VETAGRO SUP CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2012 - Thèse n°

SEROPREVALENCE DES MALADIES VECTORIELLES TRANSMISES PAR LES TIQUES CHEZ LE CHIEN EN FRANCE : IMPORTANCE DU GENRE ANAPLASMA

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) et soutenue publiquement le 7 décembre 2012 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

SUCHET Aurore Né (e) le 16 janvier 1987 à Reims (51)





VETAGRO SUP CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2012 - Thèse n°

SEROPREVALENCE DES MALADIES VECTORIELLES TRANSMISES PAR LES TIQUES CHEZ LE CHIEN EN FRANCE : IMPORTANCE DU GENRE ANAPLASMA

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) et soutenue publiquement le 7 décembre 2012 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

SUCHET Aurore Né (e) le 16 janvier 1987 à Reims (51)





ENSEIGNANTS CAMPUS VETERINAIRE DE VETAGRO SUP

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
ALOGNINOUWA	Théodore	Professeur 1ere cl	Pathologie du bétail
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
ARCANGIOLI	Marie-Anne	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
ARTOIS	Marc	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BECKER	Claire	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
BELLI	Patrick	Maître de conférences associé	Pathologie morphologique et clinique
BELLUCO	Sara	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences cl normale	Equine
BENOIT	Etienne	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BERNY	Philippe	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
BOULOCHER	Caroline	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
BOURDOISEAU	Gilles	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
BRUYERE	Pierre	Maître de conférences Contractuel	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BUFF	Samuel	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BURONFOSSE	Thierry	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
CACHON	Thibaut	Maître de conférences Contractuel	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CADORE	Jean-Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
CAROZZO	Claude	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CHABANNE	Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CHALVET-MONFRAY	Karine	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
COMMUN	Loic	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
DEMONT	Pierre	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
DESJARDINS PESSON	Isabelle	Maître de conférences Contractuel	Equine
DJELOUADJI	Zoré e	Maître de conférences stagiaire	Santé Publique et Vétérinaire
ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences ci normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
FAU	Didier	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
FOURNEL	Corinne	Professeur 1ere cl	Pathologie morphologique et clinique
FRANCK	Michel	Professeur 1ere cl	Gestion des élevages
FRIKHA	Mohamed- Ridha	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
GANGL	Monika	Maître de conférences Contractuel	Equine
GARNIER	François	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
GENEVOIS	Jean-Pierre	Professeur cl ex	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur 2eme cl	Biologie Fonctionnelle
GONTHIER	Alain	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GRAIN	Françoise	Professeur 2eme cl	Gestion des élevages
GRANCHER	Denis	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
GREZEL	Delphine	Maître de conférences ci normale	Santé Publique et Vétérinaire
GUERIN_	Pierre	Professeur 2eme cl	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	Maitre de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
HUGONNARD	Marine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie

ENSEIGNANTS CAMPUS VETERINAIRE DE VETAGRO SUP

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
TONUL	Stéphane	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
KECK	Gérard	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
KODJO	Angeli	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LACHERETZ	Antoine	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
LAMBERT	Véronique	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
LE-GRAND	Dominique	Maître de conférences hors cl	Pathologie du bétail
LEBLOND	Agnes	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences di normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
LEPAGE	Olivier	Professeur 1ere cl	Equine
LOUZIER	Vanessa	Maître de conférences cl normale	Biologie Fonctionnelle
MARCHAL	Thierry	Maître de conférences hors cl	Pathologie morphologique et clinique
MIALET	Sylvie	Inspecteur de la santé publique vétérinaire (ISPV) faisant fonction de MC	Santé Publique et Vétérinaire
MOUNIER	Luc	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
PEPIN	Michel	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
PIN	Didier	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
PONCE	Frédérique	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
PORTIER	Karine	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
PROUILLAC	Caroline	Maître de conférences cl normale	Biologie fonctionnelle
REMY	Denise	Professeur 2eme cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
ROGER	Thierry	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SABATIER	Philippe	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
SAWAYA	Serge	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SERGENTET	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
THIEBAULT	Jean-Jacques	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
VIGUIER	Eric	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	Maître de conférences Contractuel	Pathologie morphologique et clinique
ZENNER	Lionel	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Pierre KROLAK-SALMON,

De la faculté de Médecine de Lyon,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Qu'il reçoive ici l'expression de ma gratitude et de mes hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Luc CHABANNE,

Du Campus Vétérinaire de VetAgro-Sup,

Qui a accepté de m'encadrer et de me guider dans la réalisation de ce travail,

Que lui soit témoignés ici mon profond respect et ma sincère reconnaissance pour son attention et sa disponibilité.

A Monsieur le Professeur Gilles BOURDOISEAU,

Du Campus Vétérinaire de VetAgro-Sup,

Qui m'a fait l'honneur de participer à ce jury et de juger mon travail,

Profonds remerciements.

A Christophe LESUEUR,

Du Laboratoire BAYER®,

Qui m'a offert de participer à ce projet,

Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

A toute la Jeune Equipe Hémopathogènes Vectorisés,

Du Campus Vétérinaire de VetAgro-Sup,

En particulier Magalie, Jeanne et Raphaël

Pour leur accueil et leur aide précieuse pour l'échantillonnage des cas et la réalisation des tests 4Dx®,

Remerciements chaleureux.

A mes parents, pour les valeurs et la persévérance que vous m'avez transmises, sans lesquelles je ne serais pas parvenue au bout de toutes ces années d'études. Pour votre amour et votre soutien sans faille, je vous dis un énorme merci!

A ma sœur, qui a toujours été à mes côtés et m'a soutenue dans toutes les étapes de ce parcours. Pour ta joie de vivre, les merveilleux moments que l'on passe ensemble tous les jours, et parce qu'on se comprend tout simplement.

A mon frère, pour ta présence, ton humour et ta générosité. Que la route que tu as enfin choisie t'apporte joie et satisfaction!

A mes grands-parents, pour leur gentillesse, leurs encouragements, pour tous les moments qu'il nous reste à partager! Que vous gardiez votre pêche éternellement!

A mes oncles et tantes, pour leur joie de vivre si particulière, tous les Noëls mémorables passés ensemble, votre accueil chaleureux aux quatre coins de la France, et parce que sans vous la famille ne serait pas ce qu'elle est!

A mes cousins, qui ont mis un moment à pointer le bout de leur nez, je vous souhaite le meilleur!

A Sophie, Julie, Justine, mes amies de longue date, pour toutes ces années passées ensemble, les vacances, les moments forts au poney-club du Galinay, que les années à venir avec vous soient aussi riches que celles qui se sont écoulées! Bonne chance dans vos vies et vos voies respectives!

A mes amis vétos, Joh', Nono, Ninie, Yonyon, Laurette, et Gersou, pour ces 5 années mémorables passées ensemble, pour tous les souvenirs que l'on s'est forgé, et tous ceux qu'il nous reste à vivre! Pour votre énorme soutien dans tous les domaines, merci, je vous adore.

A Isabelle et Eugénie, mes chères poulottes, qui ont toutes les deux accepté de garder mon fauve, pour leur gentillesse et leur sourire. En espérant que vous vous épanouissiez dans ce métier.

A Guillaume, qui a collaboré avec moi sur une grande partie de ce projet, pour son aide et tout le reste, merci!

A mon ancien Jeremy, qui m'a montré la voie et a toujours été là, même discrètement.

A mon chat Frimousse, qui depuis presque trois ans m'apporte tant de bonheur, et plus généralement à tous ces animaux, qui me surprennent tous les jours et me donnent envie de continuer dans cette voie.

TABLE DES MATIERES

RE	MERCIEMENTS	5
<u>TA</u>	BLE DES MATIERES	7
LIS	TE DES FIGURES ET ILLUSTRATIONS	12
<u>LIS</u>	TE DES TABLEAUX	13
LIS	TE DES ABREVIATIONS	14
<u>IN1</u>	TRODUCTION	15
<u>PA</u>	RTIE 1. SYNTHESE DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	17
<u>CH.</u>	APITRE 1. LES ANAPLASMOSES : GENERALITES	17
ı.	LE GENRE ANAPLASMA	
A.	TAXONOMIE	18
1.	Ancienne classification (avant 2001)	18
2.	Nouvelle classification	19
В.	CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DU GENRE ANAPLASMA	21
1.	Morphologie	21
2.	Cycle de développement	22
3.	Culture	22
4.	Propriétés antigéniques	22
II.	LES VECTEURS : GENERALITES SUR LES TIQUES DURES	24
A.	Systematique	24
В.	Morphologie	25
C.	CYCLE DE DEVELOPPEMENT	25
D.	INTERACTIONS AVEC L'HOTE : LE CHIEN	27
1.	Recherche de l'hôte	27
2.	Fixation et gorgement	28
3.	Rôle pathogène direct : effets de la morsure de tique	28
a)	Action mécanique, anticoagulante et allergisante	28
b)	Action toxique	29
c)	Action spoliatrice	29
4.	Transmission des bactéries du genre Anaplasma de la tique à l'hôte	30
a)	Contamination de la tique	30
b)	Contamination de l'hôte	31
Ε.	INFECTIONS CONCOMITANTES	32
F.	ACTIVITE SAISONNIERE	33
G.	Controle	34

1.	Lutte écologique	34
2.	Lutte chimique	34
3.	Lutte biologique	35
4.	Lutte génétique	35
5.	Retrait de la tique de l'hôte	35
6.	Prophylaxie médicale	35
CH.	APITRE 2. ANAPLASMOSE CANINE GRANULOCYTAIRE A ANAPLASMA PHAGOCYTO	<u> </u>
ı.	BACTERIOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE	39
Α.	BACTERIOLOGIE	39
В.	EPIDEMIOLOGIE	41
1.	Répartition géographique	41
2.	Vecteurs et modes de transmission	41
a)	Particularités du genre <i>Ixodes ricinus</i>	42
b)	D'autres vecteurs sont-ils possibles ?	45
c)	Modes de transmission secondaires	45
3.	Espèces sensibles et réservoirs	45
4.	Infections concomitantes	46
5.	Saisonnalité	47
6.	Facteurs de réceptivité	48
a)	Facteurs intrinsèques	48
b)	Facteurs extrinsèques	48
II.	EXPRESSION CLINIQUE	48
A.	SYMPTOMES	48
В.	Signes biologiques	49
1.	Hémogramme	49
2.	Modifications biochimiques	50
3.	Modifications histologiques	50
C.	EVOLUTION	50
III.	PATHOGENIE	50
A.	CYCLE DE DEVELOPPEMENT ET STRATEGIES	50
В.	POUVOIR IMMUNOGENE ET ANTIGENIQUE	55
1.	Protéine majeure de surface Msp2(p44)	55
2.	Autres protéines de surface	56
C.	POUVOIR PATHOGENE ET PHYSIOPATHOLOGIE	57
D.	MISE EN JEU D'UNE REPONSE IMMUNITAIRE CELLULAIRE ET HUMORALE	58
IV.	DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE	59
Α.	METHODES DIRECTES	59
1.	Cytologie : recherche de morulae sur frottis sanguin	59
2.	PCR (Polymerase Chain Reaction)	60
3.	Culture	61
В.	METHODE INDIRECTE: SEROLOGIE	61
C.	CONDUITE A TENIR	62

٧.	TRAITEMENT DE LA MALADIE	63
VI.	PROPHYLAXIE	64
VII.	POTENTIEL ZOONOTIQUE	65
Α.	Problematique	65
B.	HISTORIQUE	65
C.	IMPORTANCE	66
D.	RESERVOIRS	66
E.	SYMPTOMES CHEZ L'HOMME	67
F.	FACTEURS FAVORISANTS	67
G.	ROLE DU CHIEN DANS L'EPIDEMIOSURVEILLANCE	67
	APITRE 3. ANAPLASMOSE PLAQUETTAIRE CANINE OU THROMBOPENIE	
I.	BACTERIOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE	69
Α.	BACTERIOLOGIE	69
B.	EPIDEMIOLOGIE	70
1.	Répartition géographique et saisonnière	70
2.	Vecteurs et mode de transmission	71
a)	Mode de transmission et réservoirs	71
b)	Particularités du genre Rhipicephalus sanguineus	72
3.	Population infectée et infections concomitantes	77
4.	Facteurs favorisants	77
II.	PATHOGENIE	78
III.	EXPRESSION CLINIQUE	79
A.	SYMPTOMES	79
B.	MODIFICATIONS HISTOLOGIQUES	81
IV.	DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE	81
Α.	METHODES DIRECTES	81
1.	Cytologie: recherche de morulae sur frottis sanguin	81
2.	PCR (Polymerase Chain Reaction)	82
3.	Culture	82
В.	METHODE INDIRECTE: SEROLOGIE	82
٧.	TRAITEMENT DE LA MALADIE	84
VI.	PROPHYLAXIE	85
VII	POTENTIEL ZOONOTIOLIE	85

PARTIE 2. ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DU GENRE ANAPLASMA CHEZ LE CHIEN EN FRANCE ..87

<u>CH/</u>	APITRE 1. CADRE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	87
I.	LE POINT SUR LES ETUDES DE PREVALENCE DES ANAPLASMOSES CANINES EN EUROPE ET EN FRAN	CE87
A.	Prevalence du genre <i>Anaplasma</i> chez les tiques	
В.	Prevalence des anaplasmoses chez le chien	87
1.	Anaplasmose granulocytaire canine à Anaplasma phagocytophilum	88
2.	Thrombopénie infectieuse cyclique à Anaplasma platys	
C.	PART DES ANAPLASMOSES PAR RAPPORT AUX AUTRES MALADIES TRANSMISES PAR LES TIQUES CHE	
	FRANCE	89
II.	INTERETS DE L'ETUDE	91
III.	OBJECTIFS DE L'ETUDE	92
<u>CH</u>	APITRE 2. MATERIEL ET METHODES	92
I.	DEROULEMENT GENERAL	92
II.	POPULATION CANINE INCLUE DANS L'ETUDE	93
A.	CRITERES D'INCLUSION POUR LE TEST SEROLOGIQUE 4DX®	93
1.	Population P1	93
2.	Population P2	93
В.	RECUEIL DES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	94
C.	EXAMEN CLINIQUE GENERAL	94
D.	REALISATION D'UN FROTTIS SANGUIN	94
III.	METHODE D'ANALYSE SEROLOGIQUE	94
A.	PRINCIPE DU SNAP® TEST 4Dx® IDEXX	94
В.	INTERPRETATION DES RESULTATS	95
<u>CH</u>	APITRE 3. RESULTATS	96
I.	RESULTATS DE L'ANALYSE SEROLOGIQUE A L'AIDE DU TEST 4DX®	96
II.	ANALYSE EPIDEMIOLOGIQUE	97
A.	POPULATION SEROPOSITIVE LORS DU TEST 4Dx®	97
В.	REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET SAISONNIERE	99
1.	Origine des échantillons sanguins inclus dans l'étude sérologique	99
a)	Echantillon total	99
b)	Population P1	99
c)	Cas séropositifs au test 4Dx®	100
2.	Répartition saisonnière	102
a)	Echantillon total et population P1	102
b)	Cas séropositifs au test 4Dx®	103
III.	ANALYSE CLINIQUE	103
A.	SYMPTOMES	103
1.	Cas séropositifs pour Anaplasma phagocytophilum	103

2.	Cas séropositifs pour Ehrlichia canis et Borrelia burgdorferi	103
В.	FROTTIS SANGUIN	105
IV.	. ANALYSE HEMATOLOGIQUE	105
CH	1APITRE 4. DISCUSSION	106
ı.	A PROPOS DE LA SELECTION DES CAS	106
A.	CRITERES CLINIQUES ET HEMATOLOGIQUES DE SUSPICION	106
В.	POPULATION « TEMOIN » P2	107
C.	A PROPOS DE LA PERIODE ET DU LIEU DE RECRUTEMENT DES CAS: REPARTITION GEOGRA	PHIQUE ET SAISONNIERE
1.		
2.	Répartition saisonnière	108
II.	A PROPOS DE LA METHODE POUR APPRECIER LA PREVALENCE DES MALADIES VECTORIE	LLES TRANSMISES PAR LES
	TIQUES CHEZ LE CHIEN EN FRANCE	108
A.	SEROLOGIE SNAP® TEST 4Dx® IDEXX	108
В.		
C.		
III.	·	
	4Dx [®]	
IV.		
A.		
B.	·	
V.	•	
VI.		•
	CHIEN EN FRANCE	114
<u>CO</u>	ONCLUSION	117
<u>AN</u>	NNEXE 1 : FEUILLE DE DONNEES STANDARDISEE POUR CHAQUE CAS INCLUS	DANS L'ETUDE
<u>EXI</u>	(PERIMENTALE	119
<u>AN</u>	NNEXE 2 (A): LE SNAP® TEST 4DX® D'IDEXX	121
AN	NNEXE 2 (B): LE SNAP® TEST 4DX® D'IDEXX	122
ΔΝ	NNEXE 3 : LES DIFFERENTES RACES REPRESENTEES DANS L'ECHANTILLON TO)ΤΔI 123
<u>~14</u>	THERE O . LED DITTERENTED INTOLOTIC INCIDENTAL DANS E CONMITTEEON TO	, , , <u>, , , , , , , , , , , , , , , , </u>
A NI	NNEXE 4 : LES DIFFERENTES RACES REPRESENTEES DANS LA POPULATION P	1 130
AN	VIVEAE 4 : LES DIFFERENTES RACES REPRESENTEES DANS LA POPULATION P.	<u>ı126</u>
	211002421115	
KIR	BLIOGRAPHIF	129

LISTE DES FIGURES ET ILLUSTRATIONS

FIGURE 1: RICKETTSIAE ET CHLAMYDIAE: ANCIENNE CLASSIFICATION (AVANT 1991)	19
FIGURE 2 : NOUVELLE CLASSIFICATION DES BACTERIES DE L'ORDRE DES RICKETTSIALES (D'APRES: BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMA	ATIC
BACTERIOLOGY 2004 (GARRITY ET AL. 2004), SE BASANT SUR LA CLASSIFICATION ETABLIE PAR DUMLER ET AL. EN 2001	.) 20
FIGURE 3 : SYSTEMATIQUE GENERALE DES TIQUES	24
FIGURE 4 : ANATOMIE DU ROSTRE (OU CAPITULUM) DES TIQUES DURES	25
FIGURE 5 : CYCLE DE DEVELOPPEMENT DES TIQUES DE LA SUPERFAMILLE DES <i>IXODOIDEA</i>	26
FIGURE 6 : LESIONS INDUITES PAR L'ACTION DE LA TIQUE (A GAUCHE) ET LES REACTIONS DE L'HOTE (A DROITE)	30
FIGURE 7: EVOLUTION DE L'ACTIVITE DES TIQUES AU COURS DE L'ANNEE	33
FIGURE 8 : OBSERVATION DE MORULAE INTRA-GRANULOCYTAIRES (FLECHE) SUR UN FROTTIS DE SANG PERIPHERIQUE D'UN CHIEN	
Labrador male de 7 ans (barre = $6 \mu M$)	39
FIGURE 9: LES TROIS REPARTITIONS POSSIBLES D'A. PHAGOCYTOPHILUM AU SEIN DES GRANULOCYTES INFECTES	40
FIGURE 10 : IXODES RICINUS (FEMELLE GORGEE)	42
FIGURE 11: IXODES RICINUS NON GORGEES: DE GAUCHE A DROITE: FEMELLE, MALE, NYMPHE ET LARVE (BARRE= 1CM)	42
FIGURE 12 : DUREE DES DIFFERENTES PHASES DU CYCLE BIOLOGIQUE D'IXODES RICINUS	
FIGURE 13: REPARTITION GEOGRAPHIQUE D'IXODES RICINUS EN FRANCE	
FIGURE 14: REPARTITION DES CAS D'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE CANINE AU COURS DE L'ANNEE EN FRANCE, SELON UNE	
ENQUETE MENEE AUPRES DES VETERINAIRES EN 2007	47
FIGURE 15: CYCLE DE DEVELOPPEMENT D'ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM AU SEIN D'UN GRANULOCYTE	
FIGURE 16: FORMATION DES INCLUSIONS D'ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM AU SEIN DU CYTOPLASME DU GRANULOCYTE	
NEUTROPHILE	52
FIGURE 17: DETOURNEMENT DES VOIES DE REGULATION DE LA CELLULE-HOTE AU COURS DE L'INFECTION PAR ANAPLASMA	
PHAGOCYTOPHILUM	54
FIGURE 18 : PRINCIPE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI)	
FIGURE 19: FROTTIS SANGUIN D'UN CHIEN INFECTE PAR ANAPLASMA PLATYS: DEUX MORULAE DE COULEUR BLEUE FONCEE SONT	
VISIBLES AU SEIN D'UN THROMBOCYTE INFECTE (FLECHES). ON PEUT EGALEMENT OBSERVER LES GRANULES NORMALES ROS	
ET PLUS PETITES DANS LE CYTOPLASME DE LA PLAQUETTE INFECTEE (WRIGHT'S-GIEMSA; 100X)	
FIGURE 20 : REPARTITION ANNUELLE DES CAS D'INFECTION CANINE A ANAPLASMA PLATYS SELON UNE ETUDE RETROSPECTIVE REA	
SUR DOUZE CAS EN FRANCE EN 2006	
FIGURE 21 : MALE (A DROITE) ET FEMELLE (A GAUCHE) DE RHIPICEPHALUS SANGUINEUS	
FIGURE 22 : PRINCIPAUX SITES DE FIXATION DE <i>R. SANGUINEUS</i> SUR LE CHIEN. A : TROIS ADULTES FIXES SUR L'OREILLE D'UN CHIEI	
DEUX FEMELLES FIXEES AU NIVEAU DE LA REGION AXILLAIRE C: UNE NYMPHE GORGEE AU NIVEAU DE L'ESPACE INTER-DIGIT	
FIGURE 23: REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE RHIPICEPHALUS SANGUINEUS EN FRANCE	
FIGURE 24 : POURCENTAGE DE PLAQUETTES INFECTEES ET TAUX DE PLAQUETTES CHEZ UN CHIEN AUQUEL ON A INJECTE PAR VOIE	70
INTRAVEINEUSE LA BACTERIE (O EN ABSCISSE REPRESENTE LE JOUR DE L'INOCULATION)	70
FIGURE 25 : COMPARAISON DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DU GENE CODANT L'ARNR 16S DES SOUCHES FRANÇAISES, CHINO	
ET AMERICAINES D'ANAPLASMA PLATYS	
FIGURE 26 : EVOLUTION DU TAUX D'ANTICORPS ANTI- A. PLATYS CHEZ UN CHIEN INJECTE EXPERIMENTALEMENT PAR A. PLATYS A	
FIGURE 27: REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES CHIENS SEROPOSITIFS POUR ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM	
FIGURE 28 : DISPOSITIF SNAP® 4Dx	
FIGURE 29: LES CINQ SPOTS PERMETTANT L'INTERPRETATION DU SNAP® TEST 4Dx	
FIGURE 30 : ORIGINE DES ECHANTILLONS SANGUINS DE L'ENSEMBLE DES CHIENS INCLUS DANS L'ETUDE (323 ECHANTILLONS)	
FIGURE 30: ORIGINE DES ECHANTILLONS SANGUINS DE L'ENSEMBLE DES CHIENS INCLUS DANS L'ETUDE (323 ECHANTILLONS) FIGURE 31: ORIGINE DES ECHANTILLONS SANGUINS DES INDIVIDUS DE LA POPULATION P1 SUSPECTS DE MALADIE VECTORIELLE	99
	100
(249 ECHANTILLONS)	100
FIGURE 32 : ORIGINE DES ECHANTILLONS SANGUINS DES CAS SEROPOSITIFS POUR ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM	404
(4 ECHANTILLONS)	
Figure 33 : Origine des echantillons sanguins des cas seropositifs pour <i>Ehrlichia canis</i> (2 echantillons)	
Figure 34 : Origine des echantillons sanguins des cas seropositifs pour <i>Borrelia burgdorferi</i> (6 echantillons)	
FIGURE 35: REPARTITION DES DATES DE PRISE DE SANG DES 323 CHIENS INCLUS DANS L'ETUDE	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Principales especes du genre <i>Anaplasma</i> et leurs caracteristiques majeurs
TABLEAU II : DELAIS MINIMUM D'INFECTION DE LA TIQUE ET DE L'HOTE POUR QUELQUES BACTERIES
Tableau III : Bacteries transmises par les genres <i>Ixodes</i> et <i>Rhipicephalus</i> en Europe
TABLEAU IV : TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE DE L'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE CANINE
Tableau V: Agents pathogenes transmis par <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
TABLEAU VI : COMPARAISON DU TAUX DE PREVALENCE CLINIQUE DES PRINCIPALES MALADIES EMERGENTES TRANSMISES PAR LES
TIQUES EN FRANCE CHEZ LE CHIEN
Tableau VII : Nombre (et pourcentage) de cas seropositifs pour <i>Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis</i> ,
Borrelia burgdorferi ou possedant des antigenes de Dirofilaria immitis lors du test serologique rapide SNAP®
4Dx® IDEXX9
Tableau VIII : Donnees epidemiologiques des cas seropositifs pour <i>Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis et</i>
Borrelia burgdorferi9
Tableau IX : Age moyen, sexe ratio et poids moyen des individus seropositifs pour <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ,
EHRLICHIA CANIS, BORRELIA BURGDORFERI, L'ECHANTILLON TOTAL ET LES INDIVIDUS DES POPULATIONS P1 ET P2
Tableau X : Nombre de chiens (et pourcentage par rapport aux données connues de la population concernée)
PRESENTANT DES ANOMALIES CLINIQUES POUR LES CAS SEROPOSITIFS POUR ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM, EHRLICHIA CANIS
BORRELIA BURGDORFERI, L'ECHANTILLON TOTAL, LA POPULATION P1 ET LA POPULATION P2
TABLEAU XI : NOMBRE DE CHIENS (ET POURCENTAGE PAR RAPPORT AUX DONNEES CONNUES DE LA POPULATION CONCERNEE)
PRESENTANT DES ANOMALIES HEMATOLOGIQUES POUR LES CAS SEROPOSITIFS POUR ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM,
EHRLICHIA CANIS, BORRELIA BURGDORFERI, L'ECHANTILLON TOTAL ET LA POPULATION P1

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AIAT: Alanine Amino-Transférase

ARN : Acide Ribonucléique

ARN r : Acide Ribonucléique ribosomique

ATP: Adénosine Triphosphate

CXCR2: Récepteur 2 des Chémokines C-X-C

EGH: Ehrlichiose Granulocytaire Humaine

ELISA: Dosage immunoenzymatique sur support solide (Enzyme-Linked Immunosorbent

Assay)

GTP: Guanosine Triphosphate

Hb: Hémoglobine

IFI: Immunoflorescence Indirecte

IFN γ: Interféron gamma

IgG: Immunoglobuline G

IL: Interleukine

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique

JNK2: C-Jun-NH2 terminale kinase 2

LT NK: Lymphocyte T "natural killer"

MGG: May-Grünwald-Giemsa

MIP: Macrophage inflammatory protein

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

PAI: Phosphatases Alcalines

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

PCR TTGE: PCR Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

PNN: Polynucléaires Neutrophiles

PSGL 1: P Selectin Glycoprotein Ligand 1

TBF: Fièvre des pâtures (Tick-borne Fever)

Introduction

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies vectorielles regroupent les maladies transmises par un arthropode hématophage permettant à un agent pathogène qu'il soit infectieux ou parasitaire, de survivre, se transformer, se transmettre et parfois se multiplier. La majorité de ces vecteurs est constituée soit d'insectes, soit d'acariens, principalement de tiques. Chez le chien, en France, les maladies vectorielles les plus documentées aujourd'hui sont la piroplasmose ou babésiose, largement répandue et transmise par deux tiques différentes: Rhipicephalus sanguineus (babesia vogeli) et Dermacentor reticulatus (Babesia canis), ainsi que la leishmaniose à Leishmania infantum transmise par des phlébotomes. Les maladies vectorielles bactériennes restent plus en marge. La plus connue d'entre elles est l'ehrlichiose monocytaire canine à Ehrlichia canis.

L'anaplasmose canine à Anaplasma spp. est une maladie apparue plus récemment au cours de la deuxième partie du XXème siècle. On regroupe sous le genre Anaplasma chez le chien les bactéries Anaplasma phagocytophilum, responsable de l'anaplasmose granulocytaire canine, et Anaplasma platys, responsable de la thrombopénie infectieuse canine, deux bactéries ayant un tropisme pour les cellules sanguines de l'hôte (WOLDEHIWET 2010). Ces maladies restent mal connues des praticiens. En effet, selon une étude réalisée en 2007 auprès des cliniques vétérinaires (DROUFFE 2007), 86% estiment avoir des connaissances faibles sur l'anaplasmose canine à A. platys, 87% pour A. phagocytophilum. Cependant, l'intérêt porté à leur égard semble grandissant : en effet, on observe ces dernières années une augmentation du nombre de publications à leur sujet.

