotidique pour les gènes *gltA* et *rpoB* respectivement (La Scola *et al.* 2003). Dans notre étude, les séquences des gènes *gltA* (1316 paires de bases) et *rpoB* (4151 paires de bases) sont celles obtenues à partir des séquences génomiques totales.

Alignement des séquences et construction de l'arbre phylogénétique

L'arbre phylogénétique montrant les relations entre les six isolats de *Bartonella* a été construit de la manière suivante : les séquences nucléotidiques des gènes *rpoB* et *gltA* ont été alignées en utilisant le logiciel ClustalW (<http://www.clustal.org/clustal2/>), et l'arbre a été construit en utilisant le logiciel MEGA (<http://www.megasoftware.net>) et la stratégie du maximum de vraisemblance.

RÉSULTATS

Recherche de *Bartonella* à partir du sang de patients ayant subi une piqûre de tique

Des souches ont été isolées à partir d'échantillons de sang de six des 66 patients ayant signalé des symptômes chroniques après une mor-

sure de tique. En revanche, la totalité des échantillons provenant des 70 donneurs de sang du groupe de contrôle sont restés négatifs après 45 jours d'incubation. La bactériémie observée varie de 50 à 850 UFC/mL. Pour un patient (cas patient #2), nous avons eu accès à deux échantillons de sang qui ont été prélevés à un intervalle d'un mois. Des souches ont été cultivées à partir des deux échantillons, avec une bactériémie similaire (50 et 60 UFC/mL, respectivement), ce qui suggère une bactériémie chronique. Les patients testés positifs pour *Bartonella* (**tableau 1**) ont rapporté une morsure de tiques ayant eu lieu entre un et cinq ans avant que les échantillons sanguins aient été prélevés. Chacun d'entre eux vit à la campagne. Le principal symptôme de ces patients était une fatigue chronique intense, mais ils ont également rapporté d'autres symptômes tels que des maux de tête, des myalgies, des troubles de la vision (**tableau 1**).

Classification taxonomique des espèces isolées

Sur les 6 isolats obtenus tous appartenaient au genre *Bartonella* spp. Trois d'entre eux (MVT01, MVT02 et MVT03) appartenaient à l'espèce *B. henselae*. Les isolats MVT04, MVT05 et MVT07 appartenaient respectivement aux espèces *B. tribocorum*, *B. doshiae* et *B. schoenbuchensis* (**figure 1**). *B. henselae* est une espèce responsable de bactériémie asymptomatique chez les félidés. Elle est connue pour infecter accidentellement l'Homme. *B. tribocorum* et *B. doshiae* provoquent des bactériémies asymptomatiques chez les rongeurs et *B. schoenbuchensis* infecte les ruminants sauvages et domestiques. De 10 à 1 938 SNP ont été identifiés parmi les isolats de *B. henselae* MVT01, MVT02 et MVT03 et de 693 à 2093 SNP lorsque

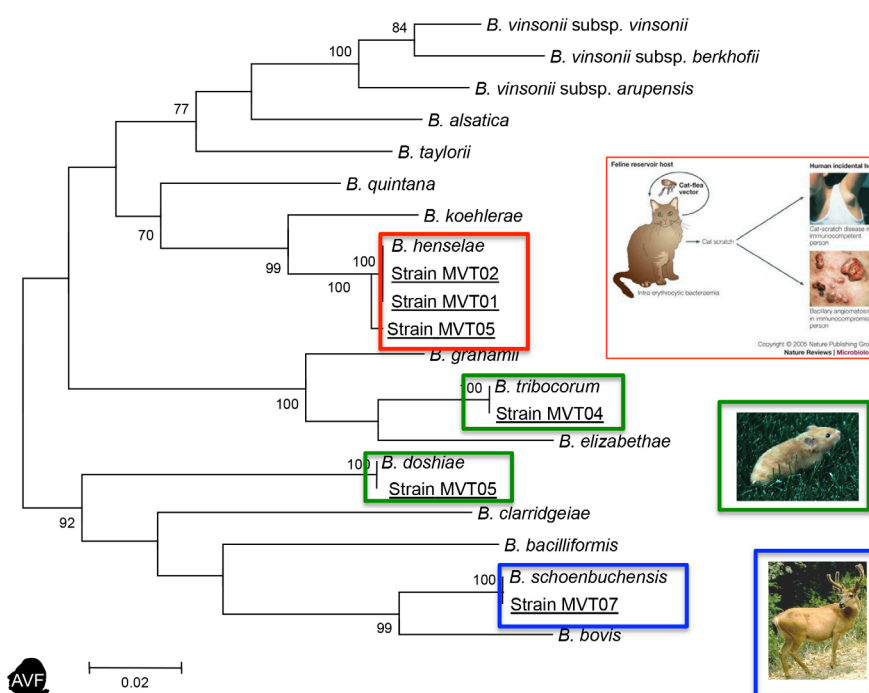


Figure 1 : Position phylogénétique des isolats sur la base des séquences des gènes *gltA* et *rpoB*, d'après Vayssier-Taussat *et al.* 2016

