

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE D'*ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*, AGENT DE L'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE, CONSÉQUENCES ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS POUR LE CONTRÔLE EN FRANCE

GENETIC DIVERSITY OF *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*, THE CAUSATIVE AGENT OF GRANULOCYTIC ANAPLASMOSIS, IMPLICATIONS FOR EPIDEMIOLOGY AND CONTROL IN FRANCE

Par Amélie CHASTAGNER⁽¹⁾, Thibaud DUGAT⁽²⁾, Gwenaél VOURC'H⁽¹⁾, Luc CHABANNE⁽³⁾, Renaud MAILLARD⁽⁴⁾,
Henri-Jean BOULOUIS⁽²⁾, Nadia HADDAD⁽²⁾, Agnès LEBLOND⁽¹⁾⁽⁵⁾
(Communication présentée le 29 janvier 2015)

RÉSUMÉ

A. phagocytophilum, bactérie transmise par les tiques, est responsable de l'anaplasmose granulocytaire, une maladie émergente qui infecte une large gamme de mammifères dont l'homme. L'objectif de cet article est de présenter les nouvelles connaissances acquises sur la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* chez différentes espèces d'hôtes en France, afin de déterminer quelles espèces participent au même cycle épidémiologique.

Une analyse par séquençage multi-locus (MLSA) a été effectuée dans des populations de bovins, chevaux, chiens et chevreuils. Trois groupes de génotypes infectant les bovins ont été identifiés. Les deux groupes principaux incluent 98% des génotypes bactériens trouvés chez les bovins et sont éloignés de ceux des chevreuils. Un cluster ne comprenait que les génotypes de bovins, tandis que le second génotype contenant des bovins comprenait également des chevaux et des chiens. Le troisième cluster contenait tous les génotypes de chevreuils et trois génotypes de bovins. Ces résultats suggèrent que les chevreuils ne contribuent pas à la propagation d'*A. phagocytophilum* chez les bovins en France.

Puis, une technique MLVA (*Multiple Loci VNTR Analysis*) a été développée pour *A. phagocytophilum*. Cinq VNTR ont été sélectionnés sur la base du génome de la souche d'origine humaine HZ, et ont été testés sur 123 échantillons d'ADN provenant d'animaux domestiques ou sauvages. Cette étude a confirmé que les souches d'*A. phagocytophilum* retrouvées chez les chevreuils et les ruminants domestiques appartiennent à deux groupes différents, alors que les souches identifiées chez les cerfs et les ruminants domestiques sont localisées dans le même cluster. Ces résultats remettent en question les rôles respectifs des chevreuils et des cerfs comme hôtes réservoirs pour les souches d'*A. phagocytophilum* de ruminants domestiques en Europe.

Ces techniques moléculaires ont un grand potentiel pour améliorer nos connaissances sur les cycles épidémiologiques d'*A. phagocytophilum*, contribuant ainsi à l'élaboration de mesures de prévention et de contrôle pertinents.

Mots-clés : *A. phagocytophilum*, épidémiologie moléculaire, MLSA, MLVA, hôte réservoir, bovins, chevreuils, cerf.

(1) INRA, UR346 Épidémiologie Animale, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

(2) Université Paris-Est, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France

(3) Université de Lyon, VetAgro Sup, Jeune Équipe Hémopathogènes Vectorisés, F-69280 Marcy l'Étoile, France

(4) École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Unité pathologie des ruminants, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

(5) Département Hippique, VetAgroSup, F-69280, Marcy l'Étoile, France

Corresponding author : Agnes Leblond — agnes.leblond@vetagro-sup.fr

SUMMARY

Anaplasma phagocytophilum is a tick-borne bacterium and the etiologic agent of granulocytic anaplasmosis, an emerging disease that affects a wide range of mammals. In this paper, we present the recent knowledge gained from studies on the genetic diversity of this pathogen in France.

Multilocus sequence analysis (MLSA) was used to characterize the genetic diversity of *A. phagocytophilum* in populations of French cattle, horses, dogs, and roe deer. MLSA was based on nine loci (*ankA*, *msp4*, *groESL*, *typA*, *pled*, *gyrA*, *recG*, *polA*, and an intergenic region). Phylogenetic analysis revealed three genetic clusters of bacterial variants in domesticated animals. The two principal clusters included 98% of the bacterial genotypes found in cattle, which were only distantly related to those in roe deer. One cluster comprised only cattle genotypes, while the second contained genotypes from cattle, horses, and dogs. The third contained all roe deer genotypes and three cattle genotypes. These results suggest that roe deer do not contribute to the spread of *A. phagocytophilum* in cattle in France.

A Multiple-Locus Variable number tandem repeat (VNTR) Analysis typing technique was developed for *A. phagocytophilum*. Five VNTRs were selected based on the HZ human-derived strain genome, and were tested on the Webster human-derived strain and on 123 DNA samples. This study confirmed that *A. phagocytophilum* from roe deer or domestic ruminants belong to two different clusters, while *A. phagocytophilum* from red deer and domestic ruminants locate within the same cluster, questioning the respective roles of roe vs red deer as reservoir hosts for domestic ruminant strains in Europe.

The molecular techniques recently developed have great potential to provide detailed information on *A. phagocytophilum* isolates, improving both epidemiological and phylogenetic investigations, thereby helping in the development of relevant prevention and control measures.

Key words: *A. phagocytophilum*, molecular epidemiology, MLSA, MLVA, reservoir host, cattle, roe deer, red deer.

INTRODUCTION

A. phagocytophilum est l'agent étiologique de l'anaplasmose granulocytaire. Le cycle épidémiologique de cette bactérie est très peu documenté malgré l'importance de la maladie qu'elle provoque. En effet, l'anaplasmose granulocytaire (anciennement ehrlichiose granulocytaire) est une maladie au potentiel zoonotique reconnu, avec une incidence forte et en augmentation dans les zones endémiques aux États-Unis (Woldehiwet, 2010). Même si très peu de cas humains ont été déclarés en Europe, moins d'une dizaine de cas en France (Koebel *et al.* 2011), la maladie a été observée dans les troupeaux de bovins et chez les chevaux dans tous les départements français (Joncour *et al.* 2006). Par sa fréquence, l'anaplasmose granulocytaire est considérée comme la deuxième maladie transmissible par les tiques en médecine vétérinaire. Elle engendre des pertes économiques considérables pour les élevages touchés, en provoquant de la mortalité, des avortements et de l'agalaxie (Stuen, 2007).

Les maladies multi-hôtes se caractérisent par des cycles épidémiologiques complexes difficiles à appréhender. Dans le cas des maladies vectorielles, la propagation par l'intermédiaire des vecteurs ajoute encore de la complexité à la dynamique des agents pathogènes. Cette complexité des cycles des agents pathogènes multi-hôtes vectorisés rend difficile la mise en œuvre de mesures de gestion sanitaire. Pour comprendre cette dynamique et pouvoir proposer des mesures de contrôle, il est essentiel de déterminer quelles espèces participent aux cycles

épidémiologiques et leurs contributions relatives au maintien et à la transmission de l'agent pathogène.

L'étude de la diversité génétique, par l'utilisation d'outils d'épidémiologie moléculaire, permet de caractériser les souches, d'étudier leur évolution, de mieux comprendre leur cycle épidémiologique et les relations entre génotype, phénotype et virulence. Outre l'importance de détecter les agents pathogènes dans les populations pour mieux les contrôler, la biologie moléculaire permet d'identifier et de caractériser plus précisément l'agent pathogène responsable d'une maladie. Pour les maladies multi-hôtes vectorisées, la caractérisation génétique permet de déterminer la capacité des différents variants à infecter différentes communautés d'hôtes. Ces informations permettent de reconstituer le cycle épidémiologique d'un agent pathogène. Récemment, de nouveaux marqueurs génétiques ont été développés et ont permis de mieux caractériser la bactérie et décrire son cycle (Chastagner *et al.* 2014 ; Dugat *et al.* 2014). Dans cet article, nous proposons de faire le bilan des connaissances acquises grâce à ces études.

LA BACTERIE : MÉCANISMES DE TRANSMISSION ET FACTEURS DÉTERMINANTS POUR L'INFECTION

La transmission d'*A. phagocytophilum* entre les hôtes se fait essentiellement par l'intermédiaire d'un vecteur. Son cycle de

vie dépend donc de sa survie dans les cellules de l'hôte vertébré et du vecteur, et du taux de réussite lors de la transmission à la tique ou à l'hôte.