En ce qui concerne la chronologie de cette présentation, nous ferons dans une première partie une synthèse des données bibliographiques existant sur ces deux bactéries et leurs vecteurs respectifs. Tout d'abord, le chapitre 1 sera consacré à un aperçu général de l'étiologie, de la pathogénie et du diagnostic du genre Anaplasma. Puis, nous nous intéresserons plus spécifiquement aux caractéristiques étiologiques, épidémiologiques, cliniques, pathogéniques, diagnostiques et thérapeutiques de chacune des deux maladies dans les chapitres 2 et 3. Dans la deuxième partie, nous présenterons l'étude expérimentale que nous avons menée, tentant de définir la séroprévalence des maladies vectorielles transmises par les tiques chez le chien en France et en particulier l'importance du genre Anaplasma. Celle-ci a été réalisée à partir de données recueillies sur 323 chiens présentés en consultation sur le site de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse et VetAgro-Sup Campus Vétérinaire de Lyon, entre le mois de mars et le mois de juin 2011. Dans un premier chapitre, nous exposerons le cadre, les intérêts et les objectifs de ce travail. Dans le chapitre 2, nous ferons un descriptif du matériel et des méthodes qui nous ont permis de réaliser l'étude, avant de présenter et de discuter les résultats de celle-ci, respectivement dans les chapitres 3 et 4.

Partie 1. Synthese des données bibliographiques

Chapitre 1. Les anaplasmoses : généralités

Les anaplasmoses, confondues autrefois sous la dénomination d'ehrlichioses, sont des maladies animales et humaines émergentes en Europe causées par des bactéries du genre *Anaplasma* appartenant à la famille des *Anaplasmataceae* au sein de l'ordre des Rickettsiales. Leur définition et leur classification ont beaucoup évolué ces dix dernières années. Il s'agit de bactéries Gram négatives, intracellulaires strictes, infectant les cellules matures ou immatures du système hématopoïétique, notamment les leucocytes, les thrombocytes ou les érythrocytes des mammifères (EUZEBY 2001a). On les retrouve sous la forme d'inclusions appelées morulae au sein de vacuoles cytoplasmiques dans les cellules infectées, pouvant être mises en évidence par les colorations usuelles. Ce sont des maladies vectorielles, transmises par des arthropodes hématophages. Leurs hôtes naturels sont des mammifères variés : canidés, ruminants, porcins, équidés, homme.

En 1935, en Algérie, Donatien et Lestoquard (DONATIEN & LESTOQUARD 1935) montrent pour la première fois l'existence dans le sang de chiens d'une bactérie présentant des similitudes avec les rickettsies. Les symptômes constatés sont un syndrome fébrile pouvant aller jusqu'au décès de l'animal. La bactérie est alors nommée Rickettsia canis. En 1937, d'après les mêmes auteurs (DONATIEN & LESTOQUARD 1937), on sait que cette bactérie est transmise par une tique dure: Rhipicephalus sanguineus. Elle est uniquement retrouvée dans les monocytes circulants ou les macrophages des tissus (RAOULT & BROUQUI 1998). Plus tard, la bactérie est appelée Ehrlichia en l'honneur de Paul Ehrlich (DUMLER et al. 2001), et sera identifiée sous le nom d'Ehrlichia canis, agent de l'ehrlichiose monocytaire canine. L'infection est ensuite retrouvée en Afrique, en Inde, au Moyen-Orient, aux Antilles et en 1962 aux Etats-Unis, ainsi qu'en Tunisie (BOBIN et al. 1962). Au début des années 70, au Vietnam, une forme grave de la maladie décime des chiens militaires américains, on lui donne alors le nom de Pancytopénie tropicale canine (HUXSOLL 1970). En 1971, la technique de culture in vitro d'Ehrlichia canis est mise au point (NYINDO et al. 1971) et dès 1972 un test sérologique par immunofluorescence indirecte est disponible. En 1986, un cas d'ehrlichiose humaine est décrit aux Etats-Unis. On a d'abord supposé que l'agent en cause était Ehrlichia canis (MAEDA 1987) avant que l'agent de l'ehrlichiose monocytaire humaine, Ehrlichia chaffeensis, ne soit identifié en 1991 (ANDERSON et al. 1991; DAWSON et al. 1991).

Dans le même temps, d'autres ehrlichioses vétérinaires ont pu être mises en évidence, causées par des espèces bactériennes proches d'*Ehrlichia canis* mais avec un tropisme cellulaire différent : *Ehrlichia phagocytophila*, agent de la *tick-borne fever* (TBF) chez les bovins, est rapportée pour la première fois en 1940 (GORDON et al. 1940) et *Ehrlichia equi*, agent de l'ehrlichiose équine, en 1969 (GRIBBLE 1969). Ces deux espèces présentent un tropisme pour les granulocytes neutrophiles. Peu après, l'ehrlichiose granulocytaire canine

est décrite pour la première fois par Ewing en 1971 (EWING et al. 1971). La bactérie en cause est nommée *Ehrlichia ewingii*. Dans la foulée, une nouvelle espèce d'*Ehrlichia*, infectant les thrombocytes cette fois-ci chez le chien est découverte en 1978 aux Etats-Unis (HARVEY et al. 1978). Il s'agit d'*Ehrlichia platys*, agent de la thrombopénie cyclique canine. Enfin, il y a une vingtaine d'années, une nouvelle ehrlichiose humaine parasitant les granulocytes neutrophiles a été mise en évidence aux Etats-Unis (CHEN et al. 1994). L'agent en cause sera classée auprès d'*Ehrlichia phagocytophila* et *Ehrlichia equi*, sur la base de l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr16S (DUMLER et al. 2001).

Puis, de nouvelles techniques de biologie moléculaire ont vu le jour et ont permis l'avancée des connaissances sur ces bactéries. La systématique en place à l'époque a alors dû être modifiée.

I. Le genre Anaplasma

A. Taxonomie

1. Ancienne classification (avant 2001)

Entre 1991 et 2001, l'avènement des méthodes de taxonomie moléculaire a conduit à de nombreuses évolutions en ce qui concerne la classification des Rickettsiales. A l'origine, les bactéries appartenant à l'ordre des Rickettsiales étaient définies comme des bactéries Gram négatives de petite taille, intracellulaires strictes, se divisant par fission binaire et pouvant provoquer des infections chez des hôtes invertébrés (à la fois vecteurs et réservoirs) ou vertébrés (MOULDER 1974). La famille des *Chlamydiaceae* est exclue de l'ordre des Rickettsiales pour être placée dans l'ordre des Chlamydiales. On y trouve alors les familles des *Rickettsiaceae*, des *Bartonellaceae* et des *Anaplasmataceae* (MOULDER 1974).

Cette classification reposait sur des **critères phénotypiques**: morphologie, épidémiologie, écologie, sérotypage, pouvoir pathogène ... Sur cette base, on a ainsi différencié trois tribus différentes au sein de la famille des *Rickettsiaceae*: la tribu Rickettsieae, la tribu Wolbachieae et la tribu Ehrlichieae. La tribu des Ehrlichieae comprend les genres *Ehrlichia, Cowdria, Neorikettsia* (Figure 1). Les organismes de ces trois genres se répliquent dans une vacuole intracytoplasmique alors que la plupart des éléments de la tribu des Rickettsieae sont libres dans le cytoplasme (MOULDER 1974; RISTIC & HUXSOLL 1984).

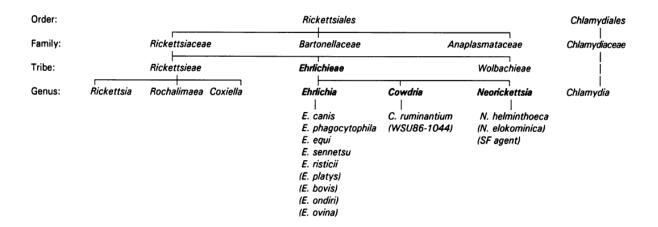


Figure 1: Rickettsiae et chlamydiae: ancienne classification (avant 1991) (source: RIKIHISA 1991)

En 1993, Brenner *et al.* proposent une nouvelle classification dans laquelle la famille des *Bartonellaceae* est exclue de l'ordre des Rickettsiales. Le genre *Rochalimaea* est transféré dans le genre *Bartonella* (BRENNER et al. 1993).

BILAN

Selon cette classification, les principales ehrlichioses du chien sont l'ehrlichiose monocytaire canine à *Ehrlichia canis*, la thrombopénie canine cyclique à *Ehrlichia platys* et l'ehrlichiose granulocytaire canine à *Ehrlichia equi*. De rares cas d'ehrlichiose à *Ehrlichia risticii* (ehrlichiose monocytaire du cheval ou fièvre du Potomac), *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis* et *Neorickettsia helminthoeca* sont également décrits.

Les ehrlichioses humaines sont principalement représentées par l'ehrlichiose monocytaire à *Ehrlichia chaffeensis* et l'ehrlichiose granulocytaire (agent alors non identifié avec précision, mais très proche d'*Ehrlichia equi* et *Ehrlichia phagocytophila*).

2. Nouvelle classification

En 2001, DUMLER et al. proposent une réorganisation globale (DUMLER et al. 2001). L'évolution des techniques de biologie moléculaire a permis une meilleure connaissance de ces organismes et la classification devient phylogénique plutôt que phénotypique. Elle se base principalement sur les gènes de l'ARN ribosomial 16S, le gène de la protéine de choc thermique GroESL, et l'analyse des gènes codant pour des protéines de surface (EUZEBY 2001a; DUMLER et al. 2001).

Les tribus Ehrlichieae et Wolbachieae sont déplacées dans la famille des *Anaplasmataceae*, toujours dans l'ordre des Rickettsiales. Seuls les Rickettsieae restent dans la famille des *Rickettsiaceae*. Dans le même temps, le terme de tribu disparait. La famille des *Anaplasmataceae* contient alors six genres : *Ehrlichia, Anaplasma, Neorickettsia, Wolbachia, Aegyptianella et Cowdria* (DUMLER et al. 2001)(Figure 2).

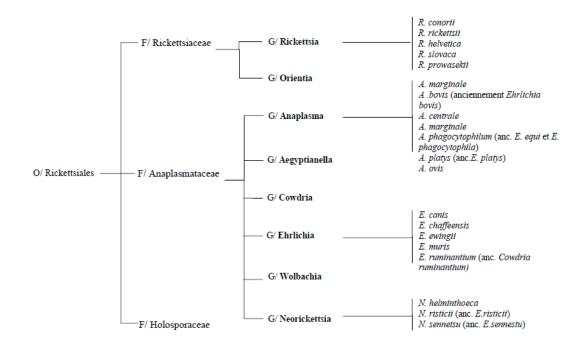


Figure 2 : Nouvelle classification des bactéries de l'ordre des Rickettsiales (d'après: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2004 (GARRITY et al. 2004), se basant sur la classification établie par Dumler *et al.* en 2001).

Du fait de la grande similitude génétique, biologique et antigénique des espèces *E. phagocytophila*, *E. equi*, et de l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine (> 98,2%) avec les autres espèces d'*Anaplasma*, elles seront déplacés dans le genre *Anaplasma* (DUMLER et al. 2001). Au sein de ce genre, les bactéries possèdent **quasiment 95**% de similitudes avec les bactéries du genre *Ehrlichia* sur les séquences d'ARNr 16S et au moins 96,1% de similitudes entre elles : *A. platys* (ex *E. platys*), *A. bovis* (ex *E. bovis*), *A. marginale*, *A. caudatum* (très proche d'*A. marginale*), *A. phagocytophilum* (regroupant ex *E. equi*, ex *E. phagocytophila*, et l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine, qui ne diffèrent que par trois nucléotides au plus), *A. ovis* et *A. centrale* (DUMLER et al. 2001). Les caractéristiques des principales espèces du genre *Anaplasma* sont récapitulées dans le Tableau I ci-dessous :

Nom	Principales espèces cibles	Cellules hôtes	Principaux vecteurs
A. marginale	Bovins, ovins, caprins, cervidés	Érythrocytes	Dermacentor spp. (D. andersonii, D. variabilis)
A. ovis	Ovins, caprins, bovins	Érythrocytes	Dermacentor andersonii
A. centrale	Bovins	Érythrocytes	Dermacentor andersonii
A. platys	Chiens	Thrombocytes	Rhipicephalus sanguineus
A. bovis	Bovins	Monocytes, macrophages	Hyalomma spp., Rhipicephalus spp., Amblyomma spp.
A. phagocytophilum	Bovins, ovins, caprins, cervidés, équins, chiens, chats, rongeurs, homme	Granulocytes	lxodes spp. (I. ricinus, I. pacificus, I. scaluparis)

Tableau I : Principales espèces du genre *Anaplasma* et leurs caractéristiques majeurs (source : TROMBINI 2008)

BILAN

Depuis 2001, le genre *Anaplasma* appartient à la famille des *Anaplasmataceae* de l'ordre des Rickettsiales, comprenant lui-même trois familles. On y compte huit espèces distinctes : *A. bovis, A. caudatum, A. centrale, A. marginale, A. ovis, A. phagocytophilum, A. platys* et « *A. mesaeterum* » dont seules *A. phagocytophilum, A. platys, A. ovis, « A. mesaeterum* » et *A. marginale* sont transmises avec certitude par les tiques en Europe. *A. bovis* et *A. caudatum* ne semblent présentes que dans les zones tropicales à subtropicales et particulièrement en Afrique (SAUGER 2005).

L'analyse des séquences des gènes *gltA* codant pour la citrate synthétase, effectuée par Inokuma *et al.* (publication quasi simultanée avec celle de Dumler *et al.* en 2001) montre cependant qu'*E. phagocytophila*, *E. equi* et l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine pourraient constituer un groupe proche mais différent du genre *Anaplasma*. Il existerait en effet des différences biologiques importantes qui pourraient justifier l'existence d'un groupe distinct pour *E. phagocytophila*, *E. equi*, et l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine (EUZEBY 2001a).

Nous allons d'ailleurs constater ici que parmi les espèces du genre *Anaplasma* qui nous intéressent dans cette présentation, à savoir les bactéries présentes chez le chien *A. phagocytophilum* et *A. platys*, il existe des différences tant au niveau des signes cliniques, des cellules parasitées, que des vecteurs. Cette nouvelle classification sera donc peut-être amenée à évoluer dans les prochaines années.

B. Caractéristiques phénotypiques du genre *Anaplasma*

Les caractéristiques phénotypiques du genre *Anaplasma* sont très proches du genre *Ehrlichia*.

1. Morphologie

Les bactéries du genre *Anaplasma* se présentent sous la forme de bactéries à coloration Gram négative, de petite taille, allant de 0,2 à 2 µm. Leur paroi semble **dépourvue de peptidoglycane** ou possède un peptidoglycane peu rigide (EUZEBY 2001a), ce qui les rend extrêmement sensibles à un stress mécanique, tel que la dessiccation, le gel/dégel et les changements d'osmolarité (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). Ce sont des bactéries à métabolisme aérobie obligatoire. Elles sont polymorphes (coccoïdes ou ellipsoïdes), immobiles, intracellulaires obligatoires et infectent les cellules matures ou immatures du système hématopoïétique des mammifères. Ainsi, on les retrouve essentiellement dans le cytoplasme des granulocytes neutrophiles, des globules rouges, des plaquettes, des monocytes ou des macrophages et plus rarement dans les granulocytes éosinophiles ; au sein de vacuoles, soit de manière isolée soit regroupées dans des inclusions denses appelées **morulae** (GREIG & ARMSTRONG 2006; EUZEBY 2001a). Ces inclusions sont visibles après colorations classiques sur un **frottis sanguin**: coloration de May-Grünwald-Giemsa ou coloration rapide Diff-Quick®, elles apparaissent d'une couleur bleu/violine (CHASTEL 2012).

Les études de microscopie électronique montrent qu'il existe deux formes morphologiques des *Anaplasma spp.* au sein d'une même vacuole : **des corps élémentaires** ou corps initiaux **denses**, d'une taille de 0,2 à 0,4 µm et des **corps réticulés** d'une taille de 2 µm environ (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). Les ribosomes et l'ADN des corps réticulés sont distribués dans tout le cytoplasme alors que ceux des corps élémentaires sont condensés au centre de la cellule (EUZEBY 2001b). Si les corps élémentaires sont facilement mis en évidence dans les cultures de cellules infectées, une étude d'infection par *A. phagocytophilum* chez le cheval montre que ceux-ci ne sont pas toujours observés *in vivo*. Ceci peut s'expliquer soit par le fait que les corps élémentaires ne sont pas formés *in vivo*, soit ils existent en petit nombre et ne sont pas détectés, soit ils ne se forment que lors d'infection importante des cellules, ce qui est relativement rare *in vivo*, à la différence des cultures *in vitro* (EUZEBY 2001b). Contrairement à celles d'*Ehrlichia spp.* les morulae d'*Anaplasma spp.* ne contiennent pas de matériel fibrillaire, ni ne sont entourées de mitochondries et n'ont pas de contact avec le réticulum endoplasmique (EUZEBY 2001b).

2. Cycle de développement

L'existence de corps initiaux et de corps réticulés laissait supposer que le cycle de développement des *Anaplasma spp.* était proche de celui observé pour les bactéries de l'ordre des Chlamydiales. Aujourd'hui, grâce à des études récentes, on connait un peu mieux le cycle spécifique de ces bactéries. On prendra pour exemple le cycle de développement d'*A. phagocytophilum* présenté ultérieurement (Part. 1, Chap. 2, III., A.).

3. Culture

La culture du genre *Anaplasma* est impossible sur les milieux de culture usuels tels que des milieux inertes ou des œufs embryonnés mais certaines espèces, comme nous le reverrons par la suite, se multiplient en cultures cellulaires (EUZEBY 2001b): *Anaplasma phagocytophilum* a été cultivé sur la lignée HL60 et sur des cellules embryonnaires d'*Ixodes scapularis*, *Anaplasma marginale* peut également être cultivée sur des cellules de tiques, des érythrocytes ou des cellules endothéliales, alors qu'*Anaplasma platys* n'est pas actuellement cultivable (DUMLER et al. 2005).

4. Propriétés antigéniques

On n'observe pas de réactions croisées des Anaplasmataceae avec les Rickettsiaceae.

Toutes les bactéries de l'ordre des Rickettsiales semblent posséder une protéine de choc thermique conservée de 60 kDa (HSP 60)(MARTIN 2004).

De plus, il existe une communauté antigénique entre les organismes d'un même genre, surtout pour les antigènes de surface (RIKIHISA 1999), qui explique l'existence de réactivités croisées. Toutes les *Anaplasma spp.* partagent des protéines antigéniques de 19, 36 et 105 kDa (DUMLER et al. 2001).

Les protéines de surface des genres *Ehrlichia* et *Anaplasma* sont codées par une famille de gènes polymorphiques, homologues mais non identiques. Cette diversité est importante pour la pénétration cellulaire, la persistance des infections, l'échappement au système immunitaire et l'induction de la pathogénie (RIKIHISA 1999). A titre d'exemple, les protéines de surface P30 d'*E. canis* sont des antigènes majeurs codés par une famille multigénique polymorphique, qui présentent une forte réactivité croisée avec les protéines de surface P28 d'*E. chaffeensis*. La famille multigénique codant pour ces protéines de surface est également celle qui code pour l'antigène P44 d'*A. phagocytophilum*, d'où une réactivité croisée possible entre organismes des genres *Ehrlichia* et *Anaplasma* (RIKIHISA 1999; DUMLER et al. 2001).

Par ailleurs, certains auteurs rapporteraient des réactions croisées entre *Anaplasma* phagocytophilum et *Borrelia burgdorferi* (WORMSER et al. 1997), mais connaissant l'épidémiologie des deux maladies, il peut également s'agir de co-expositions ou co-infections.

Enfin, au sein d'une même espèce, on observe une diversité antigénique, comme cela a pu être montré pour *A. phagocytophilum* (ASANOVICH et al. 1997), même si les différents biovars de l'espèce, *Equi*, *Phagocytophila* et *HGE* (Human granulocytic ehrlichiosis) ont en commun des protéines majeures de surface de 36 à 49 kDa (RIKIHISA 1999).

Nous venons ici de présenter les caractéristiques générales communes aux bactéries du genre Anaplasma. Cependant, les différentes espèces qui le compose possèdent également des caractères propres, que nous allons détailler par la suite. Nous nous intéresserons uniquement à Anaplasma phagocytophilum et Anaplasma platys, les deux agents responsables des anaplasmoses canines en France. Ces maladies sont transmises par des arthropodes hématophages : les tiques dures.

II. Les vecteurs : Généralités sur les tiques dures

A. Systématique

Les vecteurs des anaplasmoses canines en France sont des tiques dures qui font partie de l'embranchement des Arthropodes, de l'ordre des Ixodida, et du sous ordre des Ixodina (tiques dures). Au sein de ce sous-ordre se trouve la super-famille des Ixodoidea qui comprend le vecteur d'Anaplasma phagocytophilum, Ixodes ricinus, de la famille des Ixodidae (prostriata), sous-famille des Ixodinae, genre Ixodes et celui d'Anaplasma platys, Rhipicephalus sanguineus, de la famille des Amblyommidae (metastriata), genre Rhipicephalus (BOURDEAU 1993)(Figure 3).

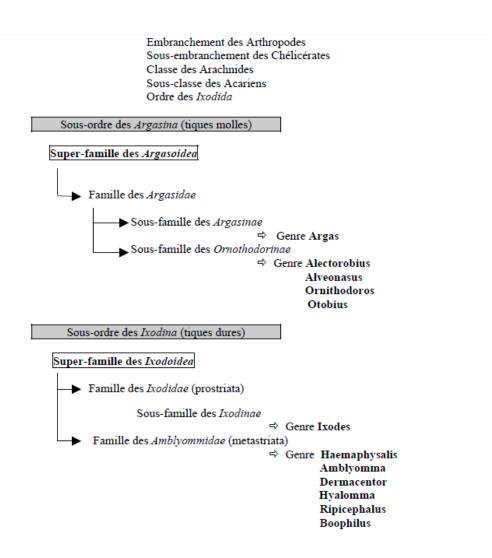


Figure 3 : Systématique générale des tiques (source : BOURDEAU 1993)

B. Morphologie

La morphologie varie beaucoup en fonction du stade évolutif de la tique (œuf, larve, nymphe ou adulte). Le corps est ovalaire ou piriforme, avec dans sa partie antérieure un rostre (ou gnathosome), dont la forme et la longueur varient selon les genres. C'est une pièce anatomique qui permet la diagnose d'espèces, et joue un rôle majeur dans le pouvoir pathogène de la tique (BOURDEAU 1993). Il comporte 5 pièces : un hypostome enveloppé de deux chélicères en harpon, et une paire de palpes à rôle sensoriel et tactile (Figure 4) (GUIGEN & DEGEILH 2001).

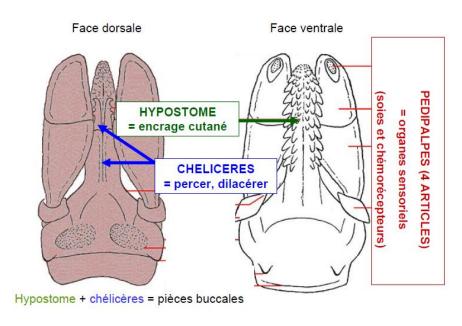


Figure 4: Anatomie du rostre (ou capitulum) des tiques dures (source: VIAL 2008)

On trouve chez l'adulte, en face dorsale de leur tégument, un écusson chitinisé appelé scutum, qui comporte parfois plusieurs sillons à sa surface. C'est ce scutum qui a donné le nom de « tiques dures » à ces espèces. Ce dernier est réduit chez la larve, la nymphe et la femelle (qui peut alors distendre son corps de façon plus importante lors du gorgement) et plus étendu chez le mâle. Chez ce dernier, il peut parfois être accompagné de plaques ventrales (BOURDEAU 1993).

C. Cycle de développement

Sources utilisées : (GUIGEN & DEGEILH 2001; PEREZ-EID & GILOT 1998b; BOURDEAU 1993)

Les tiques dures sont des arthropodes hématophages.

Le cycle de développement comprend **quatre stades successifs** : l'œuf, la larve, la nymphe, et le stade adulte.

Le nombre de repas sanguin chez les *Ixodoidea* est limité à un par étape de développement_(ou stase). Lors d'un cycle triphasique (ou trixène), ce qui est le cas pour la majorité des espèces de tiques dont celles qui vont nous intéresser ici, à la fin de chaque repas sanguin effectué sur un hôte spécifique, la stase tombe au sol et effectue une

métamorphose en stase suivante. Ainsi, le cycle comporte trois phases : une phase larvaire, une phase nymphale et une phase adulte, correspondant chacune à un hôte différent (Figure 5). Ces trois hôtes successifs peuvent appartenir au même groupe de vertébrés, c'est le cas des tiques monotropes Ex: Rhipicephalus sanguineus, tique spécifique du chien, encore appelée « tique du chenil » ou tique brune du chien. Cependant, la plupart des tiques Dermacentor sp., Rhipicephalus sp., Hyalomna sp. sont des tiques ditropes, c'est-à-dire que le tropisme d'hôte des formes immatures diffère de celui des adultes. I. ricinus quant à elle, est une tique télotrope: les stades larvaires et nymphaux sont ubiquistes et ont une préférence pour des groupes variés de vertébrés, souvent des petits mammifères (mulots et campagnols), oiseaux et reptiles, alors que les adultes, eux, parasitent fréquemment les grands mammifères (cervidés, bovins).

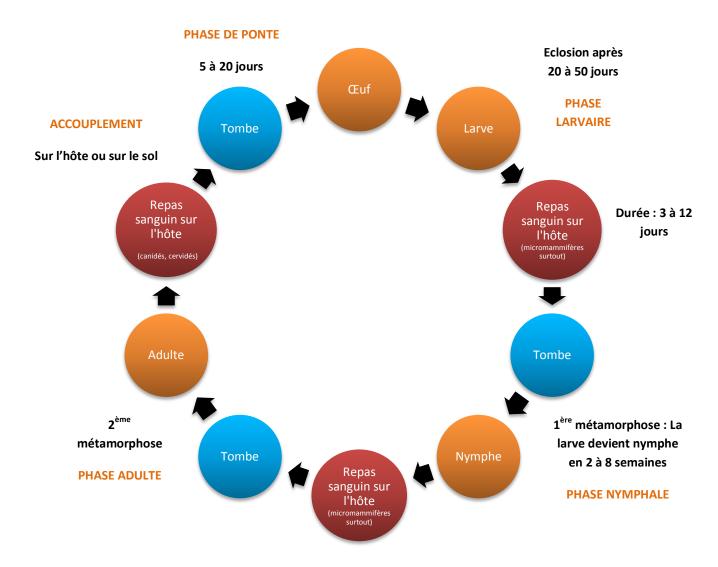


Figure 5 : Cycle de développement des tiques de la superfamille des Ixodoidea

L'accouplement a lieu sur l'hôte ou au sol. Il fait intervenir un certain nombre de phéromones. Le mâle meurt rapidement après la fécondation et la femelle meurt après la ponte d'environ 1 000 à 15 000 œufs visibles à l'œil nu (PEREZ-EID & GILOT 1998b) déposés au sol et abrités par la végétation. L'accouplement et la fécondation sont nécessaires pour que la femelle puisse terminer son repas de sang et que la maturation des ovocytes puisse continuer (BOURDEAU 1993).

*La larve : l'embryogénèse dure de 20 à 50 jours en fonction de la température ambiante. La larve mesure environ 1 mm à l'éclosion (PEREZ-EID & GILOT 1998b), elle est hexapode. En quelques jours, elle se met en quête de son premier repas sanguin. La recherche de l'hôte est passive : la larve se met à l'affût immobile dans l'attente du passage de l'hôte (BOURDEAU 1993). Le repas dure de 3 à 12 jours puis la larve se détache, tombe au sol et entame sa première métamorphose qui peut durer de 2 à 8 semaines selon les conditions climatiques (température, humidité...) et les espèces (PEREZ-EID & GILOT 1998b).

*La nymphe : elle mesure 2 à 4 mm, est octopode, et possède le même comportement trophique que la larve. La métamorphose dure plus longtemps. Il s'agit du stade le plus anthropophile donc responsable le plus souvent de la transmission de bactéries pathogènes à l'homme (SAUGER 2005).

*La tique adulte: la taille est de 3 à 4 mm non gorgée. Elle est également octopode. La recherche de l'hôte est active. Le repas sanguin est beaucoup plus volumineux mais seule la femelle prend un vrai repas sanguin pour assurer la ponte. Le mâle lui, ne s'alimente pas (Ixodidae) ou peu (Amblyommidae) (PEREZ-EID & GILOT 1998b).

La durée du cycle est variable et peut être longue. De nombreux facteurs influent en fonction des espèces : difficulté de rencontre de l'hôte, mouvements verticaux sur la végétation, lenteur du métabolisme. Les conditions climatiques sont également importantes et interviennent à chaque stade surtout pour les espèces exophiles (ex : *I. ricinus*) vivant dans des biotopes ouverts, à l'affût sur la végétation : l'humidité relative et la température influent sur le développement des formes immatures et des adultes à jeun, de façon variable selon les régions. Enfin, la présence de l'hôte dans les gites est un paramètre important pour les espèces endophiles (ex : *Rh. sanguineus*), qui vivent à l'abri dans un habitat correspondant à celui de leur l'hôte et s'y reproduisent (GUIGEN & DEGEILH 2001). La durée moyenne du cycle va donc de 2 à 4 mois dans les régions les plus chaudes et jusqu'à plusieurs années dans les régions froides (BOURDEAU 1993; PAROLA & RAOULT 2001).

D. Interactions avec l'hôte : le chien

1. Recherche de l'hôte

Les tiques passent plus de 90% de leur vie à l'état libre. Pour localiser un hôte, elles utilisent les stimuli produits par celui-ci : stimuli chimiques (CO2, NH3), humidité, vibrations de l'air ou température corporelle (PAROLA & RAOULT 2001). La tique peut ensuite soit adopter une stratégie d'embuscade où elle se laisse tomber de la végétation pour atterrir

sur l'hôte (le plus fréquent), soit employer une stratégie d'attaque où elle court vers son hôte lorsque celui-ci est à proximité (PAROLA & RAOULT 2001).