l'on compare ces souches à la souche de référence *B. henselae* confirmant que chaque souche est unique et ne résulte pas d'une contamination croisée ou de contamination à partir de souches de laboratoire. Il convient de noter que seuls les isolats de *B. tribocorum* (MVT04) et *B. schoenbuchensis* (MVT07) présentaient des plasmides.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons pu isoler pour la première fois des souches de *Bartonella* d'origine animale à partir du sang de patients ayant été mordus par des tiques et signalant des symptômes peu spécifiques. Inversement, aucune souche n'a pu être isolée à partir de donneurs de sang sains. Ce rapport décrit également pour la première fois chez l'Homme, l'isolement de trois espèces de *Bartonella* connues pour infecter les animaux mais dont le pouvoir zoonotique n'avaient jamais été encore démontré. Il s'agit de *B. doshiae* et *B. tribocorum*, deux espèces associées aux rongeurs en France et dans le monde (*Microtus agrestis* pour *B. doshiae* et *Rattus rattus* pour *B. tribocorum*), et *B. schoenbuchensis* qui infecte les ruminants sauvages et domestiques. Ces bactéries ont également été détectées chez des animaux en France et leur présence chez l'Homme semble donc être fortement liée à la promiscuité avec des animaux porteurs. De ce fait, ces trois espèces doivent désormais être considérés comme des espèces zoonotiques.

La bactériémie chronique consécutive à une infection à *Bartonella* spp. est bien connue et a été décrite dans de nombreuses espèces de mammifères, y compris les humains (Maurin & Raoult 1996; Jacomo *et al.* 2002). Toutefois, l'association *Bartonella*/hôte et bactériémie était jusqu'à présent considérée comme hôte-spécifique du fait d'une coévolution probable entre l'hôte et l'agent pathogène (Vayssier-Taussat *et al.* 2010). Les travaux présentés ici démontrent que des espèces associées aux animaux peuvent également infecter de manière chronique le sang humain suggérant la possibilité de franchissement de la barrière d'espèce en dépit d'une certaine spécificité d'hôtes. Des travaux d'autres groupes, en particulier de celui de E. Breitschwerdt aux États-Unis ont également montré la présence d'ADN d'espèce de *Bartonella* infectant les animaux dans du sang humain (Breitschwerdt *et al.* 2007; Maggi *et al.* 2013; Lantos *et al.* 2014). Toutefois, ces résultats étaient systématiquement remis en cause du fait de contamination possible de l'ADN au cours de la PCR. C'est la raison pour laquelle nous avons délibérément entrepris l'isolement

des souches de façon à éviter de réaliser des PCR directement sur les échantillons de sang ; ce qui permet de présenter des résultats simples et indiscutables. Ces isolats sont archivés dans notre collection (Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies, World Data Center pour Microorganismes no. 875, <http://www.mediterranee-infection.com/article.Php?Laref=14&titre=collection-de-Souches>) et sont disponibles sur demande sous les références B546, B547, B548, B549, B550 et B551 pour les isolats MVT01, MVT02, MVT03, MVT04, MVT05 et MVT07.