La bactérie

L'anaplasmose granulocytaire a été observée pour la première fois en 1932 dans un troupeau de moutons en Écosse (Macleod & Gordon, 1933). Cette maladie était caractérisée par une forte fièvre coïncidant avec la présence de tiques. Elle fut ainsi longtemps nommée *tick-borne fever* (TBF ou fièvre à tique). Depuis sa découverte, des cas de TBF ont été rapportés dans tout le reste de l'Europe, principalement chez les ovins et les bovins. L'agent pathogène responsable de cette maladie a été identifié par Foggie en 1951 comme étant une bactérie de la famille des rickettsies, infectant les granulocytes, qu'il nomma alors *Rickettsia phagocytophila* (Foggie, 1951). La maladie a ensuite été décrite aux USA chez le cheval en 1969 (Gribble, 1969), chez le chien en 1982 (Madewell & Gribble, 1982) et chez l'homme en 1994 (Chen *et al.* 1994) sous trois appellations différentes : l'ehrlichiose granulocytaire respectivement équine, canine ou humaine. En 2001, l'étude phylogénétique visant à réorganiser la classification de l'ordre des Rickettsiales montre que les trois ehrlichioses granulocytaires étaient dues à une seule espèce bactérienne appartenant aux *Anaplasmataceae*.

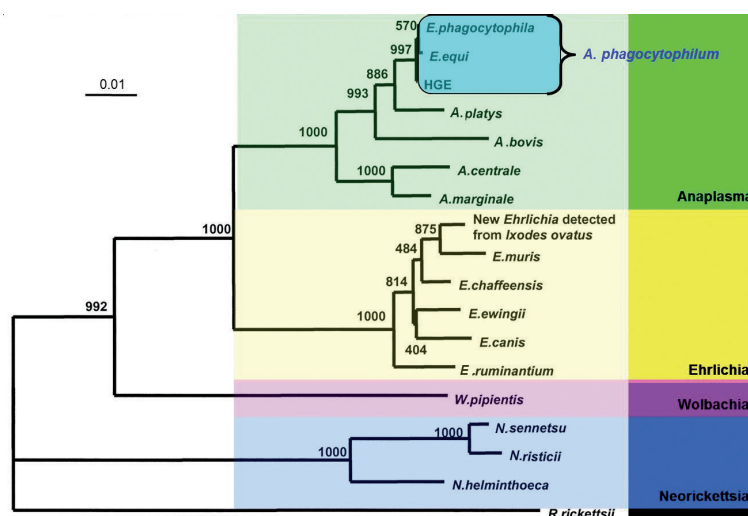


Figure 1 : Phylogénie des Anaplasmataceae basée sur l'ARNr 16S. (D'après Inokuma *et al.* 2001).

La bactérie a alors été renommée *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler *et al.* 2001).

A. phagocytophilum est une bactérie intracellulaire stricte, gram négative, qui infecte les granulocytes neutrophiles. Elle vit et se réplique au sein de vacuoles, appelées morula, formées par les membranes des cellules infectées. Elle mesure entre 0,4 et 1,3 μm et présente deux morphotypes : le corps réticulé (*reticulate core* ou RC) et le noyau dense (*dense core* ou DC). Le morphotype réticulé est la forme répliquative non infectieuse

du cycle de développement d'*A. phagocytophilum*. Le morphotype en noyau dense est la forme infectieuse, résistante aux changements environnementaux, il peut sortir de la cellule de l'hôte pour en infecter une autre (Woldehiwet & Scott, 1982).

Les facteurs déterminants pour l'infection des tiques et des hôtes vertébrés

A. phagocytophilum circule entre les différents hôtes par l'intermédiaire des tiques, principalement de l'espèce *Ixodes ricinus* en Europe. La tique acquiert la bactérie en prenant un repas de sang sur un hôte vertébré infecté, puis elle transmet la bactérie à un hôte vertébré sain lors du repas suivant.

Chez les tiques du genre *Ixodes*, par suite de l'absence de transmission trans-ovarienne de la bactérie (de la tique femelle adulte aux œufs), les tiques ne sont pas infectées à la naissance et acquièrent la bactérie en se gorgeant sur un hôte infecté (Macleod & Gordon, 1933). Après la mue, la tique reste en général infectée par transmission trans-stadiale. Elle peut transmettre la bactérie à un hôte vertébré sain lors du repas sanguin suivant.

Plusieurs facteurs entrent en jeu dans l'efficacité de la transmission entre l'hôte vertébré infecté et une tique saine : l'espèce de tique et celle de l'hôte, la quantité de sang ingérée, plus élevée pour une nymphe que pour une larve, la durée de gorgement (Kocan *et al.* 2012), la bactériémie chez l'hôte (Ogden *et al.* 2003). Des mécanismes tels que la transmission par *co-feeding* ou les défenses immunitaires de l'hôte contre les tiques modulent également la transmission de l'infection à la tique. L'augmentation du nombre de tiques en gorgement sur un hôte augmente l'occurrence de transmission par *co-feeding*. Une tique non infectée peut alors acquérir la bactérie en se gorgeant à proximité d'une tique infectée, sans que l'hôte vertébré n'ait acquis l'infection (Ogden, *et al.* 2002a). De plus, la présence de tiques adultes en *co-feeding* a un impact sur le système immunitaire de l'hôte d'une part, en diminuant l'efficacité des anticorps anti-tiques produits par l'hôte et d'autre part, en attirant des cellules inflammatoires vers les zones de morsure. Ces deux processus augmentent la probabilité de transmission de la bactérie (Ogden, *et al.*, 2002b).

Lors du passage de l'hôte à la tique, la bactérie rencontre plusieurs barrières liées au changement de milieu et au système immunitaire de la tique. *A. phagocytophilum* agit sur l'expression de plusieurs gènes chez la tique pour l'infecter. Durant le repas de sang de la tique, la bactérie s'installe dans les cellules du tube digestif et migre vers les glandes salivaires. La protéine P11 produite par la tique facilite la migration d'*A. phagocytophilum* vers les glandes salivaires et la protéine Salp 16 permet sa

survie dans les glandes salivaires (Sukumaran *et al.* 2006). *A. phagocytophilum* agit également sur l'expression de gènes liés à la survie de son vecteur. En effet, sa présence favorise la survie de la tique en hiver par augmentation de la production de glycoprotéines protectrices contre le gel (Neelakanta *et al.* 2010).

Une fois transmise à l'hôte, pour survivre et se propager, *A. phagocytophilum* recrute les granulocytes de l'hôte en augmentant la transcription des IL-8 (Akkoyunlu *et al.* 2001), puis elle détourne le système immunitaire en réduisant notamment la production d'anions superoxyde, la fusion des lysosomes, l'autophagie et les signaux IFN- γ , qui permettent aux neutrophiles d'éliminer les bactéries intracellulaires (Woldehiwet, 2008). Enfin, *A. phagocytophilum* augmente sa survie en retardant les mécanismes de l'apoptose (Yoshiie *et al.* 2000).

Pour détourner le système immunitaire et exploiter les cellules de l'hôte, *A. phagocytophilum* utilise un système de sécrétion de type IV. Deux molécules effectrices sécrétées par ce système ont été identifiées comme étant essentielles pour l'infection, *ankA* et *Ats-1*. *ankA* facilite l'infection intracellulaire par l'activation de la voie de signalisation *Abl-1* (Lin *et al.* 2007) et interagit avec la protéine *Ats-1* qui intervient notamment dans le blocage de l'apoptose (Rikihisa *et al.* 2010).

Le génome d'*A. phagocytophilum* est composé de nombreux gènes impliqués dans les interactions avec les cellules hôtes. Il possède plus de 110 gènes codant des protéines majeures de surface permettant de reconnaître et d'adhérer aux cellules cibles et de contrer les anticorps produits par l'hôte (Rikihisa, 2010 ; Rejmanek *et al.* 2012). Parmi ces gènes, se trouvent les gènes *msp2/p44* dont l'expression évolue rapidement pour limiter la reconnaissance de la bactérie par les anticorps de l'hôte. Les études *in vitro* ont permis d'évaluer le taux d'évolution du site d'expression de *msp2* entre 1 et 2% par semaine chez la souris (Rejmanek *et al.* 2012a).

Enfin, *A. phagocytophilum* possède trois paires de gènes impliquées dans la synthèse de systèmes à deux composantes, *PleC/pleD*, *CckA/CtrA* et *NtrY/NtrX*. Ces gènes permettent de réguler l'infection selon les conditions environnementales (Rikihisa, 2011).

A. phagocytophilum met donc en place de nombreux mécanismes pour survivre, éviter le système immunitaire des hôtes et augmenter sa probabilité de transmission. Les fortes interactions entre le système immunitaire de l'hôte et la bactérie tendent vers deux stratégies opposées : la spécialisation des souches pour s'adapter à une espèce d'hôte ou la diversification des souches pour infecter des hôtes multiples.