2. Fixation et gorgement

Les tiques se fixent en général sur les zones à peau fine (fanon, ars, aines, mamelle, scrotum, anus, oreilles, queue). Les sites de fixation varient en fonction de la morphologie du rostre (BOURDEAU 1993).

La tique se fixe d'abord mécaniquement par **effraction cutanée** réalisée par les mouvements des chélicères et de leurs crochets, dans laquelle l'hypostome s'insère peu à peu (BOURDEAU 1993).

Après sécrétion d'un cément issu de la salive de la tique autour de l'hypostome et des chélicères, permettant un attachement très fort sur l'hôte et ayant un rôle protecteur, celleci entre en phase de gorgement. Cette phase se caractérise par une succession de périodes de succion et de sécrétions salivaires. Le repas sanguin compte en fait deux étapes successives : une étape de gorgement lent et progressif (où la femelle adulte est fécondée) et une étape de gorgement rapide qui dure un à trois jours et conduit à l'augmentation conséquente du volume de la tique. La tique femelle prélève du sang et de la lymphe à partir du foyer de lyse (tissu nécrosé, hémorragique et œdémateux où affluent les cellules sanguines de la lignée blanche en particulier) qui se forme dans les tissus à l'extrémité du rostre. Le gorgement n'est complet que pour les femelles adultes fécondées (BOURDEAU 1993).

Un repas complet peut durer jusqu'à 15 jours (PAROLA & RAOULT 2001).

3. Rôle pathogène direct : effets de la morsure de tique

a) Action mécanique, anticoagulante et allergisante

La morsure de la tique, par son processus mécanique, induit une dilacération de l'épiderme par les chélicères. L'action anticoagulante de la salive de la tique entraîne la digestion des tissus au point de piqûre et permet un flux de sang continu au niveau du **foyer de lyse** (SHAW & DAY 2005). Deux molécules anticoagulantes ont été mises en évidence chez *Ixodes ricinus*: l'ixodin (antithromboplastine) et l'ixin (inhibiteur de la thrombine) (SHAW & DAY 2005). Il peut en résulter des **micro-hématomes** (GUIGEN & DEGEILH 2001).

Les substances salivaires provoquent également au cours des premières infestations des réactions inflammatoires non spécifiques de l'hôte (BOURDEAU 1993). Les macrophages convergent vers le site de ponction, pour phagocyter les débris et les bactéries puis les basophiles migrent à leur tour et libèrent de l'histamine et de la sérotonine. Lors de réinfestations ultérieures, des phénomènes d'hypersensibilité se mettent en place, dominés par un œdème réactionnel favorisant la rupture vasculaire par vasodilatation et accompagné parfois d'une réaction prurigineuse (Figure 6). Ces différentes réactions 28

peuvent perturber la nutrition et le développement des tiques, induire des résistances de l'hôte aux tiques et une réaction granulomateuse chronique peut persister au point de fixation (BOURDEAU 1993). Cependant, l'action cytolytique des *Ixodidae* reste la plupart du temps lente et peu douloureuse, du fait de l'existence de substances anesthésiantes dans la salive des tiques (GUIGEN & DEGEILH 2001).

b) Action toxique

<u>Sources utilisées</u>: BOURDEAU 1993; GUIGEN & DEGEILH 2001; PEREZ-EID & GILOT 1998b; PAROLA & RAOULT 2001.

En plus de ses propriétés hémolysantes, anticoagulantes et agglutinantes, la salive de la tique peut avoir un pouvoir toxique direct chez certaines espèces de tiques, surtout exotiques, mais parfois des espèces européennes. Cette toxine proviendrait des ovaires de la femelle et agirait sur le tissu nerveux conduisant à des « paralysies à tique », surtout décrites chez le mouton.

c) Action spoliatrice

Lorsque la tique prend un repas de sang, il faut considérer que la quantité de sang ingérée est deux à trois fois plus importante que celle correspondant à l'augmentation de volume du parasite à la fin du repas, du fait de sa capacité à concentrer le sang au fur et à mesure du gorgement (GUIGEN & DEGEILH 2001; PEREZ-EID & GILOT 1998b; PAROLA & RAOULT 2001). Cette action semble concerner principalement les grosses espèces de tiques, et les animaux très souvent infestés ou les petits vertébrés, chez lesquels elle peut conduire à une anémie plus ou moins importante, un affaiblissement et un amaigrissement (GUIGEN & DEGEILH 2001; PEREZ-EID & GILOT 1998b).

A l'ensemble de ces actions salivaires s'ajoutent des **propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices**, qui créent un milieu optimal pour la transmission d'agents pathogènes (SHAW & DAY 2005).

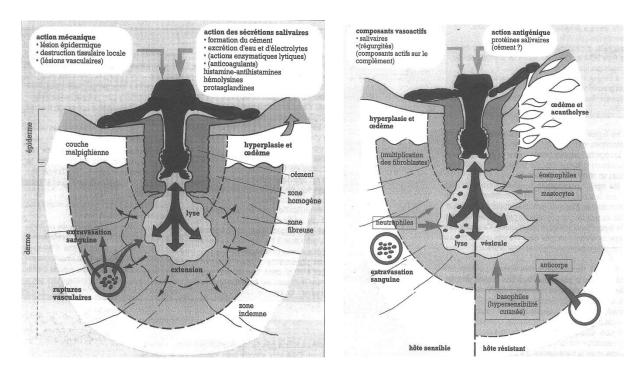


Figure 6 : Lésions induites par l'action de la tique (à gauche) et les réactions de l'hôte (à droite) (source : BOURDEAU 1993)

4. Transmission des bactéries du genre Anaplasma de la tique à l'hôte

Pour rappel, la transmission des bactéries du genre *Anaplasma* est principalement vectorielle, par **morsure de tiques**. Il y a un seul repas sanguin par stade de développement au cours duquel soit la tique se contamine, soit elle contamine l'hôte. Seuls les stades nymphe et adulte permettent l'infection.

a) Contamination de la tique

Le repas contaminant intervient souvent dans la période où le sang est le plus riche en bactéries, soit dans les 2 à 3 premières semaines suivant l'infection (DROUFFE 2007).

Les bactéries se retrouvent ensuite dans l'intestin moyen de la tique. Celui-ci est conservé lors des mues entre les différents stades de développement de la tique, ce qui explique la **transmission transstadiale du germe**, qui est essentielle dans le rôle de vecteur de la tique pour ces affections. En effet, les tiques *lxodoidea* sont uniquement des vecteurs d'*Anaplasma.spp*, mais en aucun cas des réservoirs : les bactéries ne se transmettent pas d'une génération à l'autre (il n'existe a priori pas de transmission transovarienne de ce type d'agents infectieux chez la tique¹). Ceci est compensé comme nous l'avons vu par un cycle de développement pouvant s'étendre sur plusieurs années, ce qui permet à l'agent de survivre d'une année à l'autre.

30

¹ Une étude récente a cependant montré que la transmission transovarienne d'*Anaplasma phagocytophilum* sur une espèce de tique du genre *Dermacentor albipictus* était possible (BALDRIDGE et al. 2009). Cette découverte remettrait en cause le statut de réservoir des tiques pour la bactérie.

Il existe également des phénomènes de co-repas sanguins (ou « co-feeding ») entre tiques d'espèce différentes ou non sur un même hôte : on a pu observer que les tiques se regroupent sur des zones précises de l'animal pour se nourrir. Ainsi, une tique infectée pourrait transmettre l'agent qu'elle héberge aux tiques saines en train de se nourrir sur une zone corporelle de l'hôte proche (PAROLA & RAOULT 2001). Ceci est bien décrit pour l'agent de la borréliose de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, pour lequel ce mode de transmission est très efficace (TROMBINI 2008). Il serait possible qu'*Anaplasma phagocytophilum* puisse être aussi transmise de cette façon (OGDEN et al. 2003).

Ensuite, les bactéries passent dans l'hémolymphe puis migrent vers les glandes salivaires de la tique vectrice. Les mécanismes de survie du germe dans les glandes salivaires n'est pas très bien connu. Il semblerait qu'il y ait une implication génétique : par exemple, *Anaplasma phagocytophilum* induit l'expression du gène *salp16* dans les glandes salivaires lors du gorgement, codant pour une protéine qui jouerait un rôle dans sa survie au sein de la tique *I. scapularis* (SUKUMARAN et al. 2006).

b) Contamination de l'hôte

La tique inocule alors les bactéries à l'hôte suivant, **via sa salive**, où l'agent infectieux est présent en grande quantité. La salive contient comme nous l'avons mentionné précédemment différentes substances : enzymes protéolytiques, vaso-dilatateurs, anti-inflammatoires, anticoagulants et anesthésiques ce qui empêche l'hôte de se rendre compte de la présence du parasite.

Les agents pathogènes sont inoculés à l'hôte à la fin du gorgement rapide (BOURDEAU 1993), lorsque les sécrétions salivaires sont les plus importantes. En général, l'agent n'est transmis qu'au bout de 24 à 36 heures minimum. Cette durée varie selon les espèces et la bactérie en cause (Tableau II). A titre d'exemple, pour *Anaplasma phagocytophilum*, on a montré qu'il fallait au moins 48h de fixation (AMIEL et al. 2004; GREIG & ARMSTRONG 2006).

Bactérie	Infection de la tique	Infection de l'hôte
Ehrlichia Anaplasma	>24h	30h
A. phagocytophilum	>24h	>48h [3]
B. burgdorferi	>24h	>36h [64,107]

Tableau II : Délais minimum d'infection de la tique et de l'hôte pour quelques bactéries (source : SAUGER 2005)

<u>Remarque</u>: Il y a également possibilité d'infection directe par **transfusion sanguine** à partir d'un chien en phase aigüe de la maladie (DROUFFE 2007).

E. Infections concomitantes

Une même espèce de tique est capable de transmettre différents agents pathogènes et peut donc être infectée par plusieurs bactéries au même moment. Ces bactéries peuvent appartenir à des espèces différentes ou à une même espèce mais à un génotype différent. Par exemple, un certain nombre de tique *Ixodes ricinus* sont co-infectées par *A. phagocytophilum* et *B. burgdorferi* (PAROLA & RAOULT 2001; SCHOULS et al. 1999; CHABANNE & BOULOUIS 2012). En effet, plusieurs études récentes ont montré que la prévalence des tiques co-infectées par *B. burgdorferi* et *A. phagocytophilum* est comprise entre 0,1 et 28% (NIETO & FOLEY 2009; SCHICHT et al. 2011). En France, la tique transmet également l'encéphalite à tique, causée par un flavivirus et une maladie causée par *Babesia microti-like* appelée « petite babésiose ». *Rhipicephalus sanguineus* peut transmettre en même temps chez le chien *Ehrlichia canis, Babesia vogeli, Babesia gibsoni, Hepatozoon canis, Mycoplasma heamocanis* (anciennement *Haemobartonella canis*)(BEAUFILS & LEGROUX 1992; KLAG et al. 1991) et *Anaplasma platys* (EUZEBY 2001b; CHABANNE et al. 2011).

De nombreuses études s'intéressent à ces co-infections. Citons une enquête menée en Allemagne portant sur 680 tiques collectées pour 1/3 sur des micromammifères, 1/3 sur des oiseaux et 1/3 sur la végétation durant l'été 2007. Celle-ci estimait le taux de co-infections à 10,9 % des tiques infectées (FRANKE et al. 2010). Récemment, les chercheurs de l'INRA ont également mis au point une technique de biologie moléculaire (PCR-TTGE, Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) qui permet l'analyse des infections et co-infections bactériennes des tiques (HALOS et al. 2006). Cette technique leur a permis de détecter en une seule PCR la présence simultanée d'ADN de Borrelia burgdorferi/ Bartonella sp., Rickettsia SFG sp./ Coxiella burnetii, Anaplasma phagocytophilum/ Bartonella sp. et Anaplasma phagocytophilum/ Coxiella burnetii.

La tique peut ainsi transmettre au cours d'un même repas sanguin plusieurs bactéries pathogènes à l'homme ou à l'animal (Tableau III). Ces co-infections sont acquises le plus souvent lors d'infestation importante et au cours de morsures répétées. Elles peuvent être à l'origine de **manifestations atypiques**, combinant la symptomatologie des différentes maladies présentes (VAYSSIER-TAUSSAT et al. 2004) et compliquer ainsi le diagnostic ou le traitement.

	Tiques	Bactéries pathogènes transmises
Genre Ixodes	I. ricinus	Anaplasma marginale Anaplasma phagocytophilum Coxiella burnetti Francisella tularensis Rickettsia helvetica complexe Borrelia burgdorferi sensu lato
	I. uriae	Borrelia garinii
	I. trianguliceps	Anaplasma phagocytophilum Borrelia garinii C. burnetii
	I. hexagonus	Borrelia garinii
	I. ventallot	Rickettsia conorii
	R sanguineus	Ehrlichia canis Anaplasma platys? Anaplasma marginale Coxiella burnetti Francisella tularensis Rickettsia conorii Rickettsia massiliae
enre Rhipicephalus	R. bursa	Anaplasma marginale Anaplasma ovis « Anaplasma mesaeterum » Coxiella burnetii
	R. turanicus	Anaplasma ovis « Anaplasma mesaeterum » Rickettsia massiliae Coxiella burnetti
	R. rossica	Francisella tularensis

Tableau III : Bactéries transmises par les genres *Ixodes* et *Rhipicephalus* en Europe (source : SAUGER 2005)

F. Activité saisonnière

La saison d'activité varie selon la stase dans une même espèce et selon les espèces (BOURDEAU 1993). En climat tempéré, la température sera le principal facteur limitant alors qu'en climat tropical l'humidité prend toute son importance.

Dans nos régions, on a un pic d'activité en fin de printemps d'avril à mai, et une reprise de l'activité en début d'automne (BOURDEAU 1993). Une récente étude menée sur le terrain confirme ces données (DROUFFE 2007)(Figure 7).

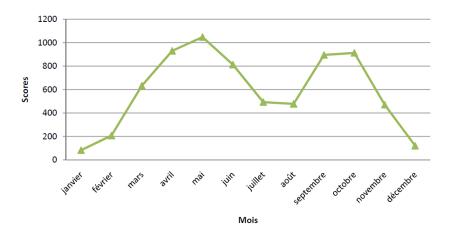


Figure 7 : Evolution de l'activité des tiques au cours de l'année (source : DROUFFE 2007)

Les tiques peuvent survivre pendant l'hiver mais on observe une pause d'hibernation pour les stades pré-imaginaux et les adultes à jeun, ainsi qu'un arrêt de développement des œufs ou de leur production (GUIGEN & DEGEILH 2001). La reprise de l'activité en hiver est cependant possible, à la faveur d'un adoucissement des températures par exemple. De même, en été, une augmentation de l'hygrométrie avec des pluies importantes peut leur faire reprendre temporairement leur vitalité.

Un site internet a été développé par Merial® et Climpact® qui permet aux vétérinaires de consulter la prévision d'activité des trois tiques principales présentes en Europe (Rhipicephalus sanguineus, Ixodes ricinus et Dermacentor reticulatus) en fonction des données météorologiques : http://www.fleatickrisk.com/vet/en/(BEUGNET et al. 2009).

G. Contrôle

Il s'agit de méthodes de contrôle communes aux tiques dures : pour limiter la transmission de bactéries de la tique vers l'hôte, la meilleure solution est d'éviter autant que possible tout contact avec les tiques. Cependant, la réduction et le contrôle des populations de tiques restent difficiles.

1. Lutte écologique

Parmi les moyens à notre disposition, on peut utiliser des techniques de **lutte écologique** visant à modifier le biotope des tiques : déboisement, mise en culture, défrichage, utilisation d'herbicide et assèchement des zones humides (GUIGEN & DEGEILH 2001; PAROLA & RAOULT 2001). On peut également intervenir sur les hôtes, que l'on cherchera à supprimer, à diminuer ou à écarter, par une rotation des pâturages par exemple. Enfin, des moyens zootechniques peuvent être employés (PAROLA & RAOULT 2001) (stabulation permanente, sélection de races résistantes, vaccination (non existante pour l'anaplasmose, mais des vaccins existent pour la borréliose de Lyme et l'encéphalite à tiques (TICOVAC®) aux Etats-Unis et récemment en France pour cette dernière (GUIGEN & DEGEILH 2001)).

2. Lutte chimique

Elle s'exerce sur les animaux, l'habitat des tiques et plus difficilement sur la végétation. Les acaricides d'origine naturelle (pyréthrine) ou de synthèse (organochlorés, organophosphorés, carbamates) peuvent être employés par épandage pour les espèces exophiles comme *I. ricinus*, alors que des traitements plus ponctuels dans les gites spécifiques seront préférés pour les espèces endophiles, comme *Rh. sanguineus* (GUIGEN & DEGEILH 2001). Ainsi, des bains, douches, poudrages peuvent être efficaces. Néanmoins, l'application de molécules insecticides ou acaricides sur les animaux de compagnie reste un des moyens les plus efficaces de lutte anti-vectorielle. En ce qui concerne les tiques, on utilisera des molécules ayant un effet anti-attachement surtout, un effet antigorgement et/ou un effet létal: l'amitraz, les pyréthrinoides (perméthrine, fluméthrine, delthaméthrine)

ou des phénylpyrazolés (fipronil, pyripole), voire des combinaisons de plusieurs principes actifs, ayant un effet synergique prouvé, et une action rapide (amitraz + fipronil (Certifect®), élimination des tiques en 12h après l'application du *spot-on*) peuvent être employés. Les molécules ayant un effet répulsif sont efficaces contre des insectes volants, tels que les moustiques et les phlébotomes mais peu efficaces contre les tiques (CHABANNE et al. 2011). Le traitement doit être effectué tous les mois pour les formulations *spot-on*. Il existe également des colliers dont la rémanence est plus importante (Préventic®, 4 mois et Seresto®, 8 mois) (CHABANNE et al. 2011). De cette façon, on peut couvrir l'ensemble de la période d'activité des tiques. Le principal risque reste le développement de résistances des arthropodes vecteurs vis-à-vis de ces molécules, mais aujourd'hui, il n'est pas avéré (CHABANNE et al. 2011).

3. Lutte biologique

Il existe aussi des méthodes de **contrôle biologique** : on introduit dans un milieu donné des prédateurs (araignées, fourmis), des parasites ou encore des bactéries pathogènes pour les tiques (PAROLA & RAOULT 2001), mais ces méthodes restent compliquées à mettre en œuvre.

4. Lutte génétique

L'utilisation de mâles rendus stériles par irradiation ou hybridation pourrait être possible mais n'est pas encore explorée (PEREZ-EID & GILOT 1998b).

5. Retrait de la tique de l'hôte

Si le retrait de la tique a lieu dans les 24-36h suivant la morsure, il y a peu de chance qu'une transmission d'un agent pathogène ait lieu de la tique vers l'hôte. Des crochets disponibles dans le commerce permettent de retirer les tiques en toute sécurité, sans risque de laisser le rostre dans le tissu cutané. En absence de crochet, une pince peut aussi être utilisée, et en dernier recours, les ongles du propriétaire. Dans tous les cas, la tique doit être pincée le plus près possible de la peau et tirée perpendiculairement à celle-ci via un mouvement continu.

Après le retrait, le site de morsure doit être désinfecté et la tique peut être conservée si possible à basse température (-20°C) pour pouvoir être analysée si une maladie se déclare. Il est conseillé de surveiller la zone de morsure pendant une période d'un mois. Toute autre méthode de retrait doit être proscrite car elle peut augmenter le risque de régurgitation de la tique (SAUGER 2005).

6. Prophylaxie médicale

Ces dernières années, certaines études ont tenté la production de vaccins contenant des antigènes de parties anatomiques de tique primordiales pour la transmission d'agents pathogènes : des vaccins à base d'antigènes des glandes salivaires de la tique ont été testés, mais l'efficacité n'a pas été très probante (NYINDO et al. 1996). Un vaccin contre la protéine

ribosomique PO de *Rhipicephalus sanguineus* est actuellement à l'étude (2012), et serait prometteur (RODRIGUEZ-MALLON et al. 2012).

L'immunisation des hôtes contre les tiques, qu'elle soit induite par des vaccins ou par des infestations répétées perturbent la phase de gorgement et de digestion de l'hémoglobine chez la tique vectrice (BROSSARD & PAPATHEODOROU 1990).

Chez *I. ricinus* la protéolyse de l'hémoglobine est assurée par la captepsine L (IrCL1), une endopeptidase dont l'activité optimale a lieu à un pH de 3-4 (au-delà de 5 elle devient instable). Il s'agit d'une activité endolysosomiale s'exerçant au niveau des vésicules des cellules intestinales de la tique. Le blocage de la IrCL1 réduit la capacité des tiques à se nourrir par rapport aux témoins. Cette enzyme pourrait être une cible prometteuse contre les tiques et les agents pathogènes transmis par des tiques (FRANTA et al. 2011).

Après avoir présenté les caractéristiques générales des tiques vectrices des anaplasmoses canines en France, nous allons maintenant aborder en détail les caractéristiques et l'importance de ces deux maladies émergentes, que sont l'anaplasmose granulocytaire canine et la thrombopénie cyclique canine.

Chapitre 2. **A**naplasmose canine granulocytaire à **A**naplasma phagocytophilum

En 1940, le prototype d'A. phagocytophilum, l'agent causal de la fièvre des pâturages ou « fièvre à tiques » (Tick-borne fever, TBF) est décrit pour la première fois sur des bovins et des chèvres (GORDON et al. 1940), huit ans après que la fièvre des pâturages ait été reconnue pour la première fois comme étant une maladie distincte transmise par les tiques en Ecosse chez le mouton (MAC LEOD 1932). D'abord nommé Rickettsia phagocytophila (FOGGIE 1949), l'agent est ensuite appelé Cytoecetes phagocytophila (FOGGIE 1962), compte tenu de son tropisme pour les granulocytes et de sa morphologie similaire à Cytoecetes microti (TYZZER 1938). Le même agent a ensuite été retrouvé dans d'autres parties de la Grande Bretagne (HUDSON 1950), en Irlande (COLLINS et al. 1970), en Scandinavie (STUEN 2003 ; OVERAS 1962 ; TUOMI 1967) et dans d'autres parties de l'Europe (WOLDEHIWET 2010).

En 1969, l'ehrlichiose granulocytaire équine, qui est aujourd'hui appelée anaplasmose granulocytaire équine a été reconnue pour la première fois en Californie (GRIBBLE 1969) et plus tard retrouvée dans d'autres parties des Etats-Unis et en Europe (WOLDEHIWET 2010). En 1975, Lewis et al. nomment la bactérie en cause Ehrlichia equi (EUZEBY 2002). Des tentatives de transmission du germe à d'autres espèces ont été réalisées expérimentalement. Elles n'ont pas conduit à des manifestations cliniques mais des morulae intracytoplasmiques ont pu être observées (LEWIS et al. 1975).

A partir de 1971, des morulae ressemblant à *E. canis* ont été décrites dans le cytoplasme des granulocytes de chiens qui présentaient des signes cliniques d'ehrlichiose en Amérique du Nord (EWING et al. 1971). La maladie est alors appelée ehrlichiose canine granulocytaire (CARILLO & GREENE 1978) et l'espèce d'*Ehrlichia* en cause est dénommée *E. ewingii* (ANDERSON et al. 1992). On a d'abord émis l'hypothèse qu'il pouvait s'agir d'une souche d'*E. canis* à tropisme granulocytaire ou d'une souche d'*E. equi* parasitant les granulocytes de chien. Au début des années 80, l'anaplasmose granulocytaire canine causée par *A. phagocytophilum* est reconnue pour la première fois aux Etats-Unis (MADEWELL & GRIBBLE 1982). Sa description en Europe est plus récente : la première publication d'un cas d'infection canine à *A. phagocytophilum* date de 1995 en Suède (GREIG & ARMSTRONG 2006).

La découverte au début des années 90 de l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine aux Etats-Unis (CHEN et al. 1994) met fin au fait que l'on pensait la maladie limitée aux animaux domestiques et aux réservoirs sauvages (OGDEN et al. 1998). La plupart des sérums des patients sont positifs à *Ehrlichia phagocytophila* et/ou *Ehrlichia equi*. L'agent responsable étant inconnu, il est appelé « agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine » ou EGH (CHEN et al. 1994). Par la suite, des études ont montré que cet agent était en effet très proche de l'agent causal de la fièvre des pâturages chez les ruminants et de l'ehrlichiose

granulocytaire équine (l'analyse de la séquence de l'ARNr 16 S montre un pourcentage d'homologie respectivement de 99,9% et 99,8%). De plus, la capacité exclusive de ces organismes à envahir et se répliquer dans les neutrophiles a créé un renouveau de l'intérêt scientifique, ce qui a permis d'obtenir plus d'informations sur leur biologie moléculaire et leur pathogénie (WOLDEHIWET 2010).

En 2001, l'ensemble de ces travaux de recherche a finalement conduit à placer les trois agents de la fièvre des pâturages (*Ehrlichia phagocytophila*), de l'ehrlichiose granulocytaire équine (*Ehrlichia equi*) et de l'ehrlichiose granulocytaire humaine (EGH) comme étant des variants d'une seule espèce : *Anaplasma phagocytophila* (DUMLER et al. 2001). Comme nous l'avons déjà mentionné, ce regroupement se base sur des similitudes génétiques (séquence de nucléotides de l'ADN codant pour l'ARNr 16 S (plus de 99,5% d'homologie (CHEN et al. 1994)), pour l'opéron groESL, un gène codant pour une protéine de choc thermique, et pour des gènes codant pour les protéines de surface) et antigéniques, sur leur tropisme pour les granulocytes et leur morphologie similaire. En janvier 2002, l'adjectif « phagocytophila » est corrigé en « phagocytophilum » afin de s'accorder avec le nom d'espèce « Anaplasma » (EUZEBY 2002). La forte parenté phylogénétique a également été confirmée par l'analyse des séquences du gène *gltA*, codant pour la citrate synthétase, enzyme régulant la production d'ATP, et du gène *ankA* qui code pour une protéine variable (VON LOEWENICH et al. 2003; EUZEBY 2002).

Cependant, les souches en cause dans la fièvre des pâturages chez les ruminants en Europe diffèrent de celles causant l'anaplasmose granulocytaire humaine aux Etats-Unis et dans certaines parties de l'Europe, si l'on tient compte de leur distribution géographique, leurs hôtes cibles, leurs manifestations cliniques et la gravité de la maladie qu'elles engendrent (pouvoir pathogène). C'est pourquoi Dumler propose de garder la distinction qui existait auparavant entre les trois souches en créant des variants ou biovars: A. phagocytophilum biovar Phagocytophila, A. phagocytophilum biovar Equi et A. phagocytophilum biovar HGE (Human granulocytic ehrlichiosis). Si pour Dumler et al. les différences qui existent entre les trois variants ne suffisent pas à justifier leur place dans des espèces différentes, et possèdent au moins 98,2% de similarités avec les espèces du genre Anaplasma, pour Inokawa et al., ces trois bactéries pourraient constituer un groupe proche mais différent de ce genre (EUZEBY 2002). Ceux-ci rappellent notamment qu'initialement, les Anaplasma spp. (A. caudatum, A. centrale, A. marginale et A. ovis) infectent les globules rouges alors que E. phagocytophila, E. equi et l'agent de l'EGH infectent principalement les granulocytes. A l'avenir, il se pourrait donc que de nouveaux changements interviennent avec la création possible d'un nouveau genre destiné à accueillir ces trois variants (EUZEBY 2002).

I. Bactériologie et épidémiologie

A. <u>Bactériologie</u>

Comme toutes les bactéries du genre Anaplasma, A. phagocytophilum est une bactérie aérobie Gram négative, de petite taille (0,2 à 2 µm de diamètre), de forme coccoïde ou ellipsoïdale. Contrairement à la majorité des bactéries Gram négatives, A. phagocytophilum n'est pas entourée de lipopolysaccharides. C'est une bactérie intracellulaire obligatoire stricte : elle infecte les cellules de la lignée myéloblastique des mammifères, préférentiellement les granulocytes neutrophiles matures circulants (BAYARD-MC NEELEY et al. 2004) et, plus rarement, les granulocytes éosinophiles. En microscopie électronique, on les observe le plus souvent au sein de morulae cytoplasmiques sous la forme de corps réticulés d'une taille de 0,8 à 2 μm de diamètre et de corps élémentaires (ou corps initiaux denses), mesurant 0,2 à 0,4 µm. Les deux formes se divisent par scission binaire. Beaucoup plus rarement, on peut les retrouver de façon clairsemée dans le cytoplasme de la cellule (SELLS et al. 1976)(Figure 9). Les morulae ne sont pas en contact avec les mitochondries et ont un diamètre compris entre 1,5 et 2,5 µm (EUZEBY 2002), mais celui-ci peut aller jusqu'à 7 μm. En microscopie optique, elles peuvent être mises en évidence à l'aide de colorations classiques, telle que celle au MGG sur un frottis sanguin. Elles apparaissent alors d'une couleur pourpre-violine (Figure 8). Elles ne sont pas distinguables des morulae d'Ehrlichia ewingii.