L'implication de la bactérie dans le tableau clinique de ces patients est difficile à confirmer. De même, le lien de causalité entre la présence de *Bartonella* dans le sang et la piqûre de tique ne peut être formellement apporté. En effet, pour l'ensemble de ces patients, la piqûre de tique remonte généralement à plusieurs mois. Même si nous avons pu démontrer une infection chronique pour au moins l'un des patients infectés par *B. henselae*, on ne peut écarter que les patients aient pu être infectés après la piqûre de tique, ou bien *via* la piqûre d'autres arthropodes hématophages, ou encore par contact direct avec des animaux infectés. Par exemple, un des trois patients infectés par *B. henselae* possédait des chats, qui pourraient représenter la véritable source d'infection. Enfin il est crucial de déterminer si *Bartonella* a joué un rôle notable dans les symptômes observés. Le traitement de la bactériémie chronique par *Bartonella* spp. est particulièrement difficile et peut exiger six semaines de traitement par doxycycline avec trois semaines de gentamicine, seuls médicaments antimicrobiens connus pour être efficaces dans l'éradication des *Bartonella* (Brouqui *et al.* 1999). De nombreuses espèces de *Bartonella* sont connues pour causer des endocardites. Par conséquent, les cas d'endocardite attribués à des espèces zoonotique de *Bartonella* tels que *B. henselae*, *B. kohlerae*, *B. alsatica*, *Candidatus B. mayotimonensis*, *B. vinsonii*, ou *B. elizabethae* pourraient être la manifestation finale d'une bactériémie semblable à celle déclarés par les patients étudiés ici.

En résumé, le résultat majeur de notre étude est l'isolement d'espèce zoonotique de *Bartonella* dans le sang de patients ayant des syndromes assez peu spécifiques et ayant subi une morsure de tique. Nous pouvons en conclure que l'infection, chez l'homme, par des espèces zoonotiques de *Bartonella* est susceptible de provoquer des maladies chroniques accompagnées de symptômes peu spécifiques. Le lien de cause à effet avec la piqûre de tique reste toujours à établir formellement.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les médecins généralistes (représentés par Dr Ph. Raymond) qui ont participé à cette étude et le personnel de l'UMR BIPAR (Sara Moutailler, Françoise Féménia) et de l'URMITE (Pierre-Edouard Fournier, Bernard La Scola, Olivier Croce) qui a participé à ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of Bartonella species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol.* 2008; 22(1):1-15.
- Breitschwerdt EB, Maggi RG, Duncan AW, Nicholson WL, Hegarty BC, Woods CW. Bartonella species in blood of immunocompetent persons with animal and arthropod contact. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(6):938-41.
- Brouqui P, Lascola B, Roux V, Raoult D. Chronic Bartonella quintana bacteremia in homeless patients. *N Engl J Med.* 1999; 340(3):184-9.
- Cotte V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis HJ *et al.* Transmission of Bartonella henselae by Ixodes ricinus. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(7):1074-80.
- Dehio C. Bartonella interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol.* 2001; 9(6):279-85.
- Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of Bartonella infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(1):8-18.
- Karem KL, Paddock CD, Regnery RL. Bartonella henselae, B. quintana, and B. bacilliformis: historical pathogens of emerging significance. *Microbes Infect.* 2000; 2(10):1193-1205.
- La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the Bartonella paradigm. *Trends Microbiol.* 2003; 11(7):318-21.
- Lantos PM, Maggi RG, Ferguson, Varkey J, Park LP, Breitschwerdt EB, Woods CW. Detection of Bartonella species in the blood of veterinarians and veterinary technicians: a newly recognized occupational hazard? *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14(8):563-70.
- Maggi RG, Ericson M, Mascarelli PE, Bradley JM, Breitschwerdt EB. Bartonella henselae bacteremia in a mother and son potentially associated with tick exposure. *Parasit Vectors.* 2013; 6:101.
- Maurin M & Raoult D. Bartonella (Rochalimaea) quintana infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(3):273-92.
- Moutailler S, Valiente Moro C, Vaumourin E, Michelet L, Tran FH, Devillers E *et al.* Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(3):e0004539.
- Schroff S. Update on emerging infections: news from the Centers for Disease Control and Prevention. Bartonella quintana in body lice and head lice from homeless persons, San Francisco, California, USA. *Ann Emerg Med.* 2010; 55(3):280-2; discussion 282-3.
- Schulein R, Seubert A, Gille C, Lanz C, Hansmann Y, Piemont Y, Dehio C. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen Bartonella. *J Exp Med.* 2001; 193(9):1077-86.
- Seubert A, Schulein R, Dehio C. Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of Bartonella spp. *Int J Med Microbiol.* 2002;291(6-7):555-60.
- Vayssier-Taussat M, Le Rhun D, Deng HK, Biville F, Cescau S, Danchin A *et al.* The Trw type IV secretion system of Bartonella mediates host-specific adhesion to erythrocytes. *PLoS Pathog.* 2010; 6(6):e1000946.
- Vayssier-Taussat M, Moutailler S, Femenia F, Raymond P, Croce O, La Scola B *et al.* Identification of Novel Zoonotic Activity of Bartonella spp., France. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22(3):457-62.