Les « acteurs » des cycles épidémiologiques d'*A. phagocytophilum*

Les vecteurs

Les principaux arthropodes porteurs de la bactérie sont les tiques de la famille des *Ixodidae*. La compétence vectorielle

a été prouvée pour *I. scapularis* et *I. pacificus* aux États-Unis (Telford *et al.* 1996 ; Teglas & Foley, 2006), *I. ricinus* et *I. trianguliceps* en Europe (Macleod & Gordon, 1933 ; Bown *et al.* 2006). Les taux de prévalence déterminés chez les tiques par détection de l'ADN bactérien sont très variables selon les zones échantillonnées, le stade de développement de la tique et son espèce et peuvent varier de moins de 1% à des taux de 24, 50 et 10% respectivement chez les nymphes de *I. ricinus*, *I. scapularis* et *I. pacificus* (Stuen *et al.* 2013). La bactérie a été détectée chez d'autres espèces de tiques pour lesquelles la compétence vectorielle n'a pas été testée, en particulier chez des espèces du genre *Dermacentor*, dont *D. reticulatus*, *Amblyomma* (*Amblyomma americanum*) ou *Haemaphysalis* (Stuen *et al.* 2013).

La diversité des espèces vectrices potentielles peut avoir des conséquences sur les cycles épidémiologiques de la bactérie et expliquer en partie la diversité des souches d'*A. phagocytophilum* et des cycles observés. Ces préférences trophiques peuvent induire un cycle bactérien spécifique à l'espèce vectrice et à certains hôtes. Les différences de prévalence au sein des vecteurs et d'efficacité de transmission sont également à l'origine de la propagation prédominante de certaines souches. Le différentiel de capacité vectorielle pour *I. scapularis* et *I. pacificus* favorise par exemple une ségrégation Est-Ouest des souches d'*A. phagocytophilum* aux États-Unis (Teglas & Foley, 2006).

Les hôtes vertébrés

En Europe, depuis la découverte de la bactérie chez les moutons, l'anaplasmose granulocytaire a été détectée chez de nombreuses espèces domestiques (bovins, chevaux, chèvres, chiens et chats). Les symptômes sont très variables selon l'espèce, la sensibilité des individus et la souche d'*A. phagocytophilum* (Foggie, 1951 ; Stuen *et al.* 2011). Les symptômes de l'anaplasmose granulocytaire ne sont pas spécifiques, les plus fréquents sont l'hyperthermie, l'abattement, l'inappétence et la présence d'œdèmes. Chez les chevaux, la maladie s'accompagne d'ictère, de tachycardie, de thrombocytopenie et éventuellement d'anémie et/ou leucopénie (Dziegiel *et al.* 2013). Chez les chiens et les chats, la maladie est très peu décrite, les cas observés font état d'hyperthermie, de tachypnée, d'anorexie, de douleurs articulaires et de thrombocytopenie (Carrade *et al.* 2009). Chez les ruminants, une agalaxie et des œdèmes des paturons sont observés. Des avortements ont été déclarés chez des brebis et des vaches infectées par *A. phagocytophilum*, mais l'implication de la bactérie n'a pas été prouvée. Lors de l'invasion des granulocytes par *A. phagocytophilum*, la bactérie bloque le système immunitaire pour survivre, créant ainsi une immunodépression. Chez le mouton, 90% de la mortalité est due à une infection secondaire consécutive à cette immunodépression (Stuen *et al.* 2003a).

La persistance de la bactérie chez l'hôte varie selon la souche et la sensibilité des individus (Granquist *et al.* 2010). Les infections expérimentales montrent que la maladie se déclare par une phase aigüe moins de 48h après la morsure par une tique infectée et dure en moyenne une semaine (Granquist

et al. 2008). Des cas d'infections chroniques ont été décrits chez les chevaux, les bovins et les ovins ; (Thomas *et al.* 2012 ; Dziegiel *et al.* 2013). Deux hypothèses expliqueraient cette chronicité : la réinfection au contact de nouvelles tiques infectées ou l'évolution de la souche infectante. Le suivi longitudinal d'agneaux naïfs, installés en zone d'endémie, a mis en évidence la présence de 24 variants circulant dans le troupeau pendant une période de 16 semaines. Chaque agneau a été trouvé porteur de plusieurs variants au cours de cette période (Ladbury *et al.* 2008). L'infection simultanée et/ou successive par plusieurs variants est, dans ce cas, imputable au moins en partie à la fréquence des morsures par des tiques infectées. En outre, les infections expérimentales montrent que la variation des antigènes membranaires permet à la bactérie d'évoluer parallèlement à la mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte. Une infection chronique provenant d'une seule souche est alors observée (Granquist *et al.* 2008). Il a été montré que les moutons pouvaient rester porteurs de la bactérie jusqu'à 25 mois (Foggie, 1951) et que la bactérie pouvait persister dans les tissus sans être détectable dans le sang (Stuen *et al.* 2006). C'est pourquoi les moutons sont considérés comme une espèce réservoir pour *A. phagocytophilum*.

Chez les mammifères sauvages, les deux pistes les plus explorées sont les ongulés sauvages et les micromammifères. Chez les ongulés sauvages, les chevreuils (*Capreolus capreolus*) et les cerfs (*Cervus elaphus*) présentent de fortes prévalences d'infection par *A. phagocytophilum*, allant jusqu'à 90% (Stuen *et al.* 2013). Ces deux espèces ont un fort potentiel comme hôte réservoir, mais elles semblent impliquées dans des cycles différents, car les souches portées par les cerfs sont plus proches de celles portées par les animaux domestiques que celles portées par les chevreuils (cf. *infra*). Les sangliers sont également porteurs de la bactérie avec des taux de prévalence plus faibles (2- 12%) (Galindo *et al.* 2012 ; Michalik *et al.* 2012). Cependant, la présence de sangliers semble avoir un effet de dilution sur la prévalence d'infection par *A. phagocytophilum* chez les cervidés. Cet effet serait expliqué par le fait que les sangliers éliminent la plupart des souches à l'exception de celles proches des souches humaines (Michalik *et al.* 2012). Les sangliers sont considérés comme des hôtes réservoirs peu probables, mais pourraient être impliqués dans la dispersion de souches potentiellement infectantes pour l'homme.

Chez les micromammifères, seule l'implication du campagnol agreste (*Microtus agrestis*) comme espèce réservoir d'*A. phagocytophilum* a été prouvée en Grande-Bretagne (Bown *et al.* 2009). De nombreuses autres espèces de rongeurs sont infectées par la bactérie avec des prévalences très variables, comme le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*), le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*) ou le mulot à collier (*A. flavicollis*), mais leur compétence en tant qu'hôte réservoir n'a pas été évaluée (Stuen *et al.* 2013). Chez les insectivores, les fortes quantités de tiques et les taux de prévalence de 20% à 25% chez les musaraignes communes (*Sorex araneus*) et les hérissons (*Erinaceus europaeus*) laissent penser que ces deux espèces sont fortement impliquées dans certains cycles (Bown *et al.* 2011 ; Silaghi *et al.* 2012).

Les études de prévalence chez les populations domestiques et sauvages ont donc montré que plusieurs souches circulent et que certaines sont spécifiques de leur(s) vecteur(s) ou d'espèces d'hôtes vertébrés. Pour mieux comprendre la contribution des espèces vertébrées et vectrices aux cycles épidémiologiques des différents variants d'*A. phagocytophilum*, des outils d'épidémiologie moléculaire spécifiques ont été développés.

DIVERSITÉ DES SOUCHES D'*A. PHAGOCYTOPHILUM* IDENTIFIÉES CHEZ LES ANIMAUX SYMPTOMATIQUES

Les outils de biologie moléculaire permettent de typer les souches et de comprendre les relations de parenté entre souches. En particulier, les techniques de séquençage d'ADN permettent de retracer à des degrés divers les relations phylogénétiques. Différentes techniques existent, parmi lesquelles le séquençage total de souche, le séquençage de loci d'intérêt, les techniques MLVA (*Multiple Loci VNTR Analysis*) et MLST/MLSA (*Multilocus Sequence Typing/Analysis*). Le séquençage total de souches (WGS) permet de comparer la structure du génome d'*A. phagocytophilum* avec celle des autres *Anaplasmataceae* et d'identifier les gènes d'intérêt pour l'étude des mécanismes d'infection et la caractérisation de la bactérie. Cette technique est coûteuse et nécessite la mise en culture des souches après isolement ou la mise en place de méthodes particulières, de type séquence capture (Dugat *et al.* 2014b). À l'heure actuelle, le recours à des techniques de séquençage partiel du génome est donc plus accessible.