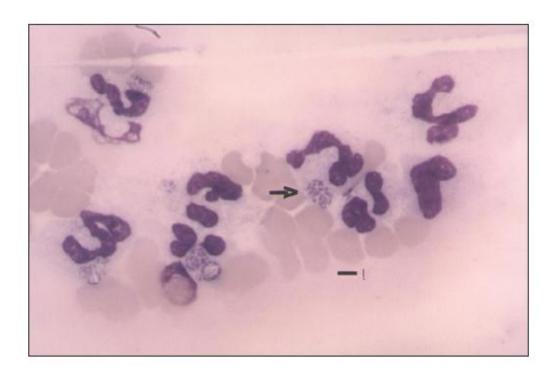


Figure 8 : Observation de morulae intra-granulocytaires (flèche) sur un frottis de sang périphérique d'un chien Labrador mâle de 7 ans (barre = 6 µm) (source : LESTER et al. 2005)



Figure 9 : Les trois répartitions possibles d'A. phagocytophilum au sein des granulocytes infectés (source : CHIMIER 2006)

Le génome d'A. phagocytophilum est constitué d'un unique chromosome circulaire, comprenant 1,47 megabases (Mb) codant pour 458 protéines hypothétiques (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). Il existe plusieurs souches génétiques d'A. phagocytophilum (MORISSETTE et al. 2009) qui se distinguent par des différences biologiques, écologiques (variabilité des vecteurs, des hôtes, de la répartition géographique, de la protection croisée et de la pathogénicité (STUEN et al. 2003 ; GREIG & ARMSTRONG 2006)) et génétiques. On distingue principalement trois biovars, correspondant anciennement aux trois germes regroupés sous le nom d'A. phaqocytophilum par Dumler et al. en 2001 : le biovar Phagocytophila, le biovar Equi et le biovar HGE. Malgré de grandes similitudes génétiques, le séquençage de fragments amplifiés de l'ARNr 16S a permis de montrer par exemple une différence de 2 nucléotides entre le biovar Phagocytophila et le biovar Equi, ainsi qu'entre le biovar HGE et Phagocytophila et de 3 nucléotides entre les biovars HGE et Equi (CHEN et al. 1994). Les souches affectant les ruminants domestiques en Europe et le cerf de Virginie aux Etats-Unis semblent différentes de celles infectant les chevaux, les hommes et les chiens sur la base du séquençage des gènes codant pour des protéines de surface (DE LA FUENTE et al. 2005). De plus, le biovar Phagocytophila ne semble induire une maladie que chez les ruminants domestiques en Europe (Suède, Norvège, Finlande, Grande-Bretagne, Irlande, Pays-Bas, Suisse, France, Autriche, Allemagne, Espagne)(GREIG & ARMSTRONG 2006). Les bovins et les moutons n'expriment pas la maladie lorsqu'ils sont infectés par le biovar HGE mais effectuent une séroconversion. De même, des infections expérimentales de chevaux avec le biovar Phagocytophila et de bovins avec le biovar Equi se révèlent asymptomatiques, mais induisent une séroconversion et une protection croisée vis-à-vis des différents biovars.

On a pu identifier par culture et PCR 262 souches et 230 isolats d'A. phagocytophilum, déposés dans la base de données GenBank (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012), ne représentant qu'une fraction de toutes les séquences génétiques de ce microorganisme existant dans le monde. Des analyses phylogénétiques basées sur le gène de la protéine de choc thermique groESL ont permis de dégager deux grandes lignées de souches, une lignée

nord-américaine, et une lignée européenne. L'analyse de la séquence du gène *Ank* sépare la lignée nord-américaine en deux clades et celle de la séquence du gène *groESL* subdivise la lignée européenne en trois clades (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). De plus, les souches américaines semblent être plus virulentes que leurs homologues européennes (BARBET et al. 2006; DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). Si l'on analyse les séquences des gènes *p44*, *omp-1N*, *msp2* et *AnkA*, on peut constater une variation significative entre les différentes souches de la bactérie (RIKIHISA 2011).

Chez le chien, quasiment tous les isolats européens et américains semblent être des souches du biovar HGE (GREIG & ARMSTRONG 2006). Des études récentes ont pu dégager au moins cinq variants génétiques d'A. phagocytophilum chez le chien, sur la base du séquençage de l'ARNr 16S (POITOUT et al. 2005). Des clades distinctes pourraient avoir des différences de pathogénicité dans l'anaplasmose granulocytaire canine (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012).

B. Epidémiologie

1. Répartition géographique

Des infections canines par A. phagocytophilum biovar HGE ont été décrites partout dans le monde. Elles suivent en fait les aires de répartition des tiques du genre Ixodes, vecteurs qui les transmettent (FOLEY et al. 2001). En Europe, on retrouve ainsi des cas en Suède (EGENVALL et al. 1998; ENGVALL et al. 1996), en Italie (LILLINI et al. 2006; TARELLO 2003), en Suisse (PUSTERLA et al. 1998), en Slovénie (TOZON et al. 2003), en Norvège et aux Pays bas, en Pologne (RYMASZEWSKA & ADAMSKA 2011), au Royaume-Uni, en Allemagne (GREIG & ARMSTRONG 2006; JENSEN et al. 2007), en Autriche (KIRTZ et al. 2000; KIRTZ et al. 2007), au Danemark, en Grèce, en Espagne (SAINZ et al. 2000), en République Tchèque (KYBICOVA et al. 2009), en Turquie (GÜNES et al. 2011) et en France où un premier cas a été diagnostiqué en 2008 (TROMBINI 2008). Une cartographie de distribution des cas en France a pu être réalisée dans d'autres espèces, et a confirmé que la répartition géographique des cas suivait celle du vecteur I. ricinus (JONCOUR 2007). On retrouve également des cas d'anaplasmose granulocytaire canine sur le continent américain et en Asie (Thaïlande, Corée, Russie...)(GREIG & ARMSTRONG 2006). Très récemment, on a pu identifier la bactérie dans des populations d'Ixodes ricinus en Estonie et dans les parties européennes de la Russie et de la Biélorussie (KATARGINA et al. 2012).

2. Vecteurs et modes de transmission

L'anaplasmose granulocytaire est une maladie à transmission vectorielle. Le principal vecteur de cette bactérie est une tique dure du genre *Ixodes*, et on rappelle que seuls les stades nymphes et adultes peuvent induire la maladie, le germe étant transmis uniquement par transmission transstadiale chez les tiques. On retrouve aux Etats-Unis *I. scapularis* principalement, ainsi que *I. pacificus* (GREIG & ARMSTRONG 2006), *I. dentatus et I. spinipalpis* (TROMBINI 2008). Le génome de la bactérie a également été identifié en Asie et en Russie chez *I. persulcatus* (GREIG & ARMSTRONG 2006; RAR et al. 2008). *Ixodes*

trianguliceps a été décrit en Grande Bretagne (BOWN et al. 2003) et en Russie (TELFORD et al. 2002). En Europe, il s'agit principalement d'Ixodes ricinus que nous présenterons plus en détail ici. Notons que la bactérie a cependant été isolée chez I. ventalloi au Portugal (SANTOS et al. 2004). Récemment, A. phagocytophilum a également été retrouvée chez des tiques du genre Rhipicephalus sanguineus, Rhipicephalus bursa, Dermacentor marginatus, Hyalomma marginatum et Hyalomma punctata (DE LA FUENTE et al. 2004; MERINO et al. 2005; NARANJO et al. 2006; TOLEDO et al. 2009; TORINA et al. 2008; GHAFAR & AMER 2012) dans le bassin méditerranéen et dans des zones où I. ricinus se fait rare. Il semblerait donc qu'A. phagocytophilum soit capable de s'adapter et de survivre dans d'autres espèces de tiques que celles du genre Ixodes. De plus, la présence de la bactérie au sein de tiques Rhipicephalus sanguineus pose la question d'une co-infection possible de ces tiques avec Anaplasma phagocytophilum et Anaplasma platys, habituellement transmise par celles-ci.

a) Particularités du genre Ixodes ricinus

Taxonomie et morphologie



Figure 10 : Ixodes ricinus (femelle gorgée) (source : http://www.pbase.com/image/47770482)

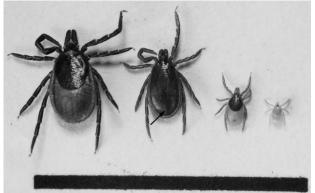


Figure 11 : *Ixodes ricinus* non gorgées: de gauche à droite: femelle, mâle, nymphe et larve (barre= 1cm) (source : PAROLA & RAOULT 2001)

Pour rappel, *Ixodes ricinus* est une tique dure appartenant au genre *Ixodes*, de la famille des *Ixodidae* (prostriata=sillon anal antérieur à l'anus, pas d'yeux, pas de plaques ventrales sur la femelle). Il s'agit d'une tique **longirostre**, globuleuse, de couleur gris clair, dont la taille varie de 2 mm à 1 cm en fonction du degré de réplétion. Il existe un dimorphisme sexuel marqué au stade adulte (Figure 11).

Tropisme et habitat

C'est une tique **exophile**: son habitat est beaucoup moins spécifique que celui de *Rhipicephalus sanguineus*, elle attend son hôte à l'affût sur la végétation dans des biotopes ouverts tels que des forêts ou des prairies (GUIGEN & DEGEILH 2001), dans les zones ombragées et fraiches à proximité du sol (haies, bosquets, landes, lisière des bois...). C'est en

effet une tique **hygrophile**, qui craint de trop fortes chaleurs (optimum de température entre 7 et 20°C) et a besoin d'humidité (humidité relative d'au moins 70 à 90% pour que la tique survive, surtout pour les stases immatures)(CHABANNE et al. 2011; BOURDEAU 1993). Ces tiques sont **ubiquistes**, elles n'ont pas de tropisme d'hôte étroit, au moins pour les formes immatures (larve et nymphe), qui vont parasiter mammifères, oiseaux, reptiles... et préférentiellement les micromammifères (rongeurs et insectivores)(BOURDEAU 1993). Celles-ci sont non sexuées et attendent leur hôte passivement. Le stade adulte, sexué, est plus sélectif, il parasitera préférentiellement les ongulés et les carnivores. C'est donc une espèce **télotrope**. La recherche de l'hôte sera active, grâce à un organe olfactif à l'extrémité des pattes antérieures (TROMBINI 2008). Les hôtes jouent un rôle différent selon les stases : certains sont des hôtes habituels, d'autres accidentels. Certains permettent la dissémination des tiques (ex : les oiseaux pour les nymphes), et d'autres par leur abondance ont un rôle de maintien de la population (ex : micromammifères).

Sur l'hôte, *I. ricinus* se fixe préférentiellement au niveau de l'ars, de l'aine, des mamelles, du scrotum et de l'anus.

Particularités biologiques

Le cycle de développement d'Ixodes ricinus, est semblable dans son déroulement à celui des tiques dures présenté précédemment. Il compte, comme on l'a vu, trois phases parasitaires sur hôtes, correspondant à trois repas sanguins et trois phases libres intermédiaires correspondant aux mues successives et à la digestion. La durée totale du cycle est variable, de 6 mois à plusieurs années, et est en moyenne de 2 à 3 ans au sud de son aire de répartition (BOURDEAU 1993). La durée des différentes phases du cycle est présentée dans la Figure 12 ci-dessous :

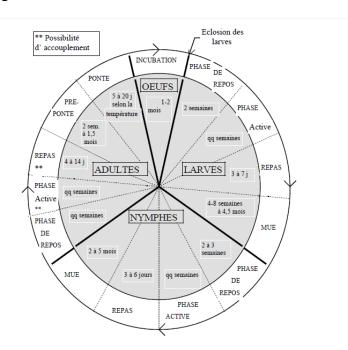


Figure 12 : Durée des différentes phases du cycle biologique d'*Ixodes ricinus* (source : GUETARD 2001)

Comme pour la majorité des tiques dures, l'accouplement se fait directement sur l'hôte ou bien sur le sol. La femelle émet des molécules volatiles (phéromones) qui attirent les mâles. Ceux-ci transmettent aussi une protéine lors de l'accouplement qui stimule l'appétit sanguin de la femelle. La femelle gorgée prend environ 3 mL de sang et peut augmenter de taille jusqu'à 1 cm. Après accouplement, la femelle pond des œufs via une ponte unique et abondante (2 000 à 3 000 œufs) en 5 à 20 jours puis meurt. Le mâle meurt de suite.

Distribution géographique

lxodes ricinus est largement distribuée dans toute l'Europe. Il s'agit de l'espèce de tiques la plus répandue en France, quoi qu'elle se fasse plus rare en altitude à plus de 1 000 mètres ainsi que sur le pourtour méditerranéen (Figure 13)(CHABANNE et al. 2011). Le degré hygrométrique, l'abondance des hôtes et la couverture végétale déterminent la densité des tiques dans une région donnée (GUIGEN & DEGEILH 2001). Pour les tiques exophiles, la cartographie par le biais de la végétation, lorsque celle-ci est bien individualisée, permet une approche assez précise des populations (PEREZ-EID & GILOT 1998a).



Figure 13 : Répartition géographique d'Ixodes ricinus en France (source : http://www.esccap.fr/)

Activité saisonnière

Les périodes d'activité ne sont pas synchrones pour les différents stades de développement et varient en fonction de la latitude. En France, les adultes sont particulièrement actifs **au printemps de mai à juin et en automne, en septembre**. La durée du cycle de développement est surtout dépendante de la température sous nos latitudes. Les températures douces et les hivers courts favorisent des cycles rapides (CHABANNE et al. 2011). Une phase de pseudo-diapause peut avoir lieu pour les stases immatures et les œufs en été et au début de l'automne jusqu'au printemps suivant. Une vraie diapause intervient pour les tiques à jeun. La photopériode pourrait jouer un rôle (BOURDEAU 1993).

b) D'autres vecteurs sont-ils possibles?

On a pu retrouver des acariens plumicoles porteurs de la bactérie sur des oiseaux (SKORACKI et al. 2006). De l'ADN d'A. phagocytophilum a également été identifié chez des puces (LAPPIN et al. 2006). Cependant le rôle de vecteurs de ces organismes n'est pas certain, ceux-ci pouvant simplement s'être nourris sur des hôtes infectés, mais il n'est pas prouvé qu'ils soient capables de transmettre l'infection par la suite.

c) Modes de transmission secondaires

D'autres modes de transmission, secondaires, pourraient exister. Chez l'homme, des cas de transmission périnatale ont été rapportés (HOROWITZ et al. 1998), et chez les bovins, la possibilité d'une transmission transplacentaire a été documentée (GREIG & ARMSTRONG 2006 ; PUSTERLA et al. 1997). Des veaux ont également présentés des signes cliniques de la maladie après avoir ingéré du colostrum contaminé expérimentalement par A. phagocytophilum (PUSTERLA et al. 1998). De plus, certains auteurs ont évoqué, après une enquête épidémiologique, la possibilité d'une transmission via un contact direct ou étroit avec des sécrétions sanguines ou respiratoires chez un patient humain décédé d'anaplasmose granulocytaire (CARRADE et al. 2009). Trois cas d'anaplasmose granulocytaire humaine ont été suspectés sur des bouchers qui avaient préalablement découpé des carcasses de daims. L'hypothèse d'une transmission par effraction cutanéomuqueuse a alors été émise (BAKKEN et al. 1996). Cependant, des études récentes montrent que la souche affectant les daims aux Etats-Unis semble distincte de celle affectant l'homme (DE LA FUENTE et al. 2005 ; MASSUNG et al. 2005). Ces individus peuvent avoir été mordus sans s'en rendre compte par des tiques. De plus, une transmission nosocomiale pourrait être possible, avec une suspicion récente sur des patients en Chine (KRAUSE & WORMSER 2008; ZHANG et al. 2008). Enfin, la maladie serait transmissible par transfusion sanguine (KEMPERMAN et al. 2008).

3. Espèces sensibles et réservoirs

A. phagocytophilum infecte et peut potentiellement entraîner des signes cliniques chez les bovins, moutons, chèvres, chevaux, chiens, chats, êtres humains (BREITSCHWERDT 2000; GREIG & ARMSTRONG 2006), ainsi que chez des individus de la faune sauvage (JONCOUR 2007), tels que les chevreuils ou les cerfs.

Les réservoirs de la maladie doivent être des animaux vivants pour permettre la survie de la bactérie pendant l'hiver, celle-ci étant un microorganisme intracellulaire obligatoire. Ils sont en relation directe avec les espèces hôtes des tiques vectrices. Le **chien domestique** n'est pas un réservoir suffisant car il ne se contamine qu'occasionnellement, lors de promenades en forêts par exemple. De plus, la durée de la bactériémie chez le chien et l'homme est inférieure à 28 jours. C'est pourquoi on considère qu'ils jouent un rôle de moindre importance dans la transmission de l'infection par la tique à d'autres espèces hôtes (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). Les **ruminants** domestiques et sauvages sont très fortement suspectés d'être des réservoirs de la bactérie (HALOS et al. 2006), y compris les

petits ruminants (moutons, chèvres)(MASSUNG et al. 2006). Les cervidés sauvages et les micromammifères sont en première ligne. On a effectivement pu montrer que les chevreuils sont très souvent infestés par des tiques et constituent très probablement un réservoir naturel de la bactérie (ALBERDI et al. 2000 ; LIZ et al. 2002; GREIG & ARMSTRONG 2006). En France, la séroprévalence (par immunofluorescence indirecte) est estimée à 75% (JONCOUR 2006). De plus, le chevreuil étant peu sensible à l'infection (STUEN et al. 2001) mais très réceptif, ce serait par définition un très bon candidat en tant que réservoir de la bactérie. Des études menées par les Unions Régionales de Groupements Techniques Vétérinaires depuis une quinzaine d'années semblent également aller en ce sens (TROMBINI 2008). Cependant, d'autres auteurs pensent que le chevreuil pourrait être un cul de sac épidémiologique pour la bactérie éliminant de façon naturelle l'agent pathogène (JONCOUR 2007). Dans d'autres pays, les sangliers, les renards (PETROVEC et al. 2003) mais aussi le cerf de Virginie aux Etats-Unis (TATE et al. 2005) sont suspectés de jouer sinon un rôle de réservoir pour la bactérie, un rôle de sentinelle pour l'anaplasmose granulocytaire humaine (zoonose, cf. paragraphe ultérieur). Les micromammifères, tels que les mulots, les souris, les campagnols ou les musaraignes notamment semblent de même constituer des réservoirs d'Anaplasma phagocytophilum (GREIG & ARMSTRONG 2006). On a pu identifier des larves de tiques prélevées sur ceux-ci porteuses de la bactérie (LIZ et al. 2000).

Remarque : il semble que la dissémination de l'agent pathogène soit plus efficace si la tique vectrice s'est préalablement gorgée sur un cervidé plutôt que sur un micromammifère, généralement moins parasité (JONCOUR 2007).

Les **oiseaux** pourraient également avoir de l'importance dans la distribution géographique ou la dissémination de l'infection, lors de leur migration (GREIG & ARMSTRONG 2006). Ce sont des hôtes pour les tiques du genre *Ixodes* et leur rôle de réservoir pour *A. phagocytophilum* est envisagé aux Etats-Unis, où une étude a pu monter que des oiseaux pouvaient transmettre l'infection à des larves de tiques qui se nourrissaient sur eux en même temps que des nymphes infectées (DANIELS et al. 2002).

Enfin, les **canidés sauvages** sont également suspectés de constituer un réservoir de la bactérie ou une sentinelle pour l'infection humaine aux Etats-Unis notamment (PUSTERLA et al. 2000).

4. Infections concomitantes

Nous avons déjà vu précédemment que la tique *I. ricinus* pouvait transmettre plusieurs agents pathogènes en même temps (Chap. 1, II., E.). De nombreux travaux ont montré une incidence fréquente de co-infections des animaux avec *Anaplasma phagocytophilum* et d'autres maladies transmises par les tiques. Une étude au sein d'un chenil aux Etats-Unis a mis en évidence un haut degré de co-infections des chiens avec *Ehrlichia spp.*, *Bartonella spp.*, *Rickettsia spp.*, et *Babesia spp.* (KORDICK et al. 1999). En Thaïlande et au Venezuela, des co-infections à *A. phagocytophilum*, *E. canis*, et *A. platys* ont également été décrites

(EUZEBY 2002). Seules deux études font suspecter la co-infection de chiens avec *Anaplasma* phagocytophilum et *Hepatozoon canis* (BEAUFILS & LEGROUX 1992; MYLONAKIS et al. 2004).

De plus, *Borrelia burgdorferi*, l'agent de la maladie de Lyme, est transmis par la même espèce de tique et possèdent les mêmes rongeurs réservoirs qu'*Anaplasma phagocytophilum* (CARRADE et al. 2009). Ceci peut expliquer l'observation très fréquente de co-infections du chien avec les deux agents (NIETO & FOLEY 2009). Il semble que les deux organismes soient synergiques, induisant ensemble chez l'animal une pathogénicité plus forte que lors d'infection impliquant un seul des deux agents (NYARKO et al. 2006; BEALL et al. 2008).

5. Saisonnalité

Elle dépend du vecteur et de la région concernée (POITOUT & CHABANNE 2004), les différences de climat étant à l'origine de différences de saison d'activité des vecteurs.

Aux Etats-Unis, les cas semblent apparaître majoritairement du début du printemps en avril au début de l'été en juillet, et quelques cas au début de l'automne, au mois d'octobre (POITOUT et al. 2005; GREIG & ARMSTRONG 2006). Dans le Minnesota et le Wisconsin, la saison d'occurrence de la maladie correspond à la période d'activité de la tique *Ixodes scapularis*, à la fin du printemps/début de l'été (mai, juin, début juillet) et en automne (octobre, novembre) (GREIG et al. 1996; BEALL et al. 2008). En Suède, les cas sont fréquents à partir du milieu de l'été jusqu'à la fin de l'automne (GREIG & ARMSTRONG 2006). En Allemagne, à Berlin, la répartition saisonnière des cas s'étale d'avril à septembre et de nouveau au mois de novembre, reflétant également le pic d'activité des tiques nymphes et adultes (KOHN et al. 2008). Ceci correspond aussi probablement à la période de l'année ou les propriétaires et leurs chiens font le plus d'activités extérieures, et sont donc plus exposés. En France, il semblerait que l'on retrouve de la même façon plus d'individus infectés au printemps de mars à juin et à l'automne de septembre à octobre (DROUFFE 2007)(Figure 14).

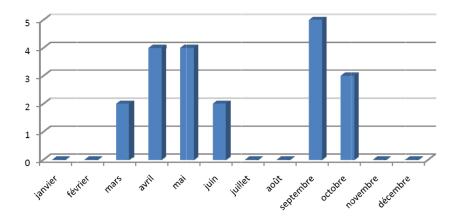


Figure 14 : Répartition des cas d'anaplasmose granulocytaire canine au cours de l'année en France, selon une enquête menée auprès des vétérinaires en 2007 (source : DROUFFE 2007)

6. Facteurs de réceptivité

On distingue des facteurs de réceptivité intrinsèques et extrinsèques.

a) Facteurs intrinsèques

Il n'existe pas de prédisposition de sexe pour la maladie (POITOUT & CHABANNE 2004). En ce qui concerne la race, beaucoup d'études montrent une prévalence plus forte chez les Labradors Retrievers et les Golden Retrievers (CARRADE et al. 2009 ; GREIG & ARMSTRONG 2006). Cependant, ces données semblent uniquement refléter la popularité de ces races et leur affection pour les activités extérieures. D'autres études font d'ailleurs rapport d'aucune prédisposition raciale (GREIG et al. 1996; POITOUT et al. 2005; KOHN et al. 2008). L'âge semble avoir une influence sur le développement clinique de la maladie. Dans une étude suédoise, la proportion de chiens séropositifs augmente avec l'âge de la population, reflétant une augmentation de la probabilité d'exposition au fil du temps (EGENVALL, BONNETT et al. 2000). L'âge moyen des animaux exprimant la maladie est de 6-8 ans (moyenne de 6 mois à 14 ans) (GREIG et al. 1996; POITOUT et al. 2005; KOHN et al. 2008; EGENVALL et al. 1997) avec un tiers des individus ayant plus de 8-10 ans (POITOUT & CHABANNE 2004; GREIG & ARMSTRONG 2006). Les jeunes chiens de moins de un an sont très peu souvent affectés par l'infection à A. phagocytophilum (POITOUT & CHABANNE 2004; GREIG & ARMSTRONG 2006; POITOUT et al. 2005; EGENVALL et al. 1998), et plus sensibles à d'autres maladies transmises par les tiques. Ces données doivent cependant être comparées à la démographie de la population canine avant de conclure à une relation entre l'âge et l'infection. Dans d'autres espèces où cette influence de l'âge est constatée, une hypothèse de cette résistance apparente, discutée, serait une corrélation avec une immunité colostrale (STUEN et al. 1992). Mais ces mécanismes ne sont pas complètement élucidés.

b) Facteurs extrinsèques

Plusieurs facteurs extrinsèques peuvent influer sur l'expression clinique de la maladie, jusque-là subclinique. Ainsi, un environnement stressant, une injection de corticoïdes à dose immunosuppressive, et plus généralement tout facteur susceptible d'induire une baisse de l'immunité favorisent l'expression clinique de la maladie (âge, gravidité, maladie intercurrente, etc.).

II. Expression clinique

A. Symptômes

Chez le chien, la maladie est le plus souvent inapparente ou bénigne, autolimitée (CARRADE et al. 2009; COCKWILL et al. 2009; EGENVALL et al. 1997). L'incubation est de une à deux semaines (CARRADE et al. 2009). Lorsque l'animal présente des signes cliniques (observés le plus souvent lors de la phase aigüe de la maladie, durant la phase de bactériémie (< 28 jours)), il s'agit de signes généraux non spécifiques rapportés dans plus de

75 % des cas : hyperthermie (> 39,2°C), léthargie, dépression, anorexie (GREIG & ARMSTRONG 2006; COHN 2003; HESELTINE et al. 2003). Des signes de douleur musculosquelettique, comme une gêne au mouvement, des boiteries, de la faiblesse, de la raideur concernent plus d'un animal sur deux (POITOUT & CHABANNE 2004; GREIG & ARMSTRONG 2006; EGENVALL et al. 1997). Les signes de polyarthrite et de douleurs articulaires sont plus rares et touchent moins de 10 % des chiens (POITOUT & CHABANNE 2004; GREIG & ARMSTRONG 2006; FOLEY et al. 2007). D'autres signes, encore plus rares, sont parfois rapportés : respiratoires (toux légère et non productive, difficultés pour respirer), gastrodiarrhée, vomissements), neurologiques (polydipsie, (tremblements, convulsions, ataxie, déficits proprioceptifs...)(GREIG et al. 1996; POITOUT & CHABANNE 2004; POITOUT et al. 2005; GREIG & ARMSTRONG 2006; CARRADE et al. 2009). L'association entre les signes neurologiques et l'infection n'est cependant pas clairement établie (JADERLUND et al. 2007). Très rarement, des lésions cutanées peuvent être observées (TOZON et al. 2003), ainsi que des signes hémorragiques sous forme d'épistaxis, de pétéchies ou de méléna (CARRADE et al. 2009). La plupart du temps, la thrombopénie n'a pas de répercussion clinique (POITOUT & CHABANNE 2004). Globalement cette affection est moins grave que celle à Ehrlichia canis (HESELTINE et al. 2003). Les animaux coinfectés avec Borrelia burgdorferi et Anaplasma phagocytophilum sont plus susceptibles de développer des boiteries avec douleurs articulaires et épanchements articulaires, mais les symptômes ne sont pas forcément plus sévères (EBERTS et al. 2011).

B. Signes biologiques

1. Hémogramme

On observe une **thrombopénie** d'intensité variable dans 80 à 90 % des cas, avec un nombre de plaquettes allant de 5 à 164. 10⁹/L (GREIG et al. 1996 ; EGENVALL et al. 1997 ; POITOUT et al. 2005 ; KOHN et al. 2008). Celle-ci dure plusieurs jours avant le retour à la normale. Le nombre de plaquettes commence à diminuer avant que l'on puisse observer des morulas intracytoplasmiques sur le frottis sanguin. Une **lymphopénie** est constatée dans 67 % des cas avec parfois une éosinopénie (POITOUT & CHABANNE 2004). En ce qui concerne la numération des neutrophiles, on peut observer aussi bien une neutropénie qu'une neutrophilie. Une monocytose et une lymphocytose réactive sont parfois observées chez le chien. Une **anémie** légère à modérée, non régénérative, normochrome et normocytaire peut également être présente, dans moins de la moitié des cas (POITOUT & CHABANNE 2004). Enfin, lorsqu'un examen de la moelle osseuse est effectué, on peut constater une cellularité normale à augmentée avec une augmentation du nombre absolu de mégacaryocytes, signant une thrombopoïèse active à mettre en corrélation avec la thrombopénie (LILLIEHÖÖK et al. 1998).

2. Modifications biochimiques

Une augmentation fréquente des enzymes hépatiques est décrite: phosphatases alcalines (PAI) dans la quasi-totalité des cas (GREIG & ARMSTRONG 2006; POITOUT & CHABANNE 2004) et amylase sérique dans la moitié des cas (POITOUT & CHABANNE 2004). Certains animaux peuvent aussi présenter une hypoalbuminémie modérée lors de la phase fébrile (44 à 66 % des cas (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012)), une hyperglobulinémie (GREIG et al. 1996; GRAVINO et al. 1997; EGENVALL et al. 1997; POITOUT et al. 2005), une hypophosphatémie, ainsi qu'une élévation du fibrinogène. Cependant, ces paramètres reflètent la mise en place d'une réaction inflammatoire et ne sont pas spécifiques de l'anaplasmose granulocytaire. Quelques études font rapport, dans de rares cas, d'une diminution de l'urémie et de la kaliémie, d'une augmentation de la bilirubine totale, d'une densité urinaire basse (isosthénurie ou hyposthénurie) et d'une protéinurie (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012).