Le séquençage de loci d'intérêt a mis en évidence une forte diversité de souches chez les tiques à partir des gènes codant l'ARN 16S, *groESL*, *ankA* (von Loewenich *et al.* 2003). Il a également permis de délimiter des groupes de génotypes circulant dans un même écosystème (Shukla *et al.* 2007 ; Bown *et al.* 2009) et d'identifier de nouveaux génotypes, comme un groupe sur la base du gène *ankA* qui infecte exclusivement les rongeurs (Majazki *et al.* 2013). Cependant les études phylogénétiques basées sur un ou deux loci présentent des résultats incohérents entre loci et un manque de robustesse des phylogénies issues de chaque locus.

La MLVA est une technique très discriminante utile pour tracer la dispersion d'une souche à petite échelle, à partir de l'analyse de motifs ADN répétés. Le premier schéma de MLVA développé sur des loci de type microsatellite à localisation intergénique s'est révélé trop discriminant et ne permettait pas de caractériser la dispersion des souches d'*A. phagocytophilum* (Bown *et al.* 2007). Le nouveau schéma développé par Dugat *et al.* (2014a), sur des minisatellites intragéniques a pu tracer l'évolution des souches dans les troupeaux de bovins et entre ruminants domestiques et sauvages.

Enfin, les souches sont discriminées sur la base des informations provenant de plusieurs loci, par le typage ou l'analyse multilocus (MLST/MLSA). Elles sont caractérisées par leurs

profils alléliques par le typage multilocus (MLST), alors que la MLSA prend en compte la distance génétique entre génotypes et permet de reconstruire une phylogénie plus robuste que celles établies sur la base d'un seul locus. En 2014, la première MLSA (Huhn *et al.* 2014) met en évidence trois groupes de génotypes associés à des espèces d'hôtes différentes suggérant ainsi l'existence de cycles épidémiologiques différents, hypothèse confortée aussi par la MLVA.

Les techniques de MLVA et MLSA sont à l'heure actuelle les outils les plus appropriés pour caractériser, de façon robuste et avec une certaine complémentarité, la diversité des génotypes d'*A. phagocytophilum* circulant chez les mammifères et les vecteurs infectés.

Étude des génotypes identifiés par MLSA chez les bovins à l'échelle de la France

Pour comprendre comment se structure la diversité d'*A. phagocytophilum* et quelles espèces participent aux mêmes cycles épidémiologiques, nous avons étudié la diversité génétique retrouvée chez les animaux domestiques malades.

Des échantillons de sang ont été collectés par l'intermédiaire de laboratoires vétérinaires et de vétérinaires praticiens chez 109 bovins, 11 chevaux et trois chiens présentant des signes cliniques d'anaplasmose granulocytaire. La caractérisation des génotypes d'*A. phagocytophilum* a été effectuée par analyse multi-loci basée sur les séquences ADN de huit loci (*msp4*, *groEL*, *pleD*, *typA*, *gyrA*, *recG*, *polA*, et l'intergène *CtrA-APH1100*) (Chastagner *et al.* 2014). La phylogénie obtenue sur la base de ces huit loci est structurée en trois groupes de génotypes. Le premier groupe (cluster A, **figure 2**) est constitué de génotypes rencontrés chez une minorité de bovins (moins de 2%) et est partagé avec les chevreuils. Le second groupe de génotypes (cluster B) n'a été observé que chez les bovins parmi les espèces testées. Le dernier groupe (cluster C) est constitué de génotypes de bovins, chevaux et chiens, et inclut les souches de référence américaines dont les souches humaines. Ces groupes phylogénétiques sont corrélés aux groupes I, III et IV décrit sur le gène *ankA* (Sharf *et al.* 2011).

La structuration des génotypes d'*A. phagocytophilum* en groupes génétiques divergents peut être expliquée par trois facteurs: 1) une différenciation liée à des cycles épidémiologiques distincts (par exemple une différence d'espèce de tiques vectrices ou une différence d'espèces d'hôtes vertébrés réservoirs)

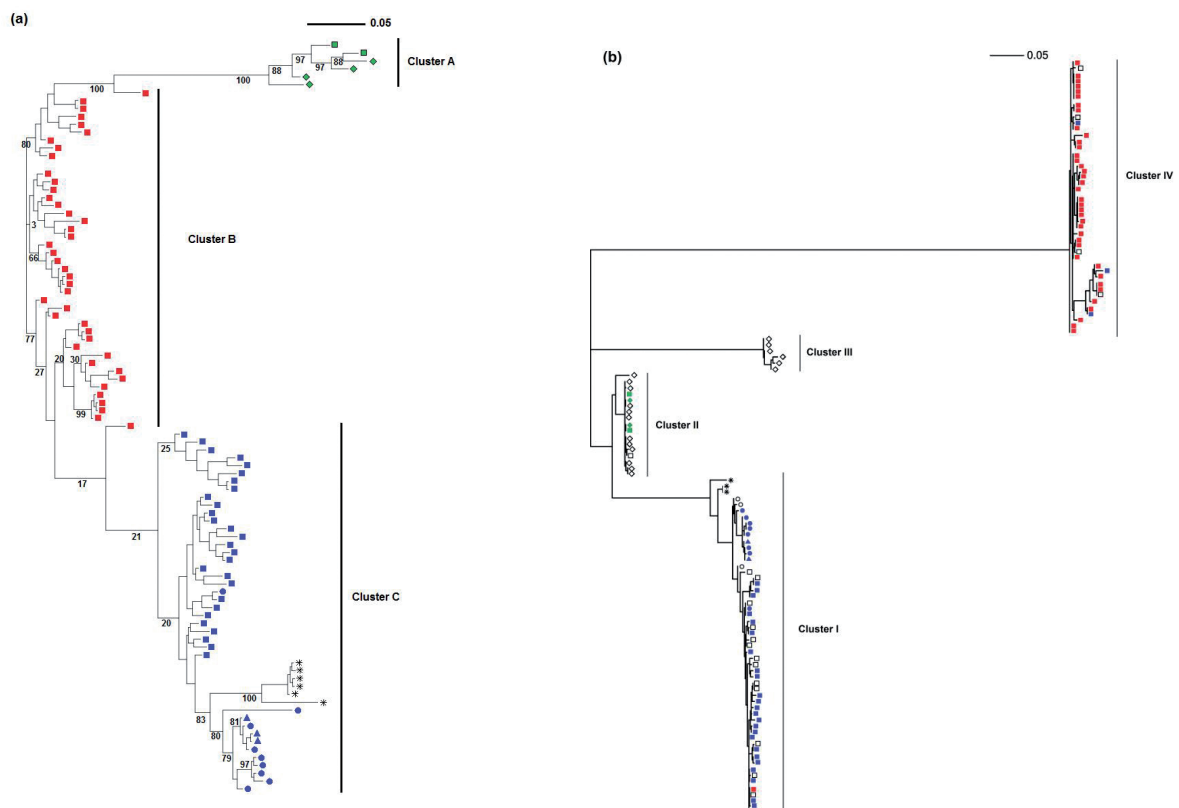


Figure 2 : (a) Super-arbre construit par méthode bayésienne sur la base des séquences ADN de huit loci et (b) arbre phylogénétique d'*ankA* non raciné construit par maximum de vraisemblance. La numérotation des clusters pour *ankA* respecte celle proposée par Scharf *et al.* 2011. Chaque forme représente l'espèce d'hôte chez laquelle le génotype d'*A. phagocytophilum* a été caractérisé : □ pour les bovins, ○ pour les chevaux, △ pour les chiens, ◇ pour les chevreuils et * indique les souches de références américaines. Une couleur a été attribuée à chaque échantillon présent sur le super-arbre selon le cluster auquel il appartient.

(Bown *et al.* 2009) ; 2) une différence de sensibilité des hôtes vertébrés vis-à-vis de la bactérie, qui a pu laisser émerger des variants présentant des niveaux de virulence différents (André & Gandon, 2006) ; 3) une émergence ou une évolution de différentes lignées séparées par des barrières géographiques ou environnementales (Zhaoqing *et al.* 2006).

L'hypothèse de la co-existence de plusieurs cycles épidémiologiques qui infectent les animaux domestiques est soutenue par la différence de composition en hôtes des clusters dans le super-arbre et la phylogénie basée sur le gène *ankA*. *A. phagocytophilum* entretient de nombreuses interactions avec les cellules hôtes d'une part, pour infecter et survivre dans les granulocytes et d'autre part, pour éviter le système immunitaire de l'hôte. Face à cette nécessité biologique, la pression de sélection exercée sur les gènes impliqués dans ces processus (tel que *ankA*) peut engendrer deux stratégies d'évolution opposées : soit elle favorise la spécialisation des souches à une espèce d'hôte ou à un groupe d'hôtes présentant des systèmes immunitaires très proches, soit elle favorise les souches les plus généralistes (Viana *et al.* 2014). La présence de génotypes associés aux bovins dans les trois clusters laisse penser que les pressions de sélection exercées sur *A. phagocytophilum* sont en faveur du maintien d'une diversité de variants adaptés à des gammes d'hôtes vertébrés pouvant être chevauchantes. Cette hypothèse est également supportée par d'autres études menées sur la diversité génétique d'*A. phagocytophilum*, qui démontrent l'existence de plusieurs écotypes adaptés à différents ensembles d'hôtes (Bown *et al.* 2009 ; Scharf *et al.* 2011).

La seconde hypothèse concernant la différence de sensibilité des hôtes pourrait expliquer la grande diversité de symptômes observés chez les bovins. Les infections expérimentales menées

chez les moutons et les souris montrent l'existence d'une variation de virulence entre les souches d'*A. phagocytophilum* (Massung *et al.* 2003; Stuen *et al.* 2010). Dans l'étude présentée ici, la cohérence entre la topologie du super-arbre et celle des phylogénies basées sur les gènes *ankA* et *pleD* (deux gènes liés à la régulation de l'infection) pose question sur la relation entre virulence et divergence génétique. Cette hypothèse nécessite des études complémentaires, notamment par infections expérimentales, pour être validée.

La dernière hypothèse, suggérant que la structuration génétique d'*A. phagocytophilum* résulte d'une structuration spatiale, ne semble pas être validée par les résultats de notre étude (figure 3). Il est néanmoins envisageable que le facteur spatial joue un rôle dans l'évolution et la répartition des génotypes à travers des phénomènes de dérive ou d'adaptation à une communauté d'hôtes locale. Par exemple, en Sardaigne et en Camargue, le génotype circulant est différent de ceux identifiés dans le reste de l'Europe (Alberti *et al.* 2005 ; Chastagner *et al.* 2013). Les écosystèmes méditerranéens (climat, espèces de tiques et d'hôtes présentes) pourraient expliquer la répartition de ce génotype. De même, il a été montré en Sicile que la répartition des espèces d'hôtes et de tiques influence la distribution des souches (Torina *et al.* 2008).

Bien que l'origine de la divergence des génotypes en différents groupes phylogénétiques ne soit pas encore déterminée, nos résultats semblent favoriser l'hypothèse que plusieurs cycles épidémiologiques coexistent. Les bovins sont impliqués dans au moins trois cycles et le chevreuil - décrit comme l'hôte réservoir principal d'*A. phagocytophilum* - ne semble contribuer qu'à la dispersion des génotypes du cluster A, lui-même associé à moins de 2% des génotypes infectant les bovins. A notre connaissance, aucun génotype associé à des chevreuils n'avait encore été identifié chez des bovins, l'échange de souches entre les chevreuils et les bovins observés dans notre étude pourrait être dû à un effet de *spill-over*.

Pour les génotypes appartenant aux clusters B et C, l'hôte vertébré réservoir reste à déterminer. Dans la littérature, il a été montré que les sangliers, les hérissons et les cerfs sont porteurs de génotypes proches de ceux décrits chez les animaux domestiques (Huhn *et al.* 2014). Les hérissons et les cerfs présentent des taux de prévalence élevés, environ 60% et 80% respectivement (Rymaszewska, 2008 ; Silaghi *et al.* 2012 ; Stuen *et al.* 2013), ce qui en font de bons candidats en tant qu'hôte réservoir.

La présence d'un groupe retrouvé exclusivement chez les bovins (cluster B) pose question sur le rôle des bovins dans le maintien de la bactérie. Les études de séroprévalence montrent que les infections asymptomatiques sont fréquentes. Les bovins pourraient maintenir à eux seuls la bactérie dans la population et jouer le rôle d'espèce réservoir.

Enfin, les génotypes infectant les chevaux et les chiens semblent génétiquement plus proches que ceux associés aux autres espèces. Cette proximité a également été démontrée sur

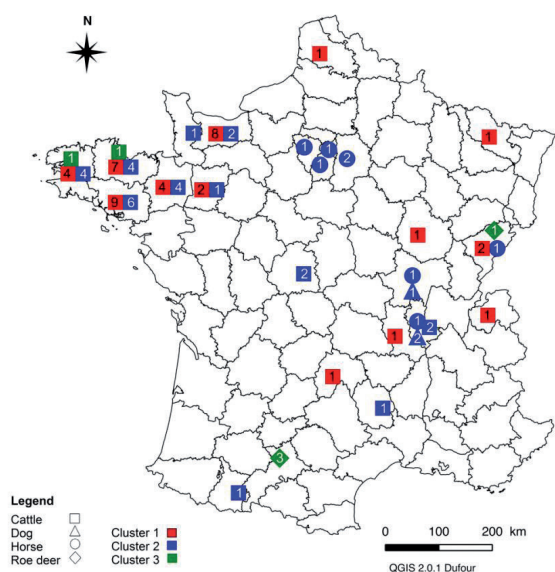


Figure 3: Carte de répartition des génotypes identifiés dans le super-arbre.

la base du gène *groESL* (Rymaszewska, 2008) et plus récemment, par MLST (Huhn *et al.* 2014). Ces résultats montrent l'importance de mieux surveiller et contrôler la dispersion d'*A. phagocytophilum* dans ces deux espèces. En effet, leur mode de vie proche de l'homme et la présence de souches potentiellement infectantes pour l'homme accroissent le risque d'émergence de souches zoonotiques.

Dans cette étude, le séquençage multi-loci a donc permis d'identifier trois groupes de génotypes pathogènes pour les animaux domestiques. Les bovins sont porteurs des trois groupes phylogénétiques d'*A. phagocytophilum*, dont l'un semble nettement majoritaire, alors que les chevaux et les chiens ne sont associés qu'à un seul groupe. Les différents groupes génétiques semblent présenter une forte structuration liée aux espèces d'hôtes. Cette structuration renforce l'hypothèse de l'existence de plusieurs cycles épidémiologiques. Pour mieux comprendre ces cycles, des études complémentaires incluant plus d'espèces, à des échelles plus locales sont nécessaires d'une part, pour déterminer quelles espèces partagent les mêmes génotypes et d'autre part, quelles espèces peuvent être réservoir d'*A. phagocytophilum*. L'approche MLVA peut contribuer à répondre à ces questions.

Étude par MLVA de la variabilité d'*A. phagocytophilum* en intra-troupeaux bovins et ovins et de sa circulation entre ruminants domestiques et sauvages

La technique MLVA (*Multiple Loci VNTR Analysis*) est basée sur l'utilisation de marqueurs *Variable-Number Tandem Repeat* (VNTR) polymorphes. Un VNTR est défini comme une région d'ADN répétée en tandem, c'est-à-dire composée de répétitions adjacentes les unes aux autres (micro ou minisatellites). Dans le cas des VNTR polymorphes, le nombre de répétitions au sein d'un même VNTR peut varier entre les souches d'une même espèce bactérienne. La combinaison de plusieurs VNTR polymorphes permet d'amplifier le pouvoir de discrimination des différents variants d'une espèce bactérienne. Pour cela, les différents VNTR sont amplifiés par PCR, et leur taille est ensuite estimée par électrophorèse (sur gel d'agarose ou capillaire), permettant de déduire le nombre de répétitions pour chaque VNTR. La MLVA est une technique très résolutive, rapide, peu coûteuse, et a été utilisée pour typer de nombreux agents pathogènes, notamment diverses bactéries d'intérêt vétérinaire et/ou zoonotique (Lindstedt, 2005 ; Monteil *et al.* 2007 ; Azzag *et al.* 2012). Le plus souvent, cette technique possède un pouvoir discriminant plus important que celui des autres techniques utilisées pour le typage de ces bactéries, notamment la technique MLST (Bouchouicha *et al.* 2009 ; Pilet *et al.* 2012). L'utilisation de cette technique peut donc être envisagée afin d'étudier la variabilité génétique d'une bactérie à un niveau plus fin que la technique MLST/MLSA qui est, quant à elle, la technique de référence pour la phylogénie. Afin de conforter les résultats obtenus lors de l'étude MLSA et d'étudier la variabilité génétique intra et inter troupeaux d'*A.*

phagocytophilum, ainsi que la circulation des souches au sein des écosystèmes, nous avons donc développé une technique de typage moléculaire MLVA pour cette bactérie, basée sur l'utilisation de cinq VNTR intragéniques, APV-A à E (Dugat *et al.* 2014a). A l'aide de cette technique, nous avons typé 123 prélèvements de diverses espèces animales infectées par *A. phagocytophilum*, ainsi que la souche humaine Webster. Nous avons obtenu, six allèles différents pour APV-A, 10 pour APV-B et C, cinq pour APV-D, et 14 pour APV-E. L'indice de discrimination de notre technique est de 0,96 pour l'ensemble des échantillons testés, et de 0,99 pour les 99 échantillons de vertébrés, démontrant son fort pouvoir discriminant.