3. Modifications histologiques

Elles sont légères et peuvent se retrouver au niveau des nœuds lymphatiques, de la rate, du foie (infiltration lymphohistiocytaire, hyperplasie...), de la moelle osseuse (plasmocytose et histiocytose) et des poumons (infiltration interstitielle)(POITOUT & CHABANNE 2004; GREIG & ARMSTRONG 2006 ; CARRADE et al. 2009).

C. Evolution

La mort est très rarement observée, et l'euthanasie est rare mais parfois proposée, même lorsqu'un traitement a été entrepris (TOZON et al. 2003 ; BEXFIELD et al. 2005). Dans la majorité des cas, un traitement à base de tétracyclines conduit à une amélioration rapide de l'état de l'animal, en deux à trois jours. L'existence d'un portage chronique asymptomatique a été prouvée uniquement expérimentalement, mais les cas de rechutes sont rares, même si les chiens restent sensibles aux réinfections (GREIG & ARMSTRONG 2006). En l'absence de traitement, l'infection à *A. phagocytophilum* peut persister jusqu'à 5 mois et demi après l'inoculation (EGENVALL et al. 2000).

III. Pathogénie

A. Cycle de développement et stratégies

L'infection du chien nécessite un attachement de la tique *Ixodes ricinus* durant au moins **24 à 48 heures** (AMIEL et al. 2004; GREIG & ARMSTRONG 2006). Les modalités de transmission des bactéries du genre *Anaplasma* à l'hôte sont décrites dans un paragraphe précédent (cf. Part. 1, Chap.1, II., D., 4.). Inoculée au chien, on retrouve alors *A. phagocytophilum* préférentiellement dans les **granulocytes neutrophiles matures du sang veineux périphérique** (BAYARD-MC NEELEY et al. 2004) mais aussi dans les tissus du système phagocytaire mononucléé : **foie, rate, et moelle osseuse** (GREIG & ARMSTRONG 2006). Les

étapes du cycle de développement d'A. phagocytophilum au sein du granulocyte neutrophile ont été décrites pour la première fois en 1982, lorsque Woldehiwet et Scott observent des frottis sanguins d'animaux atteints de la « fièvre des pâturages ». L'agent responsable est appelé à l'époque Cytoecetes phagocytophila (WOLDEHIWET & SCOTT 1982). Ce cycle est proche de celui des Chlamydiae, impliquant des corps infectants, puis des corps élémentaires et réticulés qui se regroupent en morulae (Figure 15).

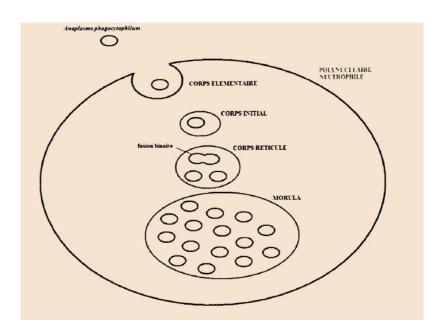
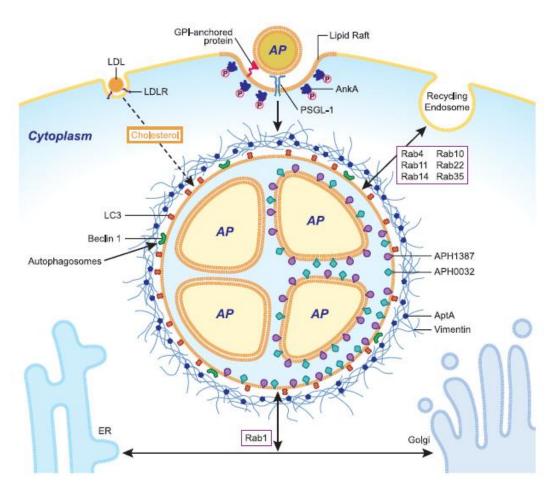


Figure 15 : Cycle de développement d'*Anaplasma phagocytophilum* au sein d'un granulocyte (modifié d'après WOLDEHIWET & SCOTT 1982) (source : TROMBINI 2008)

En premier lieu, A. phagocytophilum pénètre dans le cytoplasme des granulocytes par endocytose après s'être lié à des récepteurs de membrane (CARRADE et al. 2009). Les protéines majeures de la surface bactérienne impliquées dans l'adhésion du germe à la cellule-hôte sont les protéines Msp2(p44) (MURPHY et al. 1998; BARBET et al. 2006) (description détaillée dans le paragraphe suivant). Les principaux récepteurs de la bactérie à la surface du granulocyte neutrophile sont représentés par la protéine Psgl-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) et un tétrasaccharide de type sialyl Lewis X (GOODMAN et al. 1999; GREIG & ARMSTRONG 2006). La forme « corps dense » du micro-organisme est la seule qui puisse se lier au récepteur de la cellule-hôte, et donc la seule forme infectieuse (CARRADE et al. 2009). Lors de l'interaction avec les granulocytes de l'hôte, les bactéries usurpent la voie lipidique et incorporent le cholestérol de l'hôte, nécessaire à l'internalisation et à la survie de la bactérie dans la cellule-hôte (RIKIHISA 2010)(Figure 16).



A. phagocytophilum inclusion biogenesis. A. phagocytophilum binds to PSGL-1, a GPI-anchored protein, or an unidentified host cell receptor(s) that is localized in cholesterol-rich membrane microdomains (yellow). Three pathways of eukaryotic vesicular transport converge during A. phagocytophilum inclusion biogenesis: recycling endosomes (several Rab proteins), autophagosomes (LC3 and Beclin 1), and LDL uptake pathways (free cholesterol). This process creates a safe haven that allows A. phagocytophilum to acquire nutrients while remaining secluded from lysosomes and NADPH oxidases. Three A. phagocytophilum proteins are associated with the inclusion membrane: APH_1387, APH_0032, and APH_0233 (also called A. phagocytophilum toxin A or AptA). Vimentin is also remodeled to surround the inclusion membrane and interact with AptA. Tyrosine-phosphorylated AnkA is associated with bacterial inclusion at an early stage of infection. AP, A. phagocytophilum; LDL, low-density lipoprotein; LDLR, LDL receptor; ER, endoplasmic reticulum.

Figure 16 : Formation des inclusions d'*Anaplasma phagocytophilum* au sein du cytoplasme du granulocyte neutrophile (source : RIKIHISA 2011)

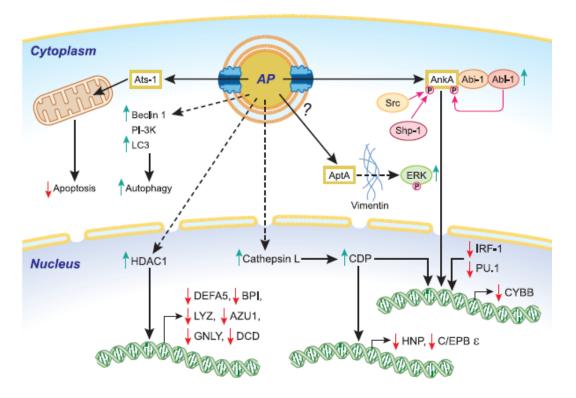
La phase exponentielle de **multiplication** du germe ne débute que **48 à 72 heures après** la pénétration dans la cellule et est maximale après 5-7 jours. On sait par ailleurs que la demi-vie d'un granulocyte neutrophile n'est que de deux à trois jours dans les tissus et 6 à 12 heures dans le sang. Si la position intracytoplasmique de la bactérie lui confère une certaine protection, celle-ci doit développer **différentes stratégies afin de pouvoir survivre et se multiplier dans la cellule-hôte**. Du point de vue de l'évolution, *A. phagocytophilum* est une bactérie Gram négative dont la paroi est dépourvue de lipopolysaccharides et de peptidoglycane, deux éléments normalement impliqués dans l'activation du système immunitaire de l'hôte (RIKIHISA 2010). Elle possède le pouvoir d'inhiber d'une part la **fusion entre le phagosome et le lysosome**: elle pénètre donc dans la cellule par un « autophagosome-like » dépourvu de lysozyme (NIU et al. 2008). Ce processus fait intervenir des protéines bactériennes, dont les Rab GTPases (HUANG 2011).

D'autre part, elle peut **réduire les attaques oxydatives** par la NADPH-oxydase et la formation de dérivés actifs de l'oxygène, en détoxifiant l'anion superoxyde O2- et en empêchant l'assemblage des composants de la NADPH au sein de la membrane vacuolaire (CARLYON & FIKRIG 2003 ; CARLYON et al. 2004 ; IJDO & MUELLER 2004 ; MAYER-SCHOLL et al. 2004 ; CHOI & DUMLER 2003; CARLYON & FIKRIG 2006). On citera également la protéine bactérienne AnkA pouvant interagir avec le génome de la cellule-hôte et perturber l'expression de gènes de défense de l'hôte codant pour des composants de la NADPH-oxidase, tels que le *gp91 phox* (GARCIA-GARCIA et al. 2009).

Mais les capacités de la bactérie ne s'arrêtent pas là : elle peut également retarder l'apoptose des granulocytes neutrophiles (SCAIFE et al. 2003 ; YOSHIIE et al. 2000; CARRADE et al. 2009; GREIG & ARMSTRONG 2006) ce qui lui laisse le temps de se multiplier. Les mécanismes de ce retardement sont encore mal connus mais pourraient intervenir dès la pénétration de la bactérie dans la cellule ou lors de son adhésion à la surface du granulocyte avant phagocytose (SAUGER 2005). Ainsi, plusieurs molécules semblent jouer un rôle, à des niveaux différents : une molécule à la surface de la bactérie induirait initialement le retard (BORJESSON, KOBAYASHI et al. 2005). La protéine P38-mapk (mitogen activated protein kinase), qui lorsqu'elle est phosphorylée et activée par un stress cellulaire ou des facteurs inflammatoires provoque l'apoptose du granulocyte neutrophile, pourrait être inhibée (TROMBINI 2008). A. phagocytophilum influerait aussi sur l'expression de gènes pro- et antiapoptotiques: l'entretien du facteur pro-apoptotique Bfl-1 contribuerait, au moins en partie, à la préservation de l'intégrité des membranes mitochondriales et à l'inhibition du clivage de la procapsase 3 en capsase 3 (forme active) induisant l'apoptose du granulocyte neutrophile (CHOI et al. 2005; CARLYON & FIKRIG 2006). L'activation des voies enzymatiques PI3K/Akt et NF-kB dans les granulocytes neutrophiles contribuerait au maintien de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, et à la libération d'IL-8 par les neutrophiles, participant aussi au retard apoptotique (SARKAR et al. 2012).

D'autres voies et signaux de la cellule-hôte sont activés par *A. phagocytophilum* et nécessaires à l'infection, comme l'**activation de la tyrosine kinase**, ou de protéines kinases de régulation de signaux extracellulaires, telles que **ERK 1/2** activée par la protéine de virulence bactérienne AptA (RIKIHISA 2011; SUKUMARAN et al. 2011)(Figure 17).

L'infection induit enfin une diminution de la mobilité des granulocytes neutrophiles et de leur adhérence aux cellules endothéliales, ce qui permet de maintenir la présence intravasculaire du germe, et de ce fait, sa disponibilité pour les tiques vectrices qui viennent se nourrir sur l'hôte infecté (CARRADE et al. 2009).



A. phagocytophilum "regulatory hijacking." A. phagocytophilum dysregulates host cellular regulatory networks by targeting pleiotropic host kinases, transcription factors, and histone-modifying enzymes. In particular, A. phagocytophilum activates at least three distinct signaling pathways involving ERK1/2, Abl, and phosphoinositide 3-kinases (PI-3K). Some of the early phosphorylation substrates identified during A.phagocytophilum infection are the bacterial T4S substrate AnkA, which binds SHP-1 through its SH2 domain, and Abi-1, which activates AbI-1. A. phagocytophilum also upregulates nuclear cathepsin L, which cleaves CDP, and CDP binds to the promoter regions of several genes to downregulate gene transcription, including the genes for the transcription factors PU.1, c/EBPε, and IRF-1. The expression of HDAC1 is upregulated, and HDAC1 binds to the promoter region of target genes to suppress transcription. CDP, CCAAT displacement protein; c/EBPε, CCAAT enhancer binding protein epsilon; IRF-1: interferon regulatory factor 1; HDAC1, histone deacetylase 1; DEFAS, human α -defensin 5; BPI, bactericidal/permeability-increasing protein; LYZ, lysozyme; GNLY, granulysin; DCD, dermcidin; HNP, human neutrophil peptide 1.

Figure 17 : Détournement des voies de régulation de la cellule-hôte au cours de l'infection par Anaplasma phagocytophilum (source : RIKIHISA 2011)

Ensuite, la bactérie sous la forme de «corps dense» se multiplie par divisions binaires au sein de la vacuole cytoplasmique, devient un **corps initial** puis un **corps réticulé** et enfin **la morula**, à l'intérieur d'un phagosome. Les bactéries sortent de la cellule-hôte via deux possibilités: soit la cellule finit par se rompre et libère les bactéries qui vont alors infecter d'autres cellules naïves (GREIG & ARMSTRONG 2006; CARRADE et al. 2009)(cytolyse), soit la morula fusionne avec la membrane de la cellule et libère les microorganismes (exocytose) (WOLDEHIWET & SCOTT 1982).

B. Pouvoir immunogène et antigénique

1. Protéine majeure de surface Msp2(p44)

Nous avons abordé ci-dessus différentes stratégies utilisées par Anaplasma phagocytophilum pour assurer sa survie intra-granulocytaire. Celle-ci peut également échapper au système immunitaire de l'hôte par l'intermédiaire de recombinaisons génétiques au niveau de la séquence du gène codant pour la protéine majeure de surface 2 de 44 kDa, Msp2(p44) (DUMLER et al. 2005): A. phagocytophilum utilise des mécanismes de conversion combinatoire pour recombiner environ 100 allèles de pseudogènes fonctionnels msp2(p44) (appartenant à une famille multigénique commune aux Anaplasmataceae, la famille pfam01617) au sein d'une région hypervariable centrale sur le site d'expression unique du gène de Msp2(p44), dont les extrémités 5' et 3' sont conservées (REJMANEK et al. 2012; GRANQUIST et al. 2008; BARBET et al. 2006; LIN et al. 2006; BARBET et al. 2003). Ceci explique les variations antigéniques que l'on peut observer au niveau de la protéine Msp2(p44). Les antigènes Msp2(p44) sont donc polymorphes. Ils interviennent de façon majeure dans l'adhésion de la bactérie à la surface de la cellule-hôte (REJMANEK et al. 2012), dans l'immunité humorale (production d'anticorps anti-Msp2), ainsi que dans la réponse immunitaire cellulaire, faisant intervenir des lymphocytes T CD4+. Ces variations génomiques, entre autres, pourraient également expliquer la persistance des infections chez certains animaux (GRANQUIST et al. 2008). Pour que cette stratégie d'échappement au système immunitaire de l'hôte soit efficace, le taux de mutation au niveau du site d'expression du gène msp2(p44) doit être assez élevé, et certains allèles pourraient s'exprimer à des taux plus élevés que d'autres (REJMANEK et al. 2012). Une étude réalisée sur des souches d'A. phagocytophilum chez des animaux domestiques et sauvages aux Etats-Unis et en Europe a pu montrer que la proximité de certains pseudogènes par rapport au site d'expression génique était significativement associée à la fréquence d'expression de ces pseudogènes (FOLEY et al. 2009). Expérimentalement, des changements de conditions de culture favorisent la prédominance ce certains variants (BARBET et al. 2003). La régulation de la transcription des pseudogènes msp2(p44) fait intervenir un certain nombre de protéines, dont la protéine ApXR (WANG et al. 2007).

BILAN

Msp2(p44) est un antigène majeur de surface spécifique d'A. phagocytophilum, ayant un pouvoir immunogène détectable par sérologie à l'aide de tests Western Blot et ELISA. Elle est différenciable d'Ehrlichia chaffeensis par Western Blot (UNVER et al. 2001). Cependant, c'est une protéine homologue avec les protéines de surface Msp2 et Msp3 d'Anaplasma marginale, avec laquelle il est possible d'observer des réactions croisées (BARBET et al. 2003; REJMANEK et al. 2012). Il semble que le locus polymorphique msp2(p44) similaire au locus d'expression génique de la protéine Msp2 d'Anaplasma marginale soit aussi conservé chez Anaplasma platys (RIKIHISA 2011). Malgré cela, elle sert aujourd'hui de base à un test de diagnostic rapide par Dot-blot ELISA (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012) développé par les laboratoires IDEXX, et pourrait intervenir dans des perspectives d'élaboration d'un vaccin (YU et al. 2012). Des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre certains épitopes des protéines Msp2(p44) ont été synthétisés et impliqués dans l'inhibition de l'infection (WANG et al. 2006).

2. Autres protéines de surface

D'autres protéines antigéniques de surface bactérienne, moins étudiées, semblent également impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte contre A. phagocytophilum :

- La **protéine Msp5**: elle pourrait être utile pour le diagnostic sérologique antigénique de l'infection chez le chien et l'homme. Cependant, il existe des similitudes de séquence du gène orthologue *msp5* avec des espèces apparentées du genre *Anaplasma* et *Ehrlichia*, et des réactions croisées sont possibles, notamment avec *Anaplasma marginale*, si les tests sérologiques employés se basent sur le peptide entier en tant qu'antigène (STRIK et al. 2007; ALLEMAN et al. 2006).
- Trois **protéines de haut poids moléculaire**, respectivement de 100, 130 et 160 kDa, stables, ont été mises en évidence par STOREY et al. (1998). Cependant peu de donnés sont encore disponibles sur ces protéines, et des études supplémentaires permettraient de mieux comprendre leur rôle dans les mécanismes immunitaires et leur possible implication dans l'élaboration d'un vaccin.
- Les protéines majeures de surface Asp62 et Asp55, ainsi que les protéines Omp85 et Omp1-A récemment découvertes (GE & RIKIHISA 2007): là encore, des études complémentaires seraient nécessaires pour mieux cerner leur rôle dans l'immunité du chien contre la bactérie.

C. Pouvoir pathogène et physiopathologie

Lors de la morsure de la tique Ixodes ricinus, les bactéries se retrouvent dans le tissu périphérique dans un mélange de lymphe et de sang. Par la suite, une réaction inflammatoire se met en place avec un afflux de granulocytes neutrophiles sains sur le site de la morsure. Il semblerait que cette concentration de granulocytes neutrophiles facilite l'infection des cellules et la dissémination de l'infection grâce à la migration des granulocytes nouvellement infectés. Cependant, le moment et la façon dont les cellules transmettent l'agent pathogène entre elles ne sont pas clairement déterminés. Des questions subsistent encore : quelles sont les étapes qui précèdent l'infection des granulocytes matures circulants et quelles sont les cellules qui assurent la dissémination de l'agent infectieux? Chez l'homme, le micro-organisme induit la libération d'IL-8 et l'augmentation de l'expression à la surface de la cellule de CXCR2, un récepteur de l'IL-8 qui pourrait conduire au recrutement des nouveaux neutrophiles sur le site de l'infection, susceptibles de s'infecter à leur tour, permettant l'absorption ultérieure du germe par les tiques non infectées (AKKOYUNLU et al. 2001; SCORPIO et al. 2004). De plus, Anaplasma phagocytophilum peut infecter des cellules de la moelle osseuse CD 34+ (KLEIN et al. 1997), des cellules de la lignée mégacaryocytaire (GRANICK et al. 2008), ainsi que des cellules endothéliales (MUNDERLOH et al. 2004) qui pourraient servir de cellules réservoirs pour le transfert de la bactérie entre les neutrophiles du sang périphérique (CARRADE et al. 2009). En effet, MUNDERLOH et al. (2004) ont montré que l'endothélium des vaisseaux possède une étroite relation avec les cellules circulantes in vivo et pourrait jouer un rôle.

Par ailleurs, les mécanismes exacts à l'origine des signes cliniques observés restent encore mal connus. La réaction inflammatoire déclenchée par l'infection à *A. phagocytophilum* se traduit par la dégranulation des granulocytes neutrophiles, induisant une réponse pro-inflammatoire (CHOI et al. 2004 ; KIM & RIKIHISA 2000), sans doute en partie responsable des lésions tissulaires (DUMLER et al. 2007). La gravité de l'infection semble notamment corrélée à l'importance de la libération de l'IFN-γ et de l'IL-10 (DUMLER et al. 2005). La C-Jun NH2-terminale kinase 2 (JNK2) inhiberait d'ailleurs la production d'IFN-γ par les lymphocytes T NK, participant ainsi à l'éradication précoce du germe lors de l'infection (PEDRA et al. 2008). On a pu de plus montrer que le taux sérique d'IFN-γ augmente durant les 8 à 10 premiers jours de l'infection (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). Ainsi, la production d'IFN-γ contribue au processus inflammatoire et joue un rôle particulièrement important dans le contrôle initial de la bactériémie à *A. phagocytophilum* (AKKOYUNLU & FIKRIG 2000 ; BIRKNER et al. 2008).

D'autre part, nous avons vu que *A. phagocytophilum* était impliqué dans des **dysfonctionnements plaquettaires** (BORJESSON et al. 2005), une thrombopénie étant très souvent rapportée. La cause de cette thrombopénie est discutée. Certains auteurs pensent qu'elle serait notamment due à la consommation excessive de plaquettes ou à une perturbation de l'hématopoïèse sous l'influence de cytokines libérées par les neutrophiles (IL-8, MIP1α, MIP1β)(GREIG & ARMSTRONG 2006). D'autres avancent que le peu de problèmes hémorragiques rencontrés lors d'anaplasmose granulocytaire, ne semble pas en

faveur de cette hypothèse et que la moelle osseuse étant fréquemment réactive, un défaut de production n'est a priori pas en cause non plus (GRANICK et al. 2008). En effet, lorsqu'un examen de la moelle osseuse est effectué, on peut constater une cellularité normale à augmentée avec une augmentation du nombre absolu de mégacaryocytes: cela signe une thrombopoïèse active, qui laisse penser que la thrombopénie pourrait être due à une destruction plaquettaire. Celle-ci semble liée à des mécanismes immunitaires qui induiraient une durée de vie raccourcie des plaquettes (BEXFIELD et al. 2005). Des anticorps antiplaquettes ont été mis en évidence dans le sérum de chiens et d'hommes atteints de la maladie (WONG & THOMAS 1998; KOHN et al. 2008). Cependant, la thrombopénie s'observe aussi lors de la phase aigüe de l'anaplasmose, avant que les anticorps ne soient détectés, ainsi que chez la souris déficiente en lymphocytes B et T, ce qui laisse penser que d'autres mécanismes entrent en jeu (BORJESSON et al. 2001). Une augmentation de l'activité procoagulante du facteur tissulaire monocytaire (TF PCA) au sein des cellules mononuclées a été documentée in vitro (BEHL et al. 2000; GREIG & ARMSTRONG 2006), et pourrait être consécutive à l'action des cytokines inflammatoires produites (WEKSLER 1998). Une autre hypothèse serait que, à l'instar d'autres maladies, des phénomènes de séquestration des plaquettes dans la rate interviendraient, la rate étant souvent réactive lors d'infection à A. phagocytophilum.

L'anémie hémolytique et les polyarthrites observées impliqueraient également une médiation immune (BEXFIELD et al. 2005; TROMBINI 2008).

Enfin, en ce qui concerne le **pouvoir pathogène direct** de la bactérie, une enzyme, la Fer-superoxyde dismutase (sodB) pourrait avoir un rôle important (DUNNING HOTOPP et al. 2006). La connaissance récente du génome complet de la bactérie (DUNNING HOTOPP et al. 2006) permet aujourd'hui de mieux connaitre le fonctionnement d'*Anaplasma phagocytophilum*. On sait par exemple qu'elle ne peut synthétiser que 4 acides aminés : la glycine, la glutamine, le glutamate et l'aspartate (DUNNING HOTOPP et al. 2006).

D. Mise en jeu d'une réponse immunitaire cellulaire et humorale

Les mécanismes immunitaires mis en jeu dans l'élimination d'A. phagocytophilum sont encore mal élucidés. Plusieurs études ont été réalisées récemment, notamment chez la souris, modèle d'infection expérimentale pour l'anaplasmose granulocytaire humaine, qui permettent d'entrevoir quelques éléments.

La **production d'IFN-y**, importante pour le contrôle précoce de la maladie met en jeu l'immunité cellulaire Th1, puisqu'elle est réalisée de façon primaire par les lymphocytes T NK. Elle serait déclenchée par l'action d'autres cytokines, dont l'interleukine 12 (IL-12), l'interleukine 18 (IL-18), l'interleukine 23 (IL-23) et l'IFN de type I produites par les cellules dendritiques et les macrophages (PEDRA et al. 2007; PEDRA, SUTTERWALA, et al. 2007; DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). Cependant, un modèle d'infection chez la souris montre que l'élimination de la bactérie semble dépendre de lymphocytes T CD4+ mais pas de

cytokines majeures de la réponse Th1, comme l'IL-12 ou l'IFN-γ (BIRKNER et al. 2008). Bien que la réponse cellulaire Th1 soit généralement considérée comme le moyen de défense principal pour l'élimination de pathogènes intracellulaires, les résultats d'études expérimentales, toujours chez la souris, suggèrent également un rôle important de la réponse immunitaire humorale Th2 dans l'élimination du germe (SUN et al. 1997), surtout durant la phase extra-cellulaire de l'infection et à l'intérieur des inclusions où les bactéries se répliquent, augmentant dans le même temps l'activité phagocytaire (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). Ainsi, les deux types d'immunité sont nécessaires pour combattre efficacement l'infection. Des souris immunodéficientes en Lymphocytes T (LT) et Lymphocytes B (LB) restent d'ailleurs infectées, alors que des souris uniquement déficientes en LT sont capables d'éliminer la bactérie (BIRKNER et al. 2008). On verra par la suite que cette réponse humorale prend toute son importance dans le diagnostic sérologique de l'anaplasmose granulocytaire.

BILAN

L'infection à *Anaplasma phagocytophilum* implique des réactions immunitaires spécifiques et non spécifiques complexes, qui expliquent en partie les symptômes observés. Cette action sur le système immunitaire favorise également le développement d'infections secondaires, qui peuvent conduire, rarement, à une issue fatale.

IV. Diagnostic de laboratoire

La saison, l'exposition et l'infestation par les tiques, les signes cliniques et hématologiques, l'âge peuvent conduire à une suspicion clinique, mais celle-ci doit être confirmée par un diagnostic expérimental.

A. Méthodes directes

1. Cytologie : recherche de morulae sur frottis sanguin

Anaplasma phagocytophilum peut être mise en évidence par coloration May Grünwald Giemsa sous forme d'inclusions dans le cytoplasme des granulocytes neutrophiles du sang périphérique observables en microscopie optique : ce sont les **morulae**, de couleur pourpre/violet, mesurant 1,5 à 7 μm de diamètre. C'est une méthode de diagnostic intéressante mais **peu sensible**, avec un certain nombre de difficultés : elle est dépendante de l'expérience du manipulateur, il y a peu de cellules infectées (7 à 37 % des neutrophiles contiennent des morulae), et ce sur une période courte (lors d'infection expérimentale chez le chien, les morulae apparaissent dès 4 jours post-inoculation, et persistent jusqu'à 8 jours) (EGENVALL et al. 1998; GREIG & ARMSTRONG 2006 ; CARRADE et al. 2009). De plus, les morulae d'A. phagocytophilum ne peuvent être distinguées de celles d'Ehrlichia spp., telle que E. ewingii. Cependant, la visualisation de morulae dans cette affection est plus fréquente que l'ehrlichiose monocytaire à Ehrlichia canis (POITOUT & CHABANNE 2004) et

reste assez facile en phase aigüe de l'infection. Elle apporte un argument en faveur d'une ehrlichiose granulocytaire. La leucoconcentration (étalement du « buffy coat »), souvent utilisée en pratique, améliore la sensibilité.

2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR ou *Polymerase Chain Reaction* est une technique d'amplification moléculaire *in vitro*, qui permet d'amplifier et de détecter l'ADN d'A. *phagocytophilum* dans le sang périphérique, les leucocytes, la moelle osseuse, la rate, les nœuds lymphatiques (CARRADE et al. 2009; DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). Le prélèvement optimal est le **sang périphérique sur tube EDTA**. Il doit être réalisé le plus tôt possible, avant de mettre en place un traitement spécifique. C'est un outil très **sensible**, ce qui permet une **détection précoce** d'A. *phagocytophilum* (dans une étude d'infection expérimentale chez le chien, la PCR peut être positive 6 à 8 jours avant l'observation de morulae dans le sang et 3 jours après (EGENVALL et al. 1998; EGENVALL, LILLIHÖÖK et al. 2000) et relativement **spécifique** (GREIG & ARMSTRONG 2006; POITOUT & CHABANNE 2004). Certains tests peuvent cependant amplifier l'ADN d'autres espèces de rickettsies en même temps que celui d'A. *phagocytophilum*, et il est alors nécessaire d'effectuer un séquençage pour déterminer si A. *phagocytophilum* est l'espèce infectante (CARRADE et al. 2009). Il existe cependant des tests spécifiques de la bactérie (voir encadré ci-après).