Variabilité génétique intra et inter-troupeaux

Chez les bovins

Dans cette étude, 67 prélèvements sanguins de bovins infectés par *A. phagocytophilum* ont été testés et 56 profils MLVA ont ainsi été obtenus. Deux groupes ont été identifiés. Le premier est constitué de 21 bovins prélevés dans sept fermes différentes: trois dans une ferme des Côtes-d'Armor, deux dans une ferme du Finistère, trois dans une ferme de la Haute-Vienne, trois dans une ferme d'Ille-et-Vilaine, trois dans une ferme de la Mayenne et six dans deux fermes du Morbihan. Les échantillons d'une même ferme présentent des profils identiques ou extrêmement proches : parmi ces 21 échantillons, huit (38%) ont un profil identique à celui d'au moins un autre échantillon. Le second groupe est constitué des 46 autres prélèvements, tous issus de troupeaux différents et présentant 44 profils distincts. Au sein de ce groupe, trois (7%) ont un profil identique à celui d'au moins un autre échantillon. La proportion d'échantillons ayant un profil identique à au moins un autre échantillon est statistiquement plus élevée dans le premier groupe (contenant au moins deux animaux par ferme) que dans le second (un seul bovin par ferme) ($p=0.003$). Cette différence est également statistiquement plus élevée pour les bovins prélevés en Bretagne, d'où sont issus la très grande majorité des échantillons prélevés au sein de mêmes fermes (test exact de Fischer, $p=0.01347$). Les échantillons de bovins appartenant à des troupeaux différents ont donc présenté une plus grande diversité de profils que les échantillons provenant des bovins du même troupeau. Cette observation est également vraie pour les échantillons de bovins provenant de la même région (Bretagne), nous permettant de considérer comme faible ou nulle la probabilité d'un effet géographique sur la distribution des profils obtenus. L'obtention de différents profils au sein d'un même troupeau de bovins peut s'expliquer, selon les profils, par un phénomène de dérive génétique du variant infectant ce troupeau et/ou par l'infection de ce troupeau par différents variants d'*A. phagocytophilum*.

Chez les moutons

Nous avons également testé sept échantillons, tous prélevés dans le même troupeau de moutons et nous avons obtenu sept profils différents. Ces échantillons présentent une diversité

plus importante que ceux de bovins appartenant au même troupeau. Cette différence peut s'expliquer i/ dans certains cas, par les différences de mode d'élevage par rapport aux bovins, lorsque les moutons, parcourant des distances beaucoup plus importantes, notamment lors des transhumances, sont soumis à une augmentation de leur probabilité d'exposition à un nombre plus élevé de variants. C'est plus particulièrement le cas dans les Pyrénées (dont les moutons testés dans cette étude sont originaires et qui étaient bien des moutons transhumants) et dans le massif alpin ; ii/ par l'occurrence d'évènements plus fréquents de variations génétiques chez les moutons. En effet, contrairement à ce qui est connu pour les bovins, ils peuvent être infectés de façon persistante (Thomas *et al.* 2012). Cette dernière hypothèse suggère que les VNTR que nous avons sélectionnés peuvent subir des variations *in vivo*, notamment à cause de la pression exercée par le système immunitaire de l'hôte. Aucune variation n'a pu être détectée chez la souche humaine Webster après un an de culture sur cellules HL-60 (environ huit passages), renforçant ainsi l'hypothèse du rôle du système immunitaire de l'hôte dans la sélection de ces variants. Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire de suivre l'évolution des VNTR durant une infection *in vivo*. Cependant, ces expérimentations sont difficiles à mettre en œuvre car elles nécessitent l'utilisation de modèles animaux.

Étude de la circulation d'*A. phagocytophilum* chez les ruminants sauvages et domestiques

Les résultats obtenus au cours des études par MLVA suggèrent que le cerf élaphe pourrait jouer le rôle de réservoir pour les variants circulant chez les ruminants domestiques, contrairement au chevreuil. En effet, les variants issus des chevreuils inclus dans cette étude appartiennent à un groupe différent de celui des variants présents chez le cerf élaphe et les ruminants domestiques (bovins et moutons) testés. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus au cours de l'étude par MLSA. Au contraire, les variants de cerf élaphe analysés lors de l'étude par MLVA appartiennent au même groupe que ceux circulant chez les ruminants domestiques inclus dans ce travail. Comme nous avons été dans l'impossibilité de tester des échantillons de cerf élaphe au cours de l'étude par MLSA, ce résultat n'a malheureusement pu être confirmé par cette technique. Du fait des biais affectant l'échantillonnage testé par MLVA et du nombre limité d'échantillons obtenus à partir des ruminants sauvages, ces résultats doivent cependant être interprétés prudemment, même si de nombreuses données disponibles dans la littérature vont dans le sens de notre hypothèse. Premièrement, un mouton inoculé avec une souche de cerf a développé des symptômes d'anaplasmose granulocytaire (Stuen *et al.* 2010). Deuxièmement, les cerfs élaphe présentent une prévalence d'infection par *A. phagocytophilum* très élevée dans de nombreux pays européens (Stuen *et al.* 2013). En France, une étude récente a estimé la séroprévalence à 80% chez les cerfs élaphe en Corrèze (Zehnter, 2013). Enfin, durant les 20 dernières années, la population de cerfs élaphe a été multipliée par trois en France (ONCFS, 2013). Malheureusement, aucune donnée

permettant de relier l'augmentation de la population de cerfs élaphe à celle de l'incidence de l'anaplasmose granulocytaire n'est disponible à l'heure actuelle.

Afin de confirmer si le cerf élaphe est un réservoir pour les variants circulant chez les ruminants domestiques, des études complémentaires sont indispensables. Il serait notamment nécessaire d'obtenir des échantillons supplémentaires de cerfs élaphe et de chevreuils, provenant des mêmes zones géographiques que les échantillons de bovins testés. Afin d'évaluer le rôle des autres animaux de la faune sauvage (tels que le sanglier, le hérisson ou les rongeurs par exemple), il faudrait également effectuer des prélèvements sur ces espèces.

DISCUSSION

Comparaison des techniques MLSA et MLVA

La comparaison des résultats obtenus sur les mêmes échantillons avec les techniques MLSA et MLVA révèle que la technique MLSA a permis de mettre en évidence un cycle épidémiologique propre aux souches de ruminants domestiques parmi les souches testées, qui n'a pas été mis en évidence par la technique MLVA. Comme nous n'avons pas pu inclure d'échantillons de cerf élaphe lors de notre approche par MLSA, il est possible que cet animal soit un réservoir impliqué dans ce cycle épidémiologique, comme le suggèrent les résultats obtenus par MLVA. Il est également possible que la technique MLVA soit trop résolutive dans cette situation, elle n'a d'ailleurs pas la prétention de se substituer à la technique MLSA pour les analyses de phylogénie. Cependant, cette forte résolution présente des avantages, notamment parce que la technique MLVA permet clairement de mettre en évidence une diversité plus importante que la technique MLSA au sein des échantillons de bovins. De plus, des divergences sont observées entre les deux techniques pour les échantillons provenant de chevaux et de chiens : la technique MLSA regroupe ces souches avec des souches infectant les bovins, alors que la technique MLVA les sépare en trois groupes différents. Ceci pourrait être imputable au fait que la technique MLVA a un pouvoir discriminant plus important que la technique MLSA, et pourrait donc permettre de révéler des groupes de souches non détectés par MLSA. Surtout, le faible nombre d'échantillons de chiens et de chevaux testés dans les deux études incite à la prudence quant à la pertinence des résultats obtenus et pourrait également expliquer cette divergence de résultats. Ces observations suggèrent qu'en fonction de la problématique considérée (identification des réservoirs, circulation des souches entre différentes espèces animales, suivi des souches au sein d'un même troupeau...), l'utilisation de l'une et/ou l'autre des deux techniques est plus appropriée. Afin de guider ce choix, voire d'établir des protocoles en fonction des situations, les performances de chaque technique doivent être comparées. En confrontant les deux jeux de données obtenus à partir de nos prélèvements communs, nous souhaitons com-

parer le pouvoir discriminant des techniques MLVA et MLSA, ainsi que leur pertinence épidémiologique et phylogénique.

Hypothèses actuelles sur les cycles touchant les animaux domestiques

Les deux études réalisées nous ont permis de suspecter l'existence d'au moins deux cycles épidémiologiques distincts d'*A. phagocytophilum* chez les ruminants en France. Le premier impliquerait le chevreuil en tant que réservoir. Les variants d'*A. phagocytophilum* circulant au sein de ce premier cycle ne semblent pas, ou de façon très peu fréquente, infecter les ruminants domestiques (2% environ des souches dans l'étude par MLSA).

Les bovins sont impliqués dans le second cycle épidémiologique que nous avons potentiellement identifié. A l'heure actuelle, il reste cependant à déterminer s'ils jouent seulement le rôle d'hôtes accidentels dans ce cycle ou s'ils sont également des hôtes réservoirs. Si les bovins se révélaient être seulement des hôtes accidentels, le cerf élaphe pourrait être l'un des réservoirs impliqués dans ce cycle, comme le suggèrent les résultats obtenus par MLVA. Dans le cas contraire, il est possible qu'il existe un troisième cycle épidémiologique impliquant les bovins comme hôtes accidentels et le cerf élaphe comme hôte réservoir.

Afin i/ d'identifier clairement le(s) réservoir(s) des souches de ruminants domestiques en France, ii/ de confirmer ou d'infirmer le rôle de réservoir du cerf et des bovins et iii/ d'identifier d'autres acteurs impliqués dans le(s) cycle(s) épidémiologique(s) des variants infectant les ruminants domestiques, il apparaît maintenant nécessaire de tester par MLVA et MLSA des prélèvements provenant d'animaux sauvages et domestiques de la même région, et de régions différentes.

Quelles mesures de prévention et de lutte peuvent être mises en place pour contrôler la propagation de l'anaplasmose granulocytaire ?

La mise en place d'une antibiothérapie a montré son efficacité afin de lutter contre l'infection à *A. phagocytophilum* lorsqu'un/des cas d'anaplasmose granulocytaire est/sont détecté(s) dans un élevage : chez les bovins, un traitement par l'oxytétracycline (10mg/kg/jour) durant au moins trois jours est recommandé. Cependant, le caractère peu spécifique des signes cliniques rend le diagnostic d'anaplasmose granulocytaire difficile. Des antibiotiques peuvent donc être utilisés sans preuve réelle de l'infection. En outre, la dose d'oxytétracycline apparemment efficace contre *A. phagocytophilum* est le double de la dose normale utilisée (soit 20 mg/kg). Un tel traitement est donc susceptible d'exercer une forte pression de sélection sur les bactéries résistantes hébergées par les vaches traitées. Dans le contexte actuel où une réduction de l'utilisation d'antibiotiques est souhaitable, tant en médecine humaine que vétérinaire, il semble nécessaire de développer des approches

préventives. Des stratégies vaccinales basées sur la reconnaissance des protéines membranaires, telles que msp2, ont été envisagées pour protéger les animaux domestiques contre l'infection par *A. phagocytophilum* (Yu *et al.* 2012). Cependant, la diversité des souches infectant les bovins, ainsi que la forte variabilité génétique observée sur les gènes codant les protéines membranaires et la rapidité d'évolution des souches, pourraient limiter l'efficacité de cette couverture vaccinale.

A. phagocytophilum étant une bactérie très majoritairement transmise par les tiques, la lutte anti-vectorielle apparaît comme une première approche préventive de choix afin de contrôler la propagation de l'anaplasmose granulocytaire. Cependant, au vu des difficultés d'application de cette approche sur le terrain et du risque d'apparition de résistances aux acaricides, des approches alternatives sont nécessaires. Quant à la recherche sur la mise au point de vaccins anti-tiques, susceptibles d'interagir avec la capacité des tiques à se gorger sur leurs hôtes et/ou à transmettre des agents pathogènes dont *A. phagocytophilum*, elle débute seulement (De La Fuente *et al.* 2013).

L'identification des hôtes réservoirs des souches bovines pourrait aider à la mise en place de moyens de prévention de cette maladie, par exemple en limitant autant que possible les contacts entre ce(s) réservoir(s) et les bovins et/ou en envisageant de réduire leur population. Ce type d'approche a déjà été préconisé en France pour l'agent de la tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis*, compte tenu de l'émergence de l'infection au sein de la faune sauvage. Des recommandations relatives à la surveillance et à la lutte (régulation des populations de cerfs et de sangliers en adaptant les plans de chasse, réduction de leur accès aux ressources alimentaires, abattage ciblé des animaux....) ont été émises par l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES, 2013). Si le rôle de réservoir du cerf pour *A. phagocytophilum* était avéré, de telles actions pourraient indirectement contribuer à la lutte contre l'anaplasmose granulocytaire.

CONCLUSION

Les résultats récemment acquis sur l'épidémiologie de l'infection par *A. phagocytophilum* soulignent l'importance de la caractérisation génétique des agents pathogènes multi-hôtes pour appréhender la contribution des différentes espèces aux cycles épidémiologiques. Ces connaissances sont nécessaires pour élaborer des plans de gestion visant à limiter la propaga-

tion de la maladie. L'approche *One Health* qui vise à grouper les études de médecine humaine et vétérinaire et à élaborer une gestion globale des épidémies en incluant tous les acteurs des cycles épidémiologiques, semble la plus appropriée pour élaborer des mesures de prévention et de contrôle contre cette maladie, incluant la prise en compte des facteurs de risque.

BIBLIOGRAPHIE

- Akkoyunlu M, Malawista SE, Anguita J, Fikrig E. Exploitation of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Infection and Immunity* 2001; 69: 5577-88.
- Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Parpaglia MLP, et al. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71: 6418-422.
- André JB & Gandon S. Vaccination, within-host dynamics, and virulence evolution. *Evolution* 2006; 60: 13-23.
- ANSES : La tuberculose bovine [en ligne]. Disponible sur: <<https://www.anses.fr/fr/content/la-tuberculose-bovine>>. Mis à jour le 04/06/2013.
- Azzag N, Haddad N, Durand B, Petit E, Ammouche A, Chomel B, Boulouis H-J. Population Structure of *Bartonella henselae* in Algerian Urban Stray Cats. *PLoS One* 2012;7(8):e43621. doi: 10.1371/journal.pone.0043621.
- Bouchouicha R, Boulouis H-J, Berrich M, Monteil M, Chomel B, Haddad N. Comparison of the performances of MLVA vs. the main other typing techniques for *Bartonella henselae*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 15 Suppl 2:104-5.
- Bown KJ, Begon M, Bennett M, Birtles RJ, Burthe S, Lambin X et al. Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom? *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2006; 6: 404-10.
- Bown K, Lambin X, Ogden N, Petrovec M, Shaw S, Woldehiwet Z et al. High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 1771 - 6.
- Bown KJ, Lambin X, Ogden NH, Begon M, Telford G, Woldehiwet Z et al. Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, Discrete enzootic cycles. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15: 1948-54.
- Bown K, Lambin X, Telford G, Heyder-Bruckner D, Ogden N, Birtles R. The common shrew (*Sorex araneus*): a neglected host of tick-borne infections? *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011; 11: 947 - 53.
- Carrade D, Foley J, Borjesson D, Sykes J. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med*. 2009; 23: 1129 - 41.
- Chastagner A, Bailly X, Leblond A, Pradier S, Vourc'h G. Single genotype of *Anaplasma phagocytophilum* identified from ticks, Camargue, France. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19: 825-6.
- Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 589-95.
- De La Fuente J, Moreno-Cid JA, Galindo RC, Almazan C, Kocan KM, Merino O et al. Subolesin/Akirin vaccines for the control of arthropod vectors and vectorborne pathogens. *Transbound Emerg Dis*. 2013; 60 (Suppl 2):172-8.
- Dugat T, Chastagner A, Lagrée A-C, Petit E, Durand B, Thierry S et al. A new Multiple-locus variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) reveals different clusters for *Anaplasma phagocytophilum* circulating in domestic and wild ruminants. *Parasites & Vectors* 2014a; 7:439.
- Dugat T, Loux V, Marthey S, Moroldo M, Lagrée AC, Boulouis HJ et al. Comparative genomics of first available bovine *Anaplasma phagocytophilum* genome obtained with targeted sequence capture. *BMC Genomics* 2014b; 15:973.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, 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. *Int J Systematic and Evol Microbiol*. 2001; 51: 2145-65.
- Dziegiel B, Adaszek L, Kalinowski M, Winiarczyk S. Equine granulocytic anaplasmosis. *Res Vet Sci*. 2013; 95(2): 316-20.
- Foggie A. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J Pathol Bacteriol*. 1951; 63: 1-15.
- Galindo RC, Ayllon N, Smerdel KS, Boadella M, Beltran-Beck B, Mazariegos M et al. Gene expression profile suggests that pigs (*Sus scrofa*) are susceptible to *Anaplasma phagocytophilum* but control infection. *Parasit Vectors* 2012; 5: 181.
- Granquist EG, Bardsen K, Bergstrom K, Stuen S. Variant -and individual dependent nature of persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Acta Vet Scand*. 2010; 52:25.
- Granquist EG, Stuen S, Lundgren AM, Braten M, Barbet AF. Outer membrane protein sequence variation in lambs experimentally infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun*. 2008; 76: 120-6.
- Gribble DH. Equine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc*. 1969; 155: 462-9.
- Huhn C, Winter C, Wolfsperger T, Wüppenhorst N, Smerdel KS, Skuballa J et al. Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. *Plos One*. 2014; 9:e93725.
- Inokuma H, Terada Y, Kamio T, Raoult D, Brouqui P. Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 ; 8(2):241-4.
- Joncour G, Pouliquen G, Kaufmann P, Mayaux P. *Anaplasma phagocytophilum*, agent de l'ehrlichiose granulocytaire bovine (EGB) et avortements chez les bovins. *Bulletin des GTV*. 2006 ; 25: 95 -104.
- Kocan KM, Busby AT, Allison RW, Breshears MA, Coburn L, Galindo RC, et al. Sheep experimentally infected with a human isolate of *Anaplasma phagocytophilum* serve as a host for infection of *Ixodes scapularis* ticks. *Ticks Tick Borne Dis*. 2012; 3: 147-153.
- Koebel C, Kern A, Edouard S, Hoang AT, Celestin N, Hansmann Y et al. Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: cli-