PCR et détection d'A. phagocytophilum

Différentes techniques sont disponibles pour mettre en évidence l'ADN d'A. phagocytophilum en fonction des amorces utilisées. Les cibles de la majorité des sondes utilisées sont le gène de l'ARNr 16S, ou le gène de la protéine majeure de surface Msp2(p44) (CARRADE et al. 2009). Notons que les tests amplifiant l'ARNr 16S peuvent également détecter l'ADN d'autres espèces d'Anaplasma et même d'autres bactéries comme Bartonella henselae (EGENVALL, LILLIHÖÖK et al. 2000 ; CARRADE et al. 2009), alors que les tests se basant sur le gène msp2 de la protéine de membrane externe p44 sont généralement plus spécifiques d'A. phagocytophilum (CARRADE et al. 2009). Il existe également des PCR ayant pour cibles le gène de la protéine de surface Msp4, les gènes grosESL, rrs, epank1, AnkA, ou les gènes de protéines de haut poids moléculaires 100 kDa, 130 kDa et Hsp-70 (MASSUNG & SLATER 2003 ; WALLS et al. 2000; DINIZ & BREITSCHWERDT 2012).

Cette méthode de mieux en mieux maîtrisée est de plus en plus utilisée aujourd'hui, même sur le terrain, malgré son coût important. Elle permet un **diagnostic de certitude** de l'anaplasmose granulocytaire et est assez bien corrélée à l'expression clinique de la maladie (KOHN et al. 2008). Elle permet de différencier *Anaplasma phagocytophilum d'Anaplasma platys*, l'agent de la thrombopénie cyclique canine, à la différence de la sérologie par exemple.

3. Culture

La culture d'A. phagocytophilum est très difficile compte tenu du fait que c'est une bactérie intracellulaire stricte mais possible sur des lignées leucocytaires humaines comme HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells)(GREIG & ARMSTRONG 2006; CARRADE et al. 2009), des cellules CML (chronic myelogenous leukaemia) et sur des cellules embryonnaires de tiques (exemple : tick cell line ISE 6)(BARBET et al. 2003; BAYARD-MC NEELEY et al. 2004; MASSUNG et al. 2007). Cependant, si la culture bactérienne est la méthode présentant le plus de sensibilité pour la détection d'A. phagocytophilum, elle reste très peu utilisée en routine chez le chien et réservée à la recherche.

B. Méthode indirecte : Sérologie

Il s'agit principalement de la technique par **immunofluorescence indirecte** (IFI)(Figure 18), méthode de diagnostic la plus fréquemment employée, même si des techniques par **Western Blot** ou **ELISA** existent (POITOUT & CHABANNE 2004 ; DAVOUST 2005 ; CARRADE et al. 2009).

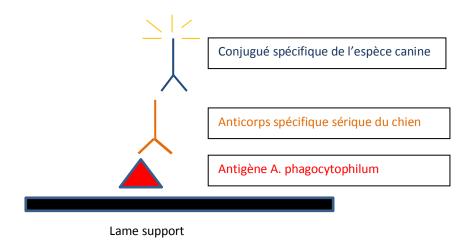


Figure 18 : Principe de l'immunofluorescence indirecte (IFI)

Un test ELISA utilisant un antigène recombinant p44 a été développé pour tester des sérums canins et équins (MAGNARELLI et al. 2001). Il existe également des tests de détection rapide (par Dot Blot ELISA) disponibles pour le praticien, comme le test SNAP test 4Dx® développé par IDEXX, seul test permettant aujourd'hui la détection des anticorps anti-Anaplasma chez le chien, que nous étudierons plus en détail dans la deuxième partie de cette thèse. Expérimentalement, par immunofluorescence indirecte, la séroconversion intervient environ 8 jours après l'exposition initiale et 2 à 5 jours après l'apparition des premières morulae sur le frottis sanguin (GREIG & ARMSTRONG 2006). La réalisation d'une cinétique d'anticorps, avec deux sérologies à 10-15 jours d'intervalle est indispensable (POITOUT & CHABANNE 2004). Elle permet de mettre en évidence une augmentation du taux d'anticorps et de différencier une infection contemporaine d'une infection ancienne où le taux d'anticorps persiste à un niveau stable. En effet, les anticorps persistent au moins 7 à 8 mois après l'infestation (POITOUT et al. 2005 ; GREIG & ARMSTRONG 2006), et jusqu'à deux ans dans certains cas (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012) donc un animal avec une

sérologie positive peut simplement avoir été exposé à l'infection il y a plusieurs mois (faux positifs). De plus, lors de la première recherche sérologique, les individus sont souvent séronégatifs alors qu'ils expriment des symptômes aigus : 40 % des animaux malades chez lesquels on observe des morulae sur le frottis n'ont pas encore de titres d'anticorps importants (faux négatifs)(GREIG & ARMSTRONG 2006). La deuxième sérologie a alors pour but de confirmer l'infection. Il faut veiller à utiliser toujours le même laboratoire pour les différentes analyses.

Ainsi, le résultat sérologique obtenu dépend de la qualité de la réponse immunitaire du chien et de la cinétique d'anticorps.

Enfin, des **réactions sérologiques croisées** sont possibles avec *Ehrlichia spp.*, même si elles sont rares, en particulier avec *E. canis*, *E. ewingii* et *E. chaffeensis* (BREITSCHWERDT et al. 1998; GREIG & ARMSTRONG 2006; CARRADE et al. 2009; POITOUT et al. 2005). On observe un peu plus fréquemment des réactivités croisées entre les différentes espèces d'*Anaplasma* dont *Anaplasma marginale*, en particulier lorsque l'on utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre Msp5, une protéine de surface hautement conservée (STRIK et al. 2007; DREHER et al. 2005). Enfin, on en retrouve souvent entre *A. phagocytophilum* et *A. platys* (CARRADE et al. 2009), ainsi qu'entre les différents biovars d'*A. phagocytophilum* (DUMLER et al. 1995; GREIG & ARMSTRONG 2006). Aucune réactivité sérologique croisée n'est présente entre *A. phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella spp*. ou *Rickettsia rickettsii* (GREIG & ARMSTRONG 2006).

Malgré les limites de cette technique, la sérologie par IFI demeure actuellement la plus utilisée en pratique.

C. Conduite à tenir

Si le vétérinaire suspecte une **infection très récente** (phase aigüe de la maladie), les anticorps peuvent ne pas être présents donc la **PCR** est l'examen de choix pour le diagnostic, plus sensible et plus spécifique que le frottis en phase aigüe, les morulae n'étant pas encore présentes sur le frottis sanguin. Cependant, en pratique, le praticien réalisera au mieux un diagnostic dans les 15 jours post-infection, à l'aide d'un **frottis sanguin** en première intention conjugué à une PCR si possible. L'examen du frottis sanguin peut être effectué en 30 minutes au cabinet. Il pourra également faire une **sérologie** s'il ne trouve pas de morulae intra-granulocytaires ou si la PCR n'est pas disponible (délai d'attente, coût). Celle-ci peut s'avérer plus pertinente si un traitement anti-infectieux est mis en place. Si l'infection semble être **plus ancienne**, il ne sert à rien de réaliser une PCR, on se contentera de la **sérologie** (GREIG & ARMSTRONG 2006; CARRADE et al. 2009; BOURGUET & CHABANNE 2010).

BILAN

Les signes cliniques et les examens de laboratoire permettent d'obtenir des résultats évocateurs de la maladie. Afin de confirmer le diagnostic d'anaplasmose granulocytaire, plusieurs méthodes de diagnostic expérimentales peuvent ensuite être utiles. Chez l'homme différents critères sont employés, qui peuvent aussi être appliqués aux chiens, même si l'isolation par culture de la bactérie n'est que très peu pratiquée en routine :

- Détection de morulae intra-granulocytaires sur frottis sanguin et titres d'anticorps anti- Anaplasma phagocytophilum ≥ 80
- Cinétique d'anticorps avec augmentation (×4) ou diminution (÷4) du taux d'anticorps dans les 4 semaines
- Test PCR > 0
- Isolement de la bactérie par culture sanguine

V. Traitement de la maladie

Le traitement de l'anaplasmose granulocytaire canine consiste en l'administration d'antibiotiques, les plus actifs contre *A. phagocytophilum* étant la **doxycycline**, la rifampicine et les quinolones (lévofloxacine)(GREIG & ARMSTRONG 2006). Des résistances ont été décrites aux pénicillines (amoxicilline), aux macrolides, à la gentamicine, à la clindamycine, ainsi qu'au triméthoprime sulfamide (BRANGER et al. 2004; HOROWITZ et al. 2001; MAURIN et al. 2003).

Les tétracyclines restent la classe d'antibiotiques de choix pour le traitement de l'anaplasmose granulocytaire canine et permettent un rétablissement spectaculaire pour les formes aiguës en 24 à 48 heures, dans la plupart des cas. Elles inhibent la synthèse des protéines au niveau ribosomial (CHOPRA & ROBERTS 2001). Après traitement, le taux plaquettaire se normalise en une à deux semaines (CARON & HERNANDEZ 2011). La molécule employée par consensus est la doxycycline (5 à 10 mg/kg/j par voie orale) une à deux fois par jour pendant 14 jours. La doxycycline possède en outre l'avantage d'être active contre Borrelia burgdorferi, l'agent de la maladie de Lyme, qui est fréquemment cotransmise avec l'anaplasmose granulocytaire. Les autres tétracyclines parfois utilisées sont l'oxytétracycline (22 mg/kg par voie orale toutes les 8 h ou 33 mg/kg deux fois par jour pendant 14 à 21 jours par voie orale) et plus récemment la minocycline (même dose que la doxycycline)(CHABANNE & MARTIN 2005). Par ailleurs, les tétracyclines possédant des effets secondaires indésirables sur les bourgeons dentaires des jeunes animaux, il vaut mieux prescrire chez les chiots de moins de un an un traitement alternatif, à base de chloramphénicol (Tableau IV), de thiamphénicol (BRANGER et al. 2004; GREIG & ARMSTRONG 2006), de rifampicine (active et utile chez ces catégories d'animaux, mais son usage est aujourd'hui plus restreint, étant donné le risque de création de résistances

(MARTIN 2004)) ou de quinolones (lévofloxacine par exemple). Ce traitement alternatif peut également être utilisé chez les femelles gravides ou les individus allergiques aux tétracyclines.

Molécule	Dose (mg/kg)	Voie d'administration	Intervalle d'administration (heures)	Durée du traitement (jours)
Tetracycline	22	PO	8	14-21
Doxycycline	5-10	PO (IV)	12-24	10-21
Minocycline	10	PO (IV)	12	10
Chloramphénicol	25-50	PO (IV, SC)	8	14-21

IV : voie intraveineuse PO : voie orale SC : voie sous-cutanée

Tableau IV : Traitement antibiotique de l'anaplasmose granulocytaire canine (d'après DINIZ & BREITSCHWERDT 2012)

Lorsque l'amélioration n'intervient pas en 24-48 heures, il y a une forte probabilité de co-infections ou d'autres maladies associées (GREIG & ARMSTRONG 2006). Il faut alors rechercher ces co-infections et compléter le traitement. D'après une étude réalisée en 2007 auprès des cliniques vétérinaires, il semblerait qu'en France, certains vétérinaires utilisent aussi de l'**imidocarbe** seul (à des doses égales à supérieures à celles préconisées pour la piroplasmose, généralement 5 mg/kg par voie IM ou SC, à raison de deux injections à 15 jours d'intervalle) ou en association avec les tétracyclines (DROUFFE 2007). Ce traitement semble en effet conduire à une amélioration clinique significative (CHABANNE & MARTIN 2005). En cas de suspicion d'une maladie à médiation immune ne rétrocédant pas au traitement étiologique, une corticothérapie de quelques jours peut-être mise en place (1mg/kg matin et soir). Un dosage trop important sera à éviter, il a en effet été rapporté qu'une réactivation de l'infection 6 mois après la négativation du frottis sanguin et de la PCR était possible (CARON & HERNANDEZ 2011).

VI. Prophylaxie

L'élaboration d'un vaccin reste très difficile car *A. phagocytophilum* possède des protéines de surface changeantes du fait de régions hypervariables dans son génome (cf. Chap. 2. III. B.). Il n'existe donc aucun vaccin à ce jour. Cependant, la découverte récente de protéines de surface stables permet d'en espérer dans l'avenir la création, comme cela a pu être fait pour *A. marginale* chez les bovins (DE ANDRADE et al. 2004).

La prophylaxie repose principalement sur la **prévention et la lutte contre les tiques** *Ixodes ricinus*, (cf. Chap. 1. II. G.) grâce notamment à l'utilisation de molécules antiparasitaires, les plus utilisées sur le terrain étant la deltaméthrine en collier (Scalibor®) suivie par le fipronil (Frontline®)(DROUFFE 2007). On peut également utiliser de l'imidaclopride associée à de la perméthrine (Advantix®)(BLAGBURN et al. 2004). De plus, il convient de faire attention au facteur de risque principal, à savoir la morsure de tique, surtout dans les périodes et les biotopes où la tique est active.

La chimioprévention individuelle est possible en cas de voyage d'un animal provenant d'une zone indemne dans une zone endémique (POITOUT & CHABANNE 2004; CHABANNE & MARTIN 2005). La dose de doxycycline préconisée était de 3 mg/kg une fois par jour par voie orale (CHABANNE & MARTIN 2005). Cependant, des études récentes sur des souris remettent en cause l'efficacité de l'administration orale de doxycycline mais montrent qu'une administration unique à libération prolongée par voie sous-cutanée empêche la transmission d'A. phagocytophilum mais aussi de Borrelia burgdorferi par morsure de tiques (ZEIDNER et al. 2008). Enfin, l'éradication de la maladie en France semble difficilement envisageable, étant donné que son réservoir est principalement constitué de bovins et d'animaux sauvages.

VII. Potentiel zoonotique

A. <u>Problématique</u>

De nombreuses études expérimentales ont exploré les possibilités de **transmission interspécifique** d'*A. phagocytophilum*. Nous en citerons ici quelques-unes qui permettent d'introduire l'anaplasmose granulocytaire canine en tant que zoonose.

Dès 1975, des études expérimentales sont parvenues à montrer la possibilité de transmission d'A. phagocytophilum entre des équidés et des chats, des chiens et des primates non humains (LEWIS et al. 1975). En 2002, une souche de la bactérie isolée chez l'homme a été transmise expérimentalement par l'intermédiaire de tiques infectées à des chevaux, qui ont alors développé des signes cliniques semblables à ceux de l'anaplasmose granulocytaire équine (PUSTERLA et al. 2002). Auparavant, des infections à A. phagocytophilum biovar HGE avaient déjà été décrites chez le chien et le cheval (WALKER & DUMLER 1996; VON LOEWENICH et al. 2003). L'agent pathogène isolé sur le chien permet également de reproduire l'infection chez le cheval (WALKER & DUMLER 1996). L'ensemble de ces études pose ainsi la question du rôle que peuvent jouer le chien et le cheval dans l'anaplasmose granulocytaire humaine en tant que réservoir. Rien ne démontre à ce jour que l'homme ne puisse pas se contaminer à partir de ces deux espèces par l'intermédiaire de la tique Ixodes ricinus. C'est pourquoi, l'anaplasmose granulocytaire humaine est aujourd'hui considérée comme une zoonose où les équidés et le chien jouent le rôle d'espèces sentinelles. Ils peuvent contribuer à l'infection humaine en portant des tiques infectées au contact de l'homme (GREIG et al. 1996).

B. Historique

L'ehrlichiose granulocytaire humaine est une maladie émergente (WALKER & DUMLER 1996; BAKKEN & DUMLER 2000; ACHA & SZYFRES 2005; AMIEL et al. 2004).

Elle est décrite pour la première fois aux Etats Unis en 1990 par Bakken sur un patient du Wisconsin mort à la suite d'un syndrome grippal fébrile, une semaine après une morsure de tique (BAKKEN 1998). Par la suite, entre 1990 et 1993, on a pu observer chez plusieurs patients atteints d'une maladie identique dans le Minnesota et le Wisconsin la présence de

vacuoles intragranulocytaires, ressemblant à des morulae, et contenant des bactéries assimilables à des *Ehrlichia*, mais non encore identifiées (CHEN et al. 1994 ; DUMLER et al. 2005). A l'époque, on ne connaissait aux Etats-Unis qu'*Ehrlichia chaffeensis*, l'agent de l'ehrlichiose monocytaire humaine. En 1994, Chen *et al.* réalisent de multiples amplifications géniques et séquençages de l'ADN de la bactérie mise en évidence au sein des granulocytes du patient de Bakken et identifient cette nouvelle bactérie, distincte d'*Ehrlichia chaffeensis* (CHEN et al. 1994; AMIEL et al. 2004; DUMLER et al. 2005). Elle est alors nommée « agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine », bien que les études morphologiques et sérologiques montrent une étroite relation, voire une similitude avec *Ehrlichia equi* et *Ehrlichia phagocytophila*. En 2001, les travaux de Dumler *et al.* regroupent d'ailleurs ces trois agents sous une seule et même espèce, *Anaplasma phagocytophilum* et l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine est appelé biovar HGE (DUMLER et al. 2001). L'EGH est renommée anaplasmose granulocytaire humaine.

Aujourd'hui, plus de 700 cas humains sont diagnostiqués chaque année aux Etats-Unis (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012). On en a rapporté dans 13 états au moins, dont le Connecticut, le Minnesota, le New Jersey, l'état de New-York, le Wisconsin, la Californie. En Europe, elle est confirmée pour la première fois en Slovénie en 1997 (PETROVEC et al. 1997), et c'est dans ce pays que le premier cas sur un enfant y est également décrit en 2001 (ARNEZ et al. 2001). On la retrouve aussi en Suisse, en Norvège, en Suède, en Bulgarie, en Allemagne, en Italie (AMIEL et al. 2004), en Espagne (OTEO et al. 2000), en France (REMY et al. 2003), en Belgique (HEYMAN et al. 2003), en Croatie et en Pologne (BLANCO & OTEO 2002). Des cas asiatiques sont également décrits (Corée, Russie, Chine)(DUMLER et al. 2007). La distribution géographique de la maladie correspond en fait aux zones d'activité des tiques vectrices et en Europe aux régions où la maladie de Lyme est endémique, les deux infections étant parfois co-transmises (BAKKEN & DUMLER 2000).

C. <u>Importance</u>

La **prévalence** d'A. phagocytophilum chez Ixodes ricinus en Europe varie de 0,4 à 66,7 % (BLANCO & OTEO 2002). Les co-infections des tiques avec Borrelia burgdorferi, agent de la maladie de Lyme, varient entre 0.5 et 24% selon les études (SAUGER 2005). Des études de séroprévalence réalisées en Europe sur des sujets sains mordus ou non par des tiques ou chez des patients atteints de la maladie de Lyme révèlent la présence dans 4 à 24 % des cas d'anticorps anti-EGH (BAKKEN & DUMLER 2000 ; AMIEL et al. 2004).

D. <u>Réservoirs</u>

Les réservoirs de l'anaplasmose granulocytaire humaine sont les mêmes que ceux de l'anaplasmose granulocytaire canine, que nous avons décrits dans le paragraphe *Mode de transmission et réservoirs* (cf. Part. 1, Chap. 2, I., B., 3.).

E. Symptômes chez l'Homme

La traduction clinique de l'EGH est indifférentiable de celle causée par Ehrlichia chaffeensis (anaplasmose monocytaire humaine) et Ehrlichia ewingii (autre agent d'anaplasmose granulocytaire humaine)(GREIG & ARMSTRONG 2006). On observe un syndrome grippal non spécifique avec fièvre importante (> 39°C), maux de tête, myalgies, frissons, malaises. Plus rarement, on peut rapporter des arthralgies, des signes digestifs (anorexie, diarrhées et vomissements), de la toux, des confusions mentales et très rarement des éruptions cutanées sont décrites (BAKKEN & DUMLER 2000; AMIEL et al. 2004; DUMLER et al. 2005; GREIG & ARMSTRONG 2006; CARRADE et al. 2009). Le plus souvent la maladie est bégnine et autolimitée (CARRADE et al. 2009). Des co-infections avec Borrelia burgdorferi conduisent à un tableau clinique plus sévère (GREIG & ARMSTRONG 2006). Dans quelques cas, des symptômes persistants pendant un à trois ans après guérison clinique sont rapportés (GREIG & ARMSTRONG 2006). En Europe, l'infection semble moins grave qu'en Amérique du Nord (BLANCO & OTEO 2002). La mort est très peu fréquente et survient dans moins de 1% des cas, suite à des complications dues à des surinfections (choc septique ou toxique, insuffisance respiratoire, infections virales ou fongiques opportunistes, rhabdomyolyse, insuffisance rénale aigüe, hémorragies, maladie neurologique)(BAKKEN & DUMLER 2008; GREIG & ARMSTRONG 2006; CARRADE et al. 2009). Comme chez le chien, une thrombopénie, une leucopénie et une augmentation modérée des Alanine Aminotransférase (AIAT) et Aspartate Amino-transférase (ASAT) sont présentes. Les morulae sont observées dans 80 % des cas, et les neutrophiles infectés peu nombreux (GREIG & ARMSTRONG 2006). Il semble qu'en Europe le nombre de morulae observé soit moins important qu'aux Etats-Unis (BLANCO & OTEO 2002).

F. Facteurs favorisants

Les hommes (57 à 61 %) semblent plus affectés que les femmes (DUMLER et al. 2007). L'infection est plus sévère chez des individus jeunes, âgés, immunodéprimés ou sous traitement immunosuppresseur. Aux Etats-Unis, où le nombre de cas est bien plus important, les individus les plus touchés sont les hommes âgés avec une moyenne d'âge de 68 ans (WALKER & DUMLER 1996). La majorité des cas humains ont la cinquantaine ou la soixantaine (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012).

G. Rôle du chien dans l'épidémiosurveillance

Le chien pourrait constituer une sentinelle idéale pour l'anaplasmose granulocytaire humaine (CARRADE et al. 2009). En effet, nous avons vu que c'était une **espèce sensible** à *A. phagocytophilum*, il est donc possible de repérer les cas cliniques de la maladie, même si de nombreux sujets restent asymptomatiques. De plus, le chien est un **excellent hôte pour les tiques** du genre *Ixodes*. Il présente des réponses immunitaires de longue durée, **les anticorps pouvant persister au moins 7 à 8 mois après l'infestation** (POITOUT et al. 2005 ; GREIG & ARMSTRONG 2006) et marquées suite à l'infection par le germe.

A retenir : Anaplasma phagocytophilum est une bactérie Gram — intracellulaire stricte infectant préférentiellement les granulocytes neutrophiles. Elle est transmise par la morsure de tiques dures du genre Ixodes (Ixodes ricinus en Europe) et est responsable de l'anaplasmose granulocytaire, une maladie pouvant toucher de nombreux mammifères, dont le chien, le chat, le cheval, les ruminants et l'homme. Les réservoirs de la bactérie sont principalement constitués des micromammifères (mulots, campagnols...) et des ruminants sauvages. L'anaplasmose granulocytaire canine a été décrite pour la première fois en 1996 dans le Minnesota et le Wisconsin (GREIG et al. 1996). Elle se manifeste par des anomalies hématologiques, les plus typiques étant une thrombopénie, une leucopénie et une anémie. Les anomalies biochimiques observées comprennent une augmentation de l'activité enzymatique des PAI et des AIAT, une hypoalbuminémie et une hyperbilirubinémie (bilirubine totale). Le diagnostic est d'abord cytologique avec la mise en évidence de morulae intragranulocytaires sur un frottis sanguin coloré au MGG. La sérologie (IFI, ELISA, Western Blot) peut également être utile, à condition qu'une cinétique d'anticorps à 15 jours d'intervalle soit réalisée afin d'observer une séroconversion et confirmer le diagnostic. La maladie clinique se déclare 1 à 2 semaines après l'inoculation du germe, mais la plupart des infections induisent peu ou pas de symptômes cliniques, qui restent non spécifiques. Du fait du caractère aiguë de l'infection, il faut savoir qu'environ 40 % des chiens malades ne produisent pas un taux d'anticorps suffisant détectable à la sérologie lorsqu'ils sont présentés. A contrario, la PCR permet un diagnostic précoce de l'infection et apparait comme la méthode de diagnostic la plus sensible et la plus spécifique pour obtenir un diagnostic de certitude de l'anaplasmose granulocytaire chez l'animal et l'homme. En tant qu'agent pathogène à transmission vectorielle, Anaplasma phagocytophilum, associée ou non à d'autres agents transmis par les tiques peut induire des manifestations cliniques diverses chez le chien, ce qui augmente la difficulté du diagnostic et du traitement de la maladie. Le pronostic est très favorable, avec une nette amélioration de l'état général en deux jours. Le traitement consiste en l'administration de doxycycline (10 mg/kg/j sur une dizaine de jours en général). Compte tenu du nombre croissant de chiens exposés à ce germe, des études de l'infection naturelle doivent encore être menées afin de mieux cerner le spectre exact de la maladie. C'est une maladie qui revêt en outre une importance en santé publique, puisqu'elle est considérée comme une zoonose : le chien pouvant jouer un rôle en tant que sentinelle pour l'infection humaine.

Découverte plus récemment, un autre type d'anaplasmose peut affecter le chien, parfois de façon simultanée à l'anaplasmose granulocytaire canine à Anaplasma phagocytophilum : il s'agit de l'anaplasmose plaquettaire canine ou thrombopénie infectieuse cyclique causée par un agent pathogène parasitant les thrombocytes du chien, Anaplasma platys, que nous allons développer dans le chapitre suivant.

Chapitre 3. **A**naplasmose plaquettaire canine ou thrombopénie infectieuse cyclique à **A**naplasma platys

Découverte en 1978 en Floride sur des chiens atteints de thrombopénie (HARVEY et al. 1978), la bactérie responsable de l'anaplasmose plaquettaire canine possédait une structure proche de celle d'*Ehrlichia canis*. Elle fut donc classée dans l'ordre des Rickettsiales sous le nom d' «Ehrlichia platys» dans un premier temps (CHABANNE et al. 2011). En 2001, Dumler *et al.*, se basant sur l'analyse des séquences de l'ARNr 16S, transfèrent « E. platys » dans la famille des *Anaplasmataceae*, sous le genre *Anaplasma* et la renomme *Anaplasma platys* (DUMLER et al. 2001). Cette classification est confirmée par l'analyse des séquences nucléotidiques de la protéine de choc thermique *groESL*, de l'opéron de choc thermique *groESL* et du gène de la citrate synthétase *gltA* (HARVEY 2012).

Depuis, l'infection a été décrite un peu partout dans le monde aux Etats-Unis, en Amérique du Sud, en Asie, en Europe et en Afrique (cf. Répartition géographique et saisonnière). En France, des organismes intra-plaquettaires similaires à ceux identifiés dans d'autres pays auparavant ont été mis en évidence au début des années 80 (BEAUFILS et al. 2002). La similitude des symptômes a permis d'associer ces bactéries à la thrombopénie infectieuse cyclique sans que l'appartenance à l'espèce *A. platys* n'ait été démontrée. En 2002, Beaufils *et al.* identifient par PCR pour la première fois en France, une souche d'*A. platys* génétiquement très proches des souches asiatiques et américaines (BEAUFILS et al. 2002).

I. Bactériologie et épidémiologie

A. Bactériologie

Comme toutes les bactéries du genre *Anaplasma*, *A. platys* est une bactérie Gram négative, non mobile, intracellulaire stricte, à métabolisme aérobie. Elle infecte de façon spécifique les **thrombocytes du chien**. En microscopie optique, sur un frottis sanguin coloré au MGG ou au bleu de méthylène nouveau, les micro-organismes apparaissent sous forme d'inclusions bleues au sein des plaquettes (Figure 19). En microscopie électronique, on peut mieux les discerner : d'une taille de 350 à 1250 nm de diamètre, ils peuvent être ronds, ovales ou en forme de haricot et sont entourés d'une double membrane trilamellaire (EUZEBY 2001b). Les plaquettes infectées peuvent contenir de une à trois vacuoles délimitées par une simple membrane, hébergeant chacune 1 à 15 microorganismes.

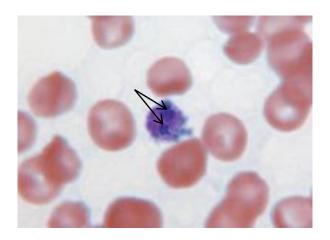


Figure 19 : Frottis sanguin d'un chien infecté par *Anaplasma platys* : deux morulae de couleur bleue foncée sont visibles au sein d'un thrombocyte infecté (flèches). On peut également observer les granules normales rosées et plus petites dans le cytoplasme de la plaquette infectée (Wright's-Giemsa; 100X)(source : ALLEMAN & WAMSLEY 2008)

Il semble que les bactéries envahissent les plaquettes par une première étape d'adhésion à leur surface, suivie d'une endocytose. La membrane des vacuoles pourrait provenir de la membrane externe thrombocytaire. Par la suite, les bactéries se multiplient par **scission binaire** à l'intérieur de la vacuole, de la même façon que pour *Anaplasma phagocytophilum*, aboutissant à la formation d'une morula. Aujourd'hui, aucun germe n'a pu être mis en évidence dans les mégacaryocytes de la moelle osseuse, que ce soit avant ou pendant la phase de bactériémie (BEAUFILS 2004; HARVEY 2012).