- nical presentation and laboratory diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 72: 214-8
- Ladbury GAF, Stuen S, Thomas R, Bown KJ, Woldehiwet Z, Granquist EG, *et al.* Dynamic transmission of numerous *Anaplasma phagocytophilum* genotypes among lambs in an infected sheep flock in an area of anaplasmosis endemicity. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 1686-91.
 - Lin M, Den Dulk-Ras A, Hooykaas PJJ, Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. *Cellular Microbiology.* 2007; 9: 2644-57.
 - Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 2005; 26:2567–82.
 - Macleod J & Gordon WS. Studies in tick-borne fever of sheep. I. Transmission by the tick, *Ixodes ricinus*, with a description of the disease produced. *Parasitology* 1933; 25: 273-83.
 - Madewell BR & Gribble DH. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *J Am Vet Med Assoc.* 1982; 180: 512-14.
 - Majzaki J, Wuppenhorst N, Hartelt K, Birtles R, von Loewenich F. *Anaplasma phagocytophilum* strains from voles and shrews exhibit specific ankA gene sequences. *BMC Vet Res.* 2013; 9: 235.
 - Massung RF, Priestley RA, Miller NJ, Mather TN, Levin ML. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *J Infect Dis.* 2003; 188: 1757-63.
 - Michalik J, Stanczak J, Cieniuch S, Racewicz M, Sikora B, Dabert M. Wild Boars as Hosts of Human-Pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* Variants. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 998-1001.
 - Monteil M, Durand B, Bouchouicha R, Petit E, Chomel B, Arvand *et al.* Development of discriminatory multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Bartonella henselae*. *Microbiol Read Engl.* 2007; 153:1141–8.
 - Neelakanta G, Sultana H, Fish D, Anderson JF, Fikrig E. *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *J Clin Invest.* 2010; 120: 3179-90.
 - Ogden NH, Casey AN, French NP, Bown KJ, Adams JD, Woldehiwet Z. Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep 'carriers' to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks. *Parasitology* 2002a; 124: 127-36.
 - Ogden NH, Casey AN, French NP, Adams JD, Woldehiwet Z. Field evidence for density-dependent facilitation amongst *Ixodes ricinus* ticks feeding on sheep. *Parasitology* 2002b; 124: 117-25.
 - Ogden NH, Casey AN, Woldehiwet Z, French NP. Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection. *Infect Immun.* 2003; 71: 2071-8.
 - ONCFS RO sauvages: Lettre d'information du réseau Ongulés sauvages, n°17 Janvier 2013. 2013.
 - ONCFS RO sauvages: Tableaux de chasse ongulés sauvages saison 2012–2013. 2013.
 - Pilet H, Vachiéry N, Berrich M, Bouchouicha R, Durand B, Pruneau L *et al.* A new typing technique for the Rickettsiales *Ehrlichia ruminantium*: Multiple-locus variable number tandem repeat analysis. *J Microbiol Methods* 2012; 88:205–11.
 - Rejmanek D, Foley P, Barbet A, Foley J. Antigen variability in *Anaplasma phagocytophilum* during chronic infection of a reservoir host. *Microbiology* 2012; 158: 2632-41.
 - Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nature Reviews Microbiology* 2010; 8: 328-39.
 - Rikihisa Y, Lin M, Niu H. Type IV secretion in the obligatory intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol.* 2010; 12: 1213 - 21.
 - Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Microbiol Reviews* 2011; 24(3): 469-89.
 - Rymaszevska A. Divergence within the marker region of the groESL operon in *Anaplasma phagocytophilum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; 27: 1025 - 36.
 - Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Petrovec M, Schaarschmidt-Kiener D, Liebisch G, *et al.* Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 790-6.
 - Shukla SK, Aswani V, Stockwell PJ, Reed KD. Contribution of Polymorphisms in ankA, gltA, and groESL in Defining Genetic Variants of *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2312-5.
 - Silaghi C, Skuballa J, Thiel C, Pfister K, Petney T, Pfaffle M, *et al.* The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) - A suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*?» *Ticks and Tick-Borne Dis.* 2012; 3: 49-54.
 - Stuen S. *Anaplasma Phagocytophilum* - the Most Widespread Tick-Borne Infection in Animals in Europe. *Vet Res Comm.* 2007; 31: 79-84.
 - Stuen S, Casey AN, Woldehiwet Z, French N, Ogden N. Detection by the polymerase chain reaction of *Anaplasma phagocytophilum* in tissues of persistently infected sheep. *J Comp Pathol.* 2006; 134: 101-4.
 - Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum* - a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2013; 3:31. doi: 10.3389/fcimb.2013.00031
 - Stuen S, Grova L, Granquist EG, Sandstedt K, Olesen I, Steinshamn H. A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological responses after experimental infection with *Anaplasma phagocytophilum* in two Norwegian sheep breeds. *Acta Vet Scand.* 2011; 53:8.
 - Stuen S, Nevland S, Moum T. Fatal cases of Tick-borne fever (TBF) in sheep caused by several 16S rRNA gene variants of *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 990: 433-4.
 - Stuen S, Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Bergström K, von Loewenich FD. Experimental infection in lambs with a red deer (*Cervus elaphus*) isolate of *Anaplasma phagocytophilum*. *J Wildl Dis.* 2010; 46:803–9.
 - Sukumaran B, Narasimhan S, Anderson JF, DePonte K, Marcantonio N, Krishnan MN, *et al.* An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. *J Exp Med.* 2006; 203: 1507-17.
 - Teglas M & Foley J. Differences in the transmissibility of two *Anaplasma phagocytophilum* strains by the North American tick vector species, *Ixodes pacificus* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae).» *Exp Appl Acarol.* 2006; 38: 47-58.
 - Telford SR, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 6209-14.
 - Thomas RJ, Birtles RJ, Radford AD, Woldehiwet Z. Recurrent bacteraemia in sheep infected persistently with *Anaplasma phagocytophilum*. *J Comp Pathol.* 2012; 147: 360-7.
 - Torina A, Alongi A, Naranjo V, Estrada-Pena A, Vicente J, Scimeca S, *et al.* Prevalence and Genotypes of *Anaplasma* Species and Habitat Suitability for Ticks in a Mediterranean Ecosystem. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74: 7578-84.
 - Viana M, Mancy R, Biek R, Cleaveland S, Cross PC, Lloyd-Smith JO, *et al.* Assembling

- evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends in Ecology & Evolution*. 2014; 29:270-9.
- von Loewenich F, Baumgarten B, Schroppel K, Geiszdorfer W, Rollinghoff M, Bogdan C. High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 5033- 40.
 - Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol*. 2010; 167: 108-22.
 - Woldehiwet Z & Scott GR. Stages in the development of Cytoecetes phagocytophila, the causative agent of tick-borne fever. *J Comp Pathol*. 1982; 92: 469-74.
 - Woldehiwet Z. Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. *Vet J*. 2008; 175: 37-44.
 - Yoshiie K, Kim HY, Mott J, Rikihisa Y. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. *Infect Immun*. 2000; 68: 1125-33.
 - Yu Q, Chen CF, Q, Chen Q, Zhang. Expression and immunogenicity of recombinant immunoreactive surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Vaccine Immunol*. 2012; 19(6): 919-23.
 - Zhaoqing Y, Miao J, Huang Y, Li X, Putaporntip C, Jongwutiwes S *et al*. Genetic structures of geographically distinct *Plasmodium vivax* populations assessed by PCR/RFLP analysis of the merozoite surface protein 3 β gene. *Acta Tropica* 2006; 100 :205-12.
 - Zehnter A. Etude épidémiologique de maladies bactériennes vectorisées sur la faune sauvage et les bovins de Corrèze. Thèse de Doctorat vétérinaire, Alfort. Créteil : Université Paris-Est Créteil Val de Marne 2013.102p.