B. <u>Epidémiologie</u>

1. Répartition géographique et saisonnière

La répartition de la maladie suit celle de son vecteur supposé, *Rhipicephalus sanguineus*, encore appelée « tique brune du chien ». On la retrouve un peu partout dans le monde : aux USA (HARVEY et al. 1978, BEAUFILS 2004), en Amérique du Sud (Chili (ABARCA et al. 2007)), en Afrique (République démocratique du Congo (SANOGO et al. 2003)), en Asie (Chine (HUA et al. 2000), Taiwan (CHANG et al. 1996), Japon (INOKUMA et al. 2000; MOTOI et al. 2001), Thaïlande² (SUKSAWAT et al. 2001)), en Australie (IRWIN 2001; BROWN et al. 2001), en Nouvelle Calédonie, aux Caraïbes (HARVEY 2012), au Venezuela (ARRAGA-ALVARADO et al. 2003), en Israël (HARRUS et al. 1997), en Europe (Espagne, Portugal (CARDOSO et al. 2010),

² En Thaïlande, les chiens chez lesquels on a détecté de l'ADN d'*Anaplasma platys* étaient d'abord suspectés d'héberger une infection à *Anaplasma phagocytophilum*.

Apparemment, Anaplasma platys serait l'espèce d'Anaplasma possédant la plus forte prévalence au sein de la population canine en Amérique du Sud, en Afrique, en Asie et en Océanie (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012).

Allemagne, Italie, Grèce (EUZEBY 2001b; HARVEY 2012), France³ (BEAUFILS et al. 2002) et récemment chez un chien importé de Croatie (DYACHENKO et al. 2012)).

Les chiens atteints de thrombopénie cyclique sont généralement présentés pendant les mois chauds, de juin à septembre en Europe (BEAUFILS 2004). En France, les cas semblent plus nombreux au **printemps et début de l'été** (avril à juillet) et au début de l'automne (septembre/octobre)(DROUFFE 2007; BEAUFILS et al. 2006)(Figure 20).

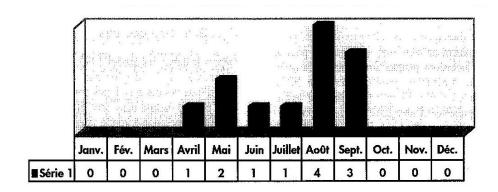


Figure 20 : Répartition annuelle des cas d'infection canine à *Anaplasma platys* selon une étude rétrospective réalisée sur douze cas en France en 2006 (source : BEAUFILS et al. 2006)

2. Vecteurs et mode de transmission

a) Mode de transmission et réservoirs

Il s'agit à priori d'une maladie à **transmission vectorielle** (SIMPSON et al. 1991): les répartitions géographique et saisonnière, la fréquence des co-infections avec *E. canis*, la fréquence des infestations des chiens hébergeant le germe par *Rhipicephalus sanguineus*, sont en faveur d'une contamination du chien par **morsure des tiques** *R. sanguineus* (BEAUFILS 2004). De plus, des analyses PCR ont permis de détecter la bactérie chez des tiques de cette espèce à Okinawa au Japon (INOKUMA et al. 2000), au Congo en Afrique (SANOGO et al. 2003), ainsi qu'en Italie (SPARAGANO et al. 2003) et plus récemment en Tunisie (SARIH et al. 2005), ce qui conforte cette hypothèse. La séquence du gène de l'ARNr 16S des bactéries retrouvées chez *R. sanguineus* était identique à celle des bactéries isolées sur les chiens infestés par ces tiques (HARVEY 2012). Cependant, les essais expérimentaux de transmission de la bactérie par cette tique n'ont pas été concluants (SIMPSON et al. 1991). *A. platys* a également pu être détectée chez des **tiques d'autres espèces**, telles que *Dermacentor auratus* recueillies sur des chiens en Thaïlande (PAROLA et al. 2003), *Haemaphysalis longicornis* (larves, nymphes et adultes) et *Ixodes persulcatus* sur des petits

_

³ Sur le territoire français, on retrouverait l'infection sur le pourtour méditerranéen notamment mais pas uniquement. Des cas auraient aussi été diagnostiqués dans l'Orne, en Haute-Saône, ou dans le Bas-Rhin. Cependant, il est fort probable qu'il s'agisse de cas importés (DROUFFE 2007)..

mammifères sauvages en captivité et au sein de l'environnement en Corée (HARVEY 2012). Au Japon, de l'ADN d'A. platys a de même été retrouvé par PCR chez *Ixodes ovatus* et *Haemophysalis flava* (INOKUMA et al. 2003). Enfin, d'autres parasites semblent pouvoir héberger la bactérie : de l'ADN de la bactérie a en effet été détecté chez le pou du chien *Heterodoxus spiniger* en Australie (HARVEY 2012).

Par ailleurs, des études expérimentales montrent la transmission possible du germe de d'un chien à l'autre par **transfusion sanguine** (BEAUFILS 2004).

Enfin, très peu d'études sont disponibles concernant les **réservoirs** éventuels *d'A. platys*. Les **petits rongeurs** pourraient jouer un rôle : de l'ADN d'A. platys a en effet été isolé chez des campagnols du genre Apodemus agrarius en Corée (CHAE et al. 2003).

b) Particularités du genre Rhipicephalus sanguineus

Taxonomie et morphologie



Figure 21 : Mâle (à droite) et femelle (à gauche) de *Rhipicephalus sanguineus* (source : http://www.co.monmouth.nj.us/page.aspx?ld=2874)

Rhipicephalus sanguineus, aussi appelée « tique brune du chien » ou « tique des chenils », appartient au genre Rhipicephalus et à la famille des Amblyommidae (metastriata = sillon anal postérieur à l'anus). C'est une tique brévirostre et à capitulum hexagonal. Les tiques adultes sont brunâtres et mesurent environ 2 à 3 mm non gorgées, la femelle gorgée peut atteindre 11 à 12 mm (BOURDEAU 1993). Contrairement à *I. ricinus*, des organes de la vision sont présents.

Tropisme et habitat

R. sanguineus est une espèce **monotrope**: la tique est inféodée au chien pour les trois stades de développement (larve, nymphe et adulte), que ce soit en zone urbaine ou rurale, même si les stases larves et nymphes peuvent également infester des petits mammifères domestiques et sauvages (CHABANNE et al. 2011), tels que des chats, des rats ou des oiseaux. Le taux d'infestation du chien dépend de facteurs géographiques et saisonniers (voir paragraphes suivants), de facteurs de population (densité de chiens, proportion de chiens traités versus non traités) et de facteurs individuels (âge, race, mode de vie : campagne, ville, présence ou non d'un jardin).

La fixation du parasite sur l'homme est également possible et serait plus fréquente que ce que l'on pense actuellement (DANTAS-TORRES 2008). Elle survient surtout dans des zones endémiques où les chiens et l'environnement sont très infestés, même s'il se pourrait que l'on surestime cette infestation : il peut parfois s'agir de tiques du genre *Rhipicephalus* d'une espèce proche mais différente de *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES 2010). Le parasitisme de l'homme reste assez fréquent en Europe, surtout en période estivale (PAROLA et al. 2008).

C'est de plus une tique **endophile**: toutes les stases vivent dans l'environnement immédiat de l'hôte principal qu'est le chien, dans des biotopes fermés comme les chenils, les niches, les refuges etc. Enfin, c'est une espèce **xérophile**, qui apprécie des températures élevées (idéal entre 20°C et 35°C), et une humidité relativement faible (50% minimum) (BOURDEAU 1993; CHABANNE et al. 2011). La température des habitations étant en moyenne de 20°C, les tiques s'y reproduisent facilement et prolifèrent dans les locaux.

Sur le chien, les brévirostres ont pour sites préférentiels le pavillon auriculaire, les marges de l'anus, la queue. Le site de fixation dépend aussi du stade de développement. Les larves et les nymphes sont souvent retrouvées chez le chien au niveau de l'encolure et au niveau des espaces inter-digités alors que les adultes sont fréquemment localisés aux oreilles, à l'encolure et au niveau de la région axillaire (Figure 22).

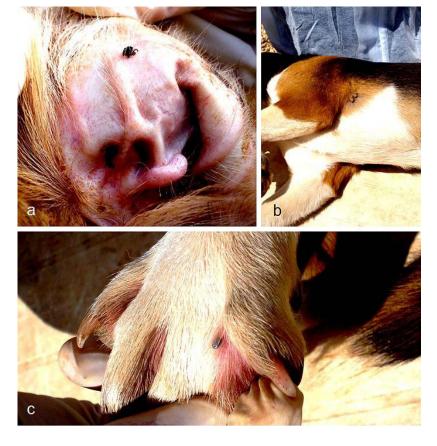


Figure 22 : Principaux sites de fixation de *R. sanguineus* sur le chien. a : Trois adultes fixés sur l'oreille d'un chien b : Deux femelles fixées au niveau de la région axillaire c : Une nymphe gorgée au niveau de l'espace inter-digité (source : DANTAS-TORRES 2010).

Particularités biologiques

Le cycle de développement est un cycle triphasique comme nous l'avons déjà décrit, monotropique. La durée de la période de nutrition est variable selon la stase (de 3 à 8 jours pour la larve à plusieurs semaines pour la tique adulte femelle) et l'hôte (DANTAS-TORRES 2010). Les tiques mâles peuvent prendre de nombreux repas de sang et une tique mâle attachée sur un chien est capable de se détacher et d'aller se nourrir sur un autre chien proche, ce qui aboutit à raccourcir le temps nécessaire à la transmission d'agents pathogènes (LITTLE et al. 2007). De plus, ces tiques mâles adultes peuvent rester longtemps fixées sur leur hôte et il a pu être observé que leur présence sur l'hôte peut induire une augmentation des capacités de nutrition des stases immatures, en particulier des nymphes (RECHAV & NUTTALL 2000). Ceci laisse supposer que les tiques mâles n'ont pas uniquement un rôle dans la reproduction mais d'autres capacités et influences dans la biologie de cette espèce.

Par ailleurs, la maturité sexuelle chez cette espèce n'est atteinte que sur l'hôte et l'accouplement a lieu uniquement sur celui-ci (DANTAS-TORRES 2010). La femelle ne finit de se gorger que lorsqu'elle s'est accouplée. L'ingestion de sang stimule la spermatogénèse chez le mâle et l'ovogénèse chez la femelle. La ponte est précédée d'une période de

préponte qui peut durer de trois jours à quelques semaines. Elle est classiquement continue, avec une production moyenne de 1 500 à 4 000 œufs (DANTAS-TORRES 2010), qui seront déposés dans des endroits cachés (fissures et crevasses des murs, entre des rochers, dans le sol), afin de les protéger des prédateurs (araignées, oiseaux et guêpes (DANTAS-TORRES 2010)). L'incubation des œufs dure de 6 jours à plusieurs semaines (DANTAS-TORRES 2008).

Comme pour *I. ricinus*, la durée des différentes mues est fonction de la stase (nymphe (une à plusieurs semaines) > larve (quelques semaines) > adulte (une quinzaine de jours)) et des conditions climatiques. A des températures inférieures à 10°C, les stases immatures entrent en diapause. La présence de nymphes nouvellement muées agirait comme un stimulus mécanique pour la mue d'autres nymphes (DANTAS-TORRES 2010). Les adultes à jeun sont capables de survivre très longtemps, jusqu'à plus d'un an (BOURDEAU 1993).

La durée totale du cycle se situe en moyenne autour de **4 mois et demi** (BOURDEAU 1993).

La **recherche de l'hôte** est active surtout, même si la tique peut également adopter une stratégie passive d'embuscade (DANTAS-TORRES 2010).

Enfin, Rhipicephalus sanguineus possède une importance médicale dans la santé vétérinaire comme dans la santé publique, étant vecteur de nombreuses maladies/agents, certains responsables de zoonoses : Coxiella burnetii (agent de la fièvre Q), Ehrlichia canis (agent de l'ehrlichiose monocytaire canine), Rickettsia conorii (agent de la fièvre boutonneuse méditerranéenne), Rickettsia rickesttsii (agent de la Rocky Moutain Spotted Fever)(Tableau V).

Alphabetical list of pathogens that are or may be transmitted by R. sanguineus ticks

Pathogen	Associated disease	Reference
Anaplasma marginale ^b	Bovine anaplasmosis	Parker and Wilson (1979)
Anaplasma platys ^a (formerly Ehrlichia platys)	Canine cyclic thrombocytopenia	Simpson et al. (1991)
Babesia caballii ^b	Equine babesiosis	Enigk (1943)
Babesia canis	Canine babesiosis	Regendanz and Muniz (1936)
Babesia gibsoni	Canine babesiosis	Sen (1933)
Cercopithifilaria grassi (formerly Dipetalonema grassi)	Canine filariosis	Bain et al. (1982)
Coxiella burnetii	Q fever	Mantovani and Benazzi (1953)
Dipetalonema dracunculoides	Canine filariosis	Bain (1972); Olmeda-García et al. (1993)
Ehrlichia canis	Canine monocytic ehrlichiosis	Groves et al. (1975)
Hepatozoon canis	Canine hepatozoonosis	Nordgren and Craig (1984)
Leishmania infantuma (syn. Leishmania chagasi)	Canine visceral leishmaniasis	Blanc and Caminopetros (1930)
Mycoplasma haemocanis (formerly Haemobartonella canis)	Canine haemobartonellosis	Seneviratna et al. (1973)
Rangelia vitalli ^a	Nambiuvu or peste de sangue	Loretti and Barros (2005)
Rickettsia conorii	Mediterranean spotted fever	Brumpt (1932)
Rickettsia rickettsii	Rocky Mountain spotted fever	Parker et al. (1933)
Theileria equi ^b (formely Babesia equi)	Theileriosis	Enigk (1943)

^a Despite the evidence indicating that *R. sanguineus* can be a vector of these pathogens, further research is needed to prove it.

Tableau V : Agents pathogènes transmis par *Rhipicephalus sanguineus* (source : DANTAS-TORRES 2008)

^b R. sanguineus ticks seldom bite hosts other than dogs and thus its role in the transmission of these pathogens in nature is probably minor.

Distribution géographique

La distribution géographique mondiale de *R. sanguineus* est sans doute la plus large parmi les espèces de tiques. Elle se retrouve en effet sur tous les continents et est particulièrement fréquente sur la ceinture intertropicale (CHABANNE et al. 2011) : on la retrouve de la **latitude 50° nord à 35° sud** : Afrique intertropicale, Bassin méditerranéen, Etats-Unis (Sud-ouest), Amérique centrale et tropicale, Asie tropicale et Australie (BOURDEAU 1993). En Europe, elle est donc fréquente sur le pourtour méditerranéen (étés chauds et secs et hivers tempérés). Cependant, le déplacement des animaux eux-mêmes contribuerait à son extension et aujourd'hui, on peut la retrouver partout en France (Figure 23). On peut également la rencontrer en Belgique, aux Pays-Bas et en Allemagne (BEUGNET & MARIE 2009).

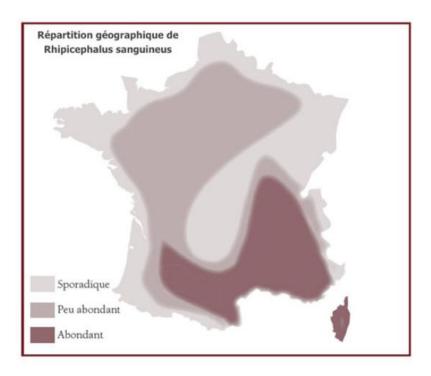


Figure 23 : Répartition géographique de *Rhipicephalus sanguineus* en France (source : http://www.esccap.fr/)

Activité saisonnière

Dans les régions tropicales et subtropicales, la tique est présente toute l'année, alors que dans nos régions tempérées, on la retrouve plutôt de la fin du printemps jusqu'au début de l'automne. Cependant, *R. sanguineus* peut survivre l'hiver et même infester des chiens dans certaines régions au climat tempéré (DANTAS-TORRES 2010).

Effet du réchauffement climatique: nous avons vu que la biologie des tiques et leur écologie dépendaient fortement des conditions climatiques (température et humidité). On est amené à penser que le réchauffement climatique peut modifier le développement des tiques, a fortiori pour des espèces adaptées à vivre dans des environnements humides. En ce qui concerne *Rhipicephalus sanguineus*, l'effet serait moins marqué, puisque cette espèce nécessite un habitat peu riche en humidité et résiste bien à la dessiccation. Cependant, une augmentation globale des températures peut conduire au développement de tiques dans des milieux qui étaient jusque-là indemnes. C'est ainsi que l'on a pu retrouver des tiques *R. sanguineus* dans des régions tempérées d'Europe du Nord où elles étaient précédemment absentes (GRAY et al. 2009). De plus, un réchauffement climatique pourrait avoir des conséquences en santé publique : en effet, une étude a pu montrer que des tiques exposées à des températures élevées seraient plus enclin à mordre les humains (PAROLA et al. 2008).

3. Population infectée et infections concomitantes

Anaplasma platys est considéré comme étant un parasite **spécifique du chien**. Cependant, on a pu observer des morulae intra-thrombocytaires chez des Impala en Afrique du Sud (DU PLESSIS et al. 1997), ainsi qu'une séquence génétique phylogénétiquement proche de la bactérie chez un mouton (BEAUFILS 2004). De même en Corée, de l'ADN d'A. platys a été mis en évidence chez des rongeurs capturés dans des bases américaines (CHAE et al. 2003). Au Venezuela, un organisme morphologiquement proche a été observé dans les plaquettes de plusieurs patients humains (BEAUFILS 2004).

Par ailleurs, concernant les **caractéristiques épidémiologiques individuelles** des chiens atteints, il semble que les **mâles** soient plus souvent infectés (HARRUS et al. 1997), mais le peu de cas rapportés ne permet pas de conclure à une quelconque prédisposition sexuelle. L'**âge** du chien ne semble pas avoir d'influence, quant à l'expression clinique de la maladie (HARVEY 2012).

Enfin, on constate une **co-infection** très fréquente des animaux atteints avec *Ehrlichia canis* (BEAUFILS 2004), qui est transmise par *Rhipicephalus sanguineus*, très fortement suspectée, comme nous l'avons vu, d'être également le vecteur de la thrombopénie cyclique canine. De plus, on sait qu'elle peut également transmettre chez le chien *Babesia vogeli* et *Babesia gibsoni*, *Hepatozoon canis* et *Mycoplasma haemocanis* (anciennement *Haemobartonella canis*). Théoriquement, des coinfections par ces différents germes pourraient donc être observées. En Thailande et au Venezuela, des co-infections à *Anaplasma platys/ Anaplasma phagocytophilum* ont également été rapportées (EUZEBY 2002).

4. Facteurs favorisants

Tout comme pour *Ehrlichia canis*, il semblerait que le stress lié à une chirurgie ou à une gestation mais aussi des maladies intercurrentes peuvent être à l'origine de l'expression clinique d'une infection jusque-là sub-clinique.

II. Pathogénie

Le cycle de développement d'A. platys est très proche de celui d'A. phagocytophilum, avec une intrusion de l'organisme dans la plaquette par endocytose, suivie par des divisions binaires de la bactérie au sein de la vacuole. La **période d'incubation** observée lors d'infections intraveineuses expérimentales varie de 8 à 15 jours (HARVEY 2012). La bactérie est à l'origine d'une **succession de phases de thrombopénie** survenant à intervalles réguliers parallèlement à la bactériémie plaquettaire. C'est pourquoi on a donné à cette maladie le nom de « thrombopénie infectieuse cyclique » (DAVOUST & PARZY 1995).

Au cours de l'infection, la parasitémie est maximale lors du **premier épisode**, où l'on observe un taux élevé de plaquettes infectées (30-60%) suivie quelques jours après d'une thrombopénie qui peut être sévère, inférieure à 10.10 9 plaquettes/L (EUZEBY 2001b). Après ce premier épisode, les microorganismes ne sont plus visibles et les thrombocytes sont rapidement régénérés avec un retour aux valeurs usuelles en 3 à 4 jours (HESELTINE et al. 2003; HARVEY 2012). Par la suite, chaque épisode de bactériémie est suivi par un nouveau pic thrombopénique, et ce toutes les une à deux semaines. Au cours des pics de thrombopénie qui suivent le premier épisode, le taux de plaquettes infectées est beaucoup plus faible (1-13%), mais la thrombopénie est toujours aussi marquée (HARVEY 2012)(Figure 24).

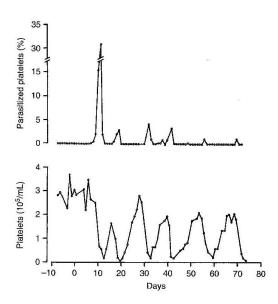


Figure 24 : Pourcentage de plaquettes infectées et taux de plaquettes chez un chien auquel on a injecté par voie intraveineuse la bactérie (0 en abscisse représente le jour de l'inoculation) (source : HARVEY 2012)

Alors que la thrombopénie initiale serait la conséquence directe de la **destruction plaquettaire due à la réplication des micro-organismes et de la phagocytose** des plaquettes infectées (on a pu retrouver des antigènes d'*A. platys* dans les macrophages tissulaires de la moelle osseuse, de la rate, des ganglions et du foie 14 jours après inoculation, soit au

moment du premier pic de thrombopénie (BAKER et al. 1987)), les épisodes thrombopéniques qui suivent s'expliqueraient surtout par la mise en place de **mécanismes à médiation immune** (HARVEY 2012). Sans traitement, les chiens guérissent cliniquement mais restent souvent porteurs. Au fur et à mesure, la fréquence des épisodes se ralentit et les pics de thrombopénie sont remplacés par une légère **thrombopénie chronique** qui se résout lentement, avec une parasitémie sporadique (EUZEBY 2001b; HESELTINE et al. 2003; HARVEY 2012).

De plus, d'autres signes biologiques peuvent être présents : un dysfonctionnement plaquettaire (GAUNT et al. 1990), une **leucopénie** modérée transitoire (neutropénie, éosinopénie et lymphopénie) concomitante à la parasitémie (le plus souvent dans les intervalles des valeurs usuelles chez le chien), et parfois une monocytose (BEAUFILS et al. 2002). Une **anémie modérée d'origine inflammatoire normochrome et normocytaire** a également été rapportée au cours du premier mois de l'infection, mais la numération redevient normale très rapidement. Une légère **hypoalbuminémie**, **hyperglobulinémie** (essentiellement augmentation des α 1- et des γ -globulines) et augmentation des protéines totales peuvent aussi être présentes (HESELTINE et al. 2003; HARVEY 2012). Enfin, une hypocalcémie, peut-être en lien avec l'hypoalbuminémie est possible (EUZEBY 2001b; BEAUFILS 2004).

III. Expression clinique

A. Symptômes

Dans la plupart des cas, l'animal présente peu de signes cliniques là encore généraux et non spécifiques : une hyperthermie modérée et une légère hématochézie est parfois rapportée lors de la parasitémie initiale mais le plus souvent, l'infection est inapparente (DAVOUST & PARZY 1995; HARVEY 2012; HESELTINE et al. 2003). Parfois, des symptômes plus sévères peuvent survenir : un syndrome fébrile, des uvéites, des pétéchies, des ecchymoses ou de l'épistaxis ont été décrits chez certains chiens aux Etats-Unis, mais il s'agit de cas isolés (BEAUFILS 2004; HARVEY 2012; HESELTINE et al. 2003). Il semble que les souches européennes (Sud de la France, Italie, Grèce, Israël) soient plus virulentes que les souches américaines, asiatiques ou australiennes, où l'infection est le plus souvent asymptomatique (BEAUFILS 2004; CHABANNE et al. 2011): certaines études ont rapporté en plus des symptômes plus sévères déjà mentionnés un abattement, une dysorexie, un amaigrissement, des muqueuses pâles, un jetage nasal muco-purulent, une polyadénomégalie et/ou une splénomégalie, des douleurs parfois violentes et plus rarement des symptômes digestifs sur des chiens infectés expérimentalement et naturellement par une souche grecque d'Anaplasma platys, ainsi qu'en Israël (BEAUFILS 2004 ; HARVEY 2012). En France, une étude rapporte également des troubles neurologiques (tremblements, état de stupeur...) et comportementaux (BEAUFILS et al. 2006), mais ceux-ci restent inhabituels lors d'infection à A. platys. On a pu montrer que les séquences de l'ARNr 16S des différentes souches d'A. platys en Chine, aux USA et en France présentent de légères différences (quelques nucléotides de différence : Figure 25)(EUZEBY 2001b ; BEAUFILS et al. 2002; BEAUFILS 2004). Il pourrait donc y avoir des **variants** susceptibles d'expliquer la variabilité du pouvoir pathogène observée (EUZEBY 2001b). Cependant, l'expression clinique plus importante de la maladie pourrait également être le fait de **co-infections** avec d'autres maladies vectorielles non diagnostiquées (HARVEY 2012), expliquant la diversité des symptômes observés. Ces co-infections peuvent en outre altérer le système immunitaire de l'hôte, exacerbant le tableau clinique. Enfin, il est rare d'observer des hémorragies spontanées (HESELTINE et al. 2003), la thrombopénie étant de courte durée (trois à quatre jours). Elles surviennent en général à la faveur de plaies accidentelles ou chirurgicales (EUZEBY 2001b; HARVEY 2012; BEAUFILS et al. 2002). Les troubles de l'hémostase rapportés pourraient être dues à des thrombopathies décrites dans lors de cette infection (GAUNT et al. 1990).

DNA source		Nucleotide at position *						
(GenBank accession n°)	242	454	739	878	880	931	**	1292
Sommières, France (AF303467)	Α	-	G	С	G	-	G	т
China (AF156784)	Α	С	G	С	G	Т	-	Т
USA (M82801)	-		Т		С		G	G

^{*} Numbers refer to position in the 16S rRNA gene of A. platys China (AF156784).

Figure 25 : Comparaison de la séquence nucléotidique du gène codant l'ARNr 16S des souches françaises, chinoises et américaines d'*Anaplasma platys* (source : BEAUFILS et al. 2002)

Et sur le terrain ? D'après une étude réalisée en 2007 auprès des cliniques vétérinaires françaises, les signes les plus fréquemment rapportés sont l'abattement, suivi par l'anémie, l'hyperthermie, la thrombopénie, le syndrome hémorragique (pétéchies, épistaxis et hémorragies), l'anorexie et l'ictère. L'épistaxis est relativement souvent citée, alors que très rarement rapportée dans la littérature. Cela peut sans doute s'expliquer en partie par le fait que l'infection est bénigne la plupart du temps et reste encore sous diagnostiquée en France, les cas effectivement confirmés étant les cas les plus graves, où la thrombopénie est telle qu'elle entraîne une épistaxis et d'autres signes de déficit plaquettaire (DROUFFE 2007).

^{**} Between 1020 and 1021

B. Modifications histologiques

L'autopsie d'animaux euthanasiés durant les premières semaines de l'infection a seulement montré une polyadénomégalie et une pneumonie interstitielle modérée macroscopiquement (BEAUFILS 2004 ; HARVEY 2012).

Les lésions histologiques rapportées sont une hyperplasie folliculaire et une plasmocytose à 14 jours suivies d'une nécrose modérée des lymphocytes folliculaires au niveau des ganglions, une hyperplasie folliculaire, une plasmocytose, des hémorragies périfollicullaires, de l'érythrophagocytose, une hématopoïèse extra-médullaire et des lésions de nécrose dans la rate ainsi que des hyperplasies multifocales des cellules de Küpffer dans le foie (BEAUFILS 2004; HARVEY 2012). Le nombre de mégacaryocytes dans la moelle osseuse est normal à légèrement augmenté (HARVEY 2012).

IV. Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic clinique, hématologique et épidémiologique (séjour dans le sud, région de résidence, présence de tiques, chien de chasse...) permet de suspecter très fortement la maladie mais le diagnostic de certitude ne peut s'établir qu'à l'aide de techniques diagnostiques expérimentales.

A. Méthodes directes

1. Cytologie : recherche de morulae sur frottis sanguin

C'est un moyen de diagnostic direct : il permet de mettre en évidence des morulae intracytoplasmiques au sein des plaquettes sur un frottis sanguin coloré au May Grünwald Giemsa. Cependant, elle est difficile compte tenu du caractère cyclique de la parasitémie et du faible nombre de morulae lorsque la maladie devient chronique, ce qui crée des résultats faussement négatifs. De plus, on peut avoir des individus faux-positifs si l'on confond les morulae avec d'autres inclusions plaquettaires ou des résidus de matériel nucléaire mégacaryocytaire. Un procédé de coloration immunohistochimique a été décrit permettant d'identifier de façon spécifique les morulae d'Anaplasma platys dans les thrombocytes et d'éviter ainsi ces confusions (EUZEBY 2001b; HARVEY 2012). On peut également réaliser un examen au microscope électronique sur du « buffy coat » traité au glutaraldéhyde (EUZEBY 2001b).

Le diagnostic cytologique reste possible et utile en phase **aigüe** de l'infection, surtout lors de la première bactériémie, où les plaquettes infectées sont nombreuses (HESELTINE et al. 2003). Comme pour la piroplasmose ou l'ehrlichiose monocytaire canine, des signes indirects telle qu'une **mononucléose relative**, avec présence de macrophages peuvent également être présents (BEAUFILS et al. 2006).

2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

De plus en plus utilisée, elle permet un diagnostic de certitude. Il est indispensable de bien choisir les amorces. En effet, on s'est aperçu qu'une amorce que l'on pensait spécifique d'A. phagocytophilum a aussi permis l'amplification d'A. platys (HARVEY 2012). Afin d'éviter ces confusions, on pourra également privilégier des tests reposant sur des gènes de plus grande variabilité que le gène codant l'ARNr 16S, tel que le gène qltA ou l'opéron qro-ESL (INOKUMA et al. 2002). Aujourd'hui, il existe un test de PCR emboité permettant de détecter spécifiquement l'ADN d'Anaplasma platys à partir de cinq inclusions plaquettaires dans l'échantillon testé, dès le cinquième jour après inoculation (BEAUFILS 2004). Bien réalisée, il s'agit de la méthode de diagnostic la plus sensible et spécifique, même s'il peut y avoir des faux négatifs lors de la phase aiguë de l'infection. Elle permet un diagnostic précoce (BEAUFILS 2004) et est particulièrement utile lorsque les bactéries sont peu nombreuses ou présentent un aspect peu typique sur le frottis sanguin, notamment dans les phases du cycle où les thrombocytes et la bactériémie sont bas, ainsi que lors d'infection ancienne (BEAUFILS et al. 2006). Dans certains cas, des tests PCR négatifs à partir du sang peuvent se révéler positifs lorsqu'ils sont réalisés à partir d'échantillons d'organes, tels que la rate ou la moelle osseuse (EDDLESTONE et al. 2007). En France, elle est réalisable à la Faculté de médecine de Marseille, Unité des Rickettsies.

3. Culture

Actuellement, la culture d'Anaplasma platys n'est pas réalisable.

B. <u>Méthode indirecte : Sérologie</u>

Il s'agit de la méthode de diagnostic la plus utilisée sur le terrain (DROUFFE 2007).

Comme pour *A. phagocytophilum*, la méthode la plus employée est **l'immunofluorescence indirecte** (IFI). L'antigène est constitué de plaquettes d'animaux expérimentalement infectés. La séroconversion survient au moment du premier pic de bactériémie ou juste après, avec un titre d'anticorps s'élevant à 5120 ou plus 7 à 19 jours après l'infection (HOSKINS 1991; EUZEBY 2001b ; BEAUFILS 2004 ; HARVEY 2012).

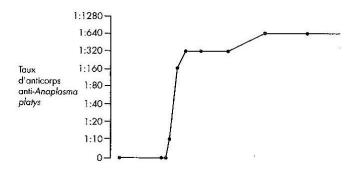


Figure 26 : Evolution du taux d'anticorps anti- *A. platys* chez un chien injecté expérimentalement par *A. platys* à J0 (d'après BEAUFILS 2004)

Elle est donc précoce et durable : la réponse anticorps persiste au moins 4 mois et parfois plus de cinq ans chez des chiens asymptomatiques non traités (EUZEBY 2001b; BEAUFILS 2004). C'est une technique intéressante pour le diagnostic, mais il faut considérer uniquement les **titres élevés** comme significatifs (seuil de positivité > 200 pour l'IFI), un titre moyennement élevé pouvant simplement impliquer le passage antérieur de l'agent infectieux dans l'organisme (HOSKINS 1991; EUZEBY 2001b). S'il est nécessaire de mettre en évidence une **séroconversion** à travers une cinétique d'anticorps pour avoir un **diagnostic de certitude de l'infection**, la mise en évidence d'un titre élevé d'anticorps associé aux signes cliniques et hématologiques peut suffire à avoir un diagnostic de quasi-certitude, la séroprévalence pour cette maladie étant globalement faible en Europe. Aux Etats-Unis cependant, les tests d'immunofluorescence indirecte révèlent une forte séroprévalence, avec plus d'un tiers des chiens thrombopéniques positifs en Floride et en Louisiane (HARVEY 2012). Plus de 50% des chiens séropositifs pour *Ehrlichia canis* le sont également pour *Anaplasma platys* (HARVEY 2012). Ces co-infections ont été confirmées par PCR (analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S).

Aucune **réactivité sérologique croisée** n'est décrite avec *Ehrlichia canis* ou *Neorickettsia risticii* (EUZEBY 2001b), mais une réactivité croisée est possible avec *Anaplasma phagocytophilum*, très proche génétiquement (HARVEY 2012), ainsi qu'avec *Ehrlichia chaffeensis* (BEAUFILS et al. 2002). Les tests d'immunofluorescence indirecte ne sont pas disponibles en France actuellement et ne sont donc pas utilisables en routine (l'absence de technique de culture pour *A. platys* implique la nécessité d'avoir des chiens infectés en permanence pour fournir l'antigène). Ils sont uniquement commercialisés aux USA.

Récemment, un test rapide ELISA a été développé (SNAP® test 4Dx) par les laboratoires IDEXX, permettant de détecter des anticorps dirigés contre Anaplasma phagocytophilum (cf. Partie 2), mais on peut observer des réactions positives chez des chiens infectés avec Anaplasma platys, les deux microorganismes partageant des épitopes communs. Les autres espèces de rickettsies ne présentent pas de réactivités croisées avec ce test, qui reste donc assez spécifique (HARVEY 2012). Dans une région où Anaplasma phagocytophilum est endémique il est tout de même conseillé de réaliser une PCR afin de déterminer avec certitude quel germe est responsable de la positivité du test.

BILAN

En Europe, le diagnostic de la thrombopénie infectieuse cyclique an pratique courante repose donc principalement sur l'examen cytologique du **frottis sanguin** en phase aigüe de l'infection, mais la **PCR** devrait être de plus en plus utilisée, afin de diagnostiquer avec certitude la maladie. Celle-ci permet également de confirmer la guérison biologique de l'infection (BEAUFILS et al. 2006) et de détecter la présence éventuelle de co-infections afin d'ajuster au mieux le pronostic et le traitement. Son coût reste cependant élevé.

V. Traitement de la maladie

Le traitement recommandé est le même que celui de l'ehrlichiose monocytaire canine à *Ehrlichia canis*: *Anaplasma platys* est sensible aux **tétracyclines** (HARVEY 2012; DAVOUST & PARZY 1995; EUZEBY 2001b) (**doxycycline** (10 mg/kg/j), oxytétracycline, tétracycline (22 mg/kg trois fois par jour), minocycline), à l'enrofloxacine (HARVEY 2012), au chloramphénicol et à l'imidocarbe dipropionate (5 mg/kg IM) ⁴. L'imidocarbe est particulièrement indiqué pour les chiots à dentition encore lactéale alors que la doxycycline reste le traitement de première intention chez l'adulte. Des mécanismes à médiation immune étant suspectés d'être à l'origine des pics thrombopéniques observés lors de l'infection, de la **dexaméthasone** (0, 17 mg/kg) peut également être injectée aux individus malades. Elle permet en outre une reprise plus rapide de l'appétit et de l'état général (BEAUFILS et al. 2006).

La durée du traitement antibiotique varie selon les auteurs (BEAUFILS 2004) (10 à 15 jours minimum), mais l'existence de **co-infections très fréquentes avec** *E. canis* incite à choisir une durée préférentielle de **4 semaines au moins** (durée de traitement admise pour l'ehrlichiose monocytaire canine) voire 8 semaines lors d'infection chronique (EUZEBY 2001b). Dans l'infection à *E. canis*, il semble que diviser la dose journalière en deux prises de 5 mg/kg augmente l'efficacité du traitement, mais un tel protocole ne parait pas réellement influer sur la durée de la guérison pour l'anaplasmose plaquettaire canine (BEAUFILS et al. 2006). Comme pour *A. phagocytophilum*, celle-ci est en général spectaculaire et intervient dans les 48 heures dans la majorité des cas.

Le portage chronique après traitement semble moins important que pour *E. canis*. En effet, après traitement, Beaufils ne met plus en évidence de morulae intraplaquettaires (BEAUFILS et al. 2002).

Si la maladie ne rétrocède pas après 48 heures de traitement, il est conseillé de chercher d'autres affections associées, et de compléter le traitement par les molécules alternatives pour ces maladies, l'imidocarbe en particulier.

Lorsque l'on souhaite contrôler la guérison biologique de l'infection et l'efficacité du traitement, la recherche de morulae, du fait du caractère cyclique de la parasitémie ou la sérologie, très difficilement disponible en routine, ne sont pas des méthodes fiables. La technique la plus indiquée reste la PCR (BEAUFILS 2004).

_

⁴ Si la majorité des vétérinaires utilisent les tétracyclines seules, il est à noter que certains vétérinaires en France utilisent une association tétracyclines/imidocarbe ou tétracyclines /autres antibiotiques (fluoroquinolones, pénicilline). D'autres encore utilisent l'imidocarbe sans y associer les tétracyclines (DROUFFE 2007).

VI. Prophylaxie

Aucun vaccin contre la thrombopénie infectieuse cyclique n'est disponible. La prophylaxie repose donc là encore essentiellement sur la **lutte contre les vecteurs** dans l'environnement et sur l'animal, à l'aide d'antiparasitaires externes, les plus utilisés étant le fipronil (Frontline®), la perméthrine/imidaclopride (Advantix®), la deltaméthrine en collier (Scalibor®), l'amitraz en collier (Préventic®) et la perméthrine/pyriproxifène (Duowin®) (DROUFFE 2007).

Les chiens donneurs de sang, dans les zones sensibles, devraient être dépistés par sérologie (IFI) quand cela est possible, deux fois à quatre semaines d'intervalle puis tous les ans (EUZEBY 2001b), ou bien traités préventivement par antibioprophylaxie (tétracyclines). De même une chimioprophylaxie individuelle à base de doxycycline (3 mg/kg) peut être préconisée pour des animaux provenant de zones indemnes et venant séjourner lors d'un voyage en zone d'endémie.

VII. Potentiel zoonotique

A ce jour, l'anaplasmose à *A. platys*, considérée comme spécifique de l'espèce canine, ne semble pas être une zoonose. Au Venezuela, un organisme morphologiquement proche a cependant été observé dans les plaquettes de plusieurs patients humains (BEAUFILS 2004). Des études supplémentaires sur le potentiel zoonotique de la bactérie permettront donc peut-être de reconsidérer la maladie en tant que zoonose dans les prochaines années.

A retenir : L'anaplasmose plaquettaire canine (encore appelée thrombopénie cyclique canine ou thrombopénie infectieuse canine), découverte en 1978 aux Etats-Unis est une maladie transmise par les tiques Rhipicephalus sanguineus, que l'on retrouve aujourd'hui un peu partout dans le monde. Après une période d'incubation de huit à quinze jours, la phase aigüe est caractérisée par une bactériémie et une thrombopénie cyclique à intervalles réguliers de une à deux semaines. Elle doit être recherchée lors d'hyperthermie associée à de l'abattement, des douleurs, une pâleur des muqueuses et /ou des troubles de l'hémostase ou lors de thrombopénie d'origine indéterminée. La saison est également un facteur diagnostic, la majorité des cas survenant entre le printemps et l'automne. L'examen du frottis sanguin (mise en évidence de morulas intraplaquettaires) est le test le plus utilisé en routine et suffit généralement pour établir le diagnostic. En cas de doute et lorsque la sérologie (IFI, ELISA) n'est pas disponible, la PCR est utile pour confirmer de façon précoce la maladie, et détecter d'éventuelles co-infections. Le traitement, à base de doxycycline (10 mg/kg/j) sur une quinzaine de jours, est efficace, permettant la guérison en 48 heures environ. Des études seraient encore intéressantes pour élucider l'origine de la diversité des symptômes observés et notamment la différence de pathogénicité entre les souches américaines et asiatiques d'une part et les souches du pourtour méditerranéen d'autre part (existence de plusieurs variants génétiques?). De plus, le caractère zoonotique de l'infection, déclaré non existant à ce jour, sera peut-être amené à être reconsidéré, compte tenu de la découverte récente d'inclusions intraplaquettaires chez des patients humains au Venezuela.

Après avoir synthétisé les principales données bibliographiques existant sur les anaplasmoses canines, et dégagé quelques problématiques qui restent encore à explorer, nous allons dans une deuxième partie présenter le cadre, les intérêts et les objectifs de l'étude que nous avons menée au cours de l'été 2011, tentant de définir la séroprévalence du genre Anaplasma en France chez le chien.

Partie 2. ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DU GENRE ANAPLASMA CHEZ LE CHIEN EN FRANCE

Chapitre 1. Cadre et objectifs de l'étude

I. Le point sur les études de prévalence des anaplasmoses canines en Europe et en France

A. <u>Prévalence du genre Anaplasma chez les tiques</u>

La **prévalence moyenne** d'Anaplasma phagocytophilum chez *I. ricinus* est d'environ 3% en Europe (de 1,2 à 8,7% selon les pays)(DUMLER et al. 2005; BEUGNET & MARIE 2009). En France, elle ne serait que de 0,3% à 1,25% (PAROLA et al. 1998; FERQUEL et al. 2006; COTTE et al. 2010). On observe cependant une grande variation de cette prévalence d'une région à l'autre. Par exemple, une étude réalisée dans le Puy de Dôme en 2003, ayant analysé par PCR 521 échantillons d'ADN extrait d'*I. ricinus*, rapporte une prévalence de 15% pour *Anaplasma phagocytophilum* (HALOS et al. 2006). Une telle proportion pourrait s'expliquer à la fois par le climat, favorable à la multiplication des tiques et à des cycles de développement courts permettant une transmission transstadiale importante du germe ou encore par la présence de réservoirs de la bactérie potentiellement plus nombreux dans cette région. Plus largement, il semblerait que de l'ADN d'*Ehrlichia* ou d'*Anaplasma sp.* serait présent chez pratiquement 20% des *Rhipicephalus sp.* et 26% des *Ixodes sp.* (BEUGNET & MARIE 2009).

Enfin, en ce qui concerne la co-infection d'*Ixodes ricinus* avec *Borrelia burgdorferi* et *Anaplasma phagocytophilum*, elle serait comprise entre 0,1 et 28,1% (NIETO & FOLEY 2009). Il n'y a à ce jour aucune étude faisant rapport de la prévalence exacte *d'Anaplasma platys* au sein de *Rhipicephalus sanguineus* en Europe.

B. Prévalence des anaplasmoses chez le chien

La prévalence de l'anaplasmose chez le chien se définit par le nombre de cas d'anaplasmose rapporté au nombre de chiens vus en consultation.

Le diagnostic de ces infections bactériennes étant souvent difficile, compte tenu du tableau clinique peu évocateur et de l'existence de nombreux cas asymptomatiques, peu de données sont disponibles quant à leur prévalence en Europe et en France. Quelques études s'y sont cependant intéressées.

1. Anaplasmose granulocytaire canine à Anaplasma phagocytophilum

La **séroprévalence** d'*Anaplasma phagocytophilum* en Europe est très variable, allant de 5% à 70,5% en fonction de la région, des techniques utilisées et de la population canine concernée (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012).

En France à ce jour, deux travaux ont tenté de déterminer la prévalence des anaplasmoses canines. D'après une étude réalisée en 2007 auprès des cliniques vétérinaires françaises, la prévalence globale de l'anaplasmose granulocytaire canine à *A. phagocytophilum* (cas diagnostiqués par les praticiens) se situe entre 0,0021% et 0,0077%, avec une moyenne probable de 0,0054%. La maladie reste donc encore **peu diagnostiquée** en France. De plus, toujours selon cette étude, seulement 1,8% des cliniques auraient diagnostiqué des cas ces 10 dernières années, principalement dans le Tarn, en Isère et en Haute-Saône (DROUFFE 2007). Une **étude sérologique** utilisant le SNAP® test 4Dx® IDEXX, menée sur 919 chiens en 2009, rapporte que 2,72% (25/919) d'entre eux possèdent des anticorps dirigés contre *Anaplasma phagocytophilum* (PANTCHEV et al. 2009). Dans cette étude, les 25 cas positifs proviennent de 20 départements différents répartis sur l'ensemble de la France (Figure 27).

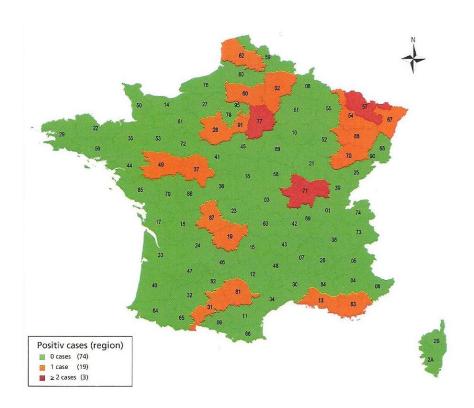


Figure 27 : Répartition géographique des chiens séropositifs pour *Anaplasma phagocytophilum* (source : PANTCHEV et al. 2009)

Une co-infection avec *Borrelia burgdorferi*, également transmis par *Ixodes ricinus* est constatée chez deux chiens (0,22%, n=919) sur les 25 ayant été en contact avec *A. phagocytophilum*. En raison de vecteurs et de réservoirs communs (rongeurs), on a en effet constaté que la distribution de la séroprévalence à *A. phagocytophilum* suivait celle de *B. burgdorferi* sensu lato. Un seul cas (0,11%, n=919) présente une co-infection avec *A. phagocytophilum* et *Ehrlichia canis* (PANTCHEV et al. 2009).

➡ On constate que la séroprévalence de l'infection est bien plus importante que la prévalence de l'anaplasmose observée dans les cliniques vétérinaires. Cela montre que la maladie est probablement largement sous-estimée par les praticiens dans notre pays et/ou que les cas d'infection asymptomatique sont relativement fréquents et plus nombreux que les cas de maladie avérée.

2. Thrombopénie infectieuse cyclique à Anaplasma platys

En ce qui concerne l'infection à *Anaplasma platys*, selon l'étude d'Anne Drouffe réalisée en 2007, la prévalence globale rapportée en France par les praticiens se situe dans une fourchette de 0,007% à 0,02%, avec une valeur moyenne probable de 0,016%. 4,7% des cliniques auraient par ailleurs diagnostiqué des cas depuis 10 ans, à raison pour 38,5% des vétérinaires de moins d'un cas sur 10 ans. Comme nous l'avons déjà mentionné, la majorité des individus positifs se trouve concentrée dans le Sud, dans des zones où *Rhipicephalus sanguineus* est présent (Languedoc Roussillon, Alpes de haute Provence, Gironde). Les cas sont cependant moins nombreux sur le pourtour méditerranéen que pour *Ehrlichia canis* (DROUFFE 2007)(Tableau VI).

C. Part des anaplasmoses par rapport aux autres maladies transmises par les tiques chez le chien en France

Les autres maladies vectorielles transmises par les tiques diagnostiquées chez le chien en France sont principalement la piroplasmose à *Babesia canis*, l'ehrlichiose monocytaire à *Ehrlichia canis*, la Borréliose de Lyme à *Borrelia burgdorferi*, l'hémobartonellose à *Mycoplasma haemocanis* et l'hépatozoonose à *Hepatozoon canis*.

La piroplasmose, considérée encore comme une maladie émergente dans certains pays du monde, possède une forte prévalence en France, notamment dans certaines régions où l'infection est endémique (BOOZER & MACINTIRE 2003; BOURDOISEAU 2006). L'ehrlichiose monocytaire, tout comme l'anaplasmose, est une maladie peu évaluée en France. Si sa prévalence semble être non négligeable aux États-Unis, en Amérique du Sud et au sud de la Chine (NEER & HARRUS 2006), en France, la prévalence globale annuelle estimée selon une étude de P. Bourdeau publiée en 2008, serait de 0,9 à 3 cas pour 1000 chiens, soit une incidence moyenne annuelle de 2,1‰ (basée sur l'évaluation de 20 000 cas cliniques annuels)(BOURDEAU 2008). De même, la borréliose de Lyme resterait très peu diagnostiquée dans notre pays chez le chien: selon la même étude, on aurait une prévalence clinique de 0,03 à 0,06 cas pour 1000 chiens soit une incidence moyenne annuelle de 0,05‰ (basée sur l'évaluation de 500 cas cliniques par an)(BOURDEAU 2008)(Tableau VI). Il existe

très peu sinon pas d'études disponibles dans la littérature sur la prévalence de l'hémobartonellose canine et de **l'hépatozoonose canine** en France.

Maladie	Agent pathogène	Prévalence clinique en France (cas diagnostiqués par les cliniques vétérinaires françaises)	Source
Thrombopénie infectieuse cyclique	Anaplasma platys	0,07 ‰ à 0,20 ‰ (moyenne = 0,16 ‰)	DROUFFE, 2007
Anaplasmose granulocytaire	Anaplasma phagocytophilum	0,021 ‰ à 0,077 ‰ (moyenne = 0,054 ‰)	DROUFFE, 2007
Ehrlichiose monocytaire	Ehrlichia canis	0,9 ‰ à 3,0 ‰ (moyenne = 2,1 ‰)	DROUFFE, 2007 BOURDEAU, 2008
Borréliose de Lyme	Borrelia burgdorferi	0,03 ‰ à 0,06 ‰ (moyenne = 0,05 ‰)	BOURDEAU, 2008

Tableau VI : Comparaison du taux de prévalence clinique des principales maladies émergentes transmises par les tiques en France chez le chien

BILAN

Les données recueillies dans la littérature montrent que les maladies vectorielles canines, en particulier les maladies bactériennes, sont très probablement sous-estimées en France : elles sont en effet encore très peu diagnostiquées dans les cliniques vétérinaires, malgré la prévalence élevée du portage des agents pathogènes dans les populations de tiques. Cependant, ces valeurs sont à considérer avec prudence : elles sont en effet très variables selon les méthodes de diagnostic utilisées (symptômes cliniques, frottis sanguin, sérologie, PCR...), la sensibilité et la spécificité de ces techniques étant très différentes. Il faut également considérer l'échantillon d'étude, dont la taille est parfois petite. De plus, les données peuvent être difficilement comparables, car elles correspondent à des animaux exposés à des risques d'infection différents en fonction de leur mode de vie, de la région où ils vivent ou bien s'ils sont soumis ou non à un traitement préventif contre les parasites externes. Enfin, il faut rappeler que la prévalence d'une infection est calculée pour une période donnée, et qu'elle est susceptible d'évoluer au cours du temps.

II. Intérêts de l'étude

La multiplication de nouveaux traitements anti-parasitaires externes (Comfortis®, Certifect®...), très largement utilisés en pratique canine courante dans la prévention des maladies transmises par les tiques, les moustiques ou les puces va de pair avec l'intérêt grandissant de la recherche vétérinaire pour les maladies à transmission vectorielle. Malgré les **mesures de prophylaxie**, ces maladies continuent d'entraîner une morbidité non négligeable et parfois de la mortalité dans la population domestique canine. Nous avons vu l'évidence du rôle que joue aujourd'hui l'anaplasmose dans la santé animale mais aussi humaine. Néanmoins, le besoin de données supplémentaires sur la distribution et la prévalence de cette infection émergente en France est réel, pour mieux en apprécier l'importance.

On peut dégager actuellement plusieurs facteurs qui peuvent expliquer l'émergence des anaplasmoses, qu'il est important de connaître pour comprendre ce phénomène et l'anticiper.

Tout d'abord, on observe une modification des écosystèmes du fait du réchauffement climatique (l'effet le plus important restant sans doute le changement de saison avec une diminution de la période hivernale classique : les tiques peuvent être dorénavant actives toute l'année, sur une superficie croissante (BEUGNET & MARIE 2009)) et des pratiques humaines, avec l'urbanisation et l'exploitation des espaces naturels, qui favorisent les échanges et contacts entre les agents pathogènes, le milieu, l'animal de compagnie et l'homme (RODHAIN 2003 ; CHABANNE & BOURDOISEAU 2006): le développement de parcs de loisirs et de grandes zones suburbaines avec jardins privés facilite l'installation de populations de tiques à proximité des habitations humaines et l'exposition à des maladies comme la borréliose de Lyme, ainsi que l'installation des hôtes péridomestiques (rongeurs, hérissons...) ; les mesures de protection de la faune sauvage et de réhabilitation des espaces naturels, en particulier des forêts, ont contribué à la prolifération des chevreuils, sangliers et renards (BEUGNET & MARIE 2009), espèces hôtes des tiques et réservoirs d'*Anaplasma phagocytophilum*.

⇒ Ce facteur pourrait rapidement influer sur l'abondance, les capacités de reproduction et de déplacement des populations de tiques, augmentant leur aire de répartition et pouvant conduire à l'émergence de nouveaux foyers (CHABANNE & BOURDOISEAU 2006). De plus, l'augmentation au cours des deux dernières décennies des voyages et du transport des animaux de rente, de sport et de compagnie (phénomène de globalisation) favorise la circulation des agents pathogènes et entrainent l'importation de maladies contractées dans des pays comme l'Italie, l'Espagne ou la France dans les pays d'Europe du Nord par exemple (CHABANNE & BOURDOISEAU 2006 ; BEUGNET & MARIE 2009).

Par ailleurs, il ne faut pas oublier que le développement des outils diagnostiques dont la microscopie électronique, les techniques de culture cellulaire et les techniques de biologie moléculaire peuvent conduire à une augmentation apparente de l'incidence des maladies infectieuses (CHABANNE & BOURDOISEAU 2006).

Enfin, en France en particulier, on observe plusieurs types de climat et d'influences écologiques : climat océanique sur la côte Ouest, continental à l'Est, méditerranéen dans le Sud. C'est un pays de petite superficie qui est directement exposé à la propagation des maladies vectorielles, initialement établies dans un seul de ces habitats mais qui pourront s'étendre facilement aux habitats voisins.

III. Objectifs de l'étude

Le premier objectif de notre étude fut d'établir une prévalence sérologique du genre *Anaplasma* parmi la population canine présentée en consultation dans les écoles vétérinaires françaises. Cette étude menée à l'initiative des laboratoires BAYER® devait initialement intéresser les quatre Ecoles vétérinaires françaises, mais finalement, elle sera entreprise uniquement dans celles d'Alfort, Lyon et Toulouse.

De plus, grâce aux données récoltées lors de l'échantillonnage des cas, il était également intéressant de réaliser une étude descriptive épidémiologique, clinique et hématologique à partir des cas séropositifs pour *Anaplasma* lors du SNAP® test 4Dx®.

Chapitre 2. **M**atériel et méthodes

I. Déroulement général

Pour cette étude, nous avons analysé les échantillons sanguins de 323 chiens présentés pour la plupart en consultation dans les Ecoles vétérinaires françaises d'Alfort (ENVA), Lyon (Vetagro-Sup, Campus vétérinaire) et Toulouse (ENVT) entre le mois de mars et le mois de juin 2011. Ceux-ci ont été prélevés dans les différents services cliniques des écoles. Seul un petit nombre d'échantillons pouvaient également provenir de cliniques vétérinaires extérieures aux Ecoles mais ont été envoyés à un des laboratoires des Ecoles pour analyse.

Les échantillons analysés étaient constitués systématiquement pour chacun des chiens inclus dans l'étude, d'un **prélèvement de sang sur tube EDTA**, afin de réaliser une **numération-formule sanguine**, complété si possible d'un prélèvement sur tube sec. Un **frottis sanguin** a parfois été réalisé à l'aide d'une goutte de sang prélevé sur tube EDTA lorsque des anomalies notables étaient perçues sur la numération-formule. Les tubes de prélèvement ont été conservés au réfrigérateur pendant une période de 24 à 48 heures maximum. Puis, chaque échantillon a subi une **analyse sérologique** pour la détection

d'anticorps anti-*A. phagocytophilum*⁵, à l'aide d'un **SNAP**® **test 4Dx**® **IDEXX** (Annexe 2 A et B).

Grâce au logiciel informatique Clovis®, qui répertorie toutes les données médicales relatives aux patients suivis dans les Ecoles, nous avons renseigné pour chaque cas une feuille de données standardisées (Annexe 1). Celle-ci mentionne les critères cliniques et biologiques qui ont permis l'inclusion du chien dans l'étude, les informations sur son anamnèse (données épidémiologiques), les principales anomalies détectées lors de l'examen clinique réalisé au moment du prélèvement sanguin, les résultats de l'examen du frottis sanguin lorsqu'il a été réalisé, la date de la prise de sang, les résultats des analyses hématologique et biochimique (lorsqu'elles ont été entreprises) ainsi que les résultats de l'analyse sérologique. Sont également mentionnés les résultats d'autres analyses éventuellement effectuées lors de la consultation (test de Coombs direct ou autoagglutination en milieu salin)(Annexe 1). L'ensemble des données recueillies sur ces fiches a permis de remplir un tableau récapitulatif, support de l'analyse statistique.

II. Population canine inclue dans l'étude

A. Critères d'inclusion pour le test sérologique 4Dx®

1. Population P1

Les chiens appartenant à la population **P1** sont des chiens pour lesquels on **pouvait suspecter une maladie vectorielle**, sur la base de critères hématologiques et cliniques. Ont donc été inclus dans cette catégorie tous les individus présentant une **anémie** (Hb < 12 g/dL) et/ou une **thrombopénie** (nombre de plaquettes < 150. 10 ³/mm³) et/ou une **leucopénie** (leucocytes < 5. 10 ³/mm³) et/ou une **neutropénie** (PNN < 3.10³/mm³); ainsi que ceux pour lesquels des parasites intracellulaires (*Babesia*, morula d'*Anaplasma*, autre) ont été mis en évidence sur le **frottis sanguin**. Enfin, les cas pour lesquels l'examen clinique a révélé de la **fièvre** (>39°C) et/ou de l'**abattement** et/ou une **boiterie** ou des **troubles locomoteurs** et/ou des **phénomènes algiques**, en l'absence d'une cause reconnue pouvant expliquer ces symptômes, ont aussi été inclus dans la population **P1**. Au total, 249 chiens ont été recrutés dans cette population d'animaux « suspects ».

2. Population P2

Les chiens appartenant à la population **P2** sont des **individus** « **témoins** », pour lesquels la numération-formule sanguine est normale et aucune anomalie n'est détectée à l'examen clinique. Sont inclus dans cette catégorie uniquement des **chiens de plus de un an**, potentiellement exposés aux tiques. Les animaux en apparente bonne santé, mais sur lesquels on a pu retrouver des **tiques** il y a moins de 10 jours, ont également été inclus dans cette population. Au total, 74 chiens ont été recrutés dans cette catégorie.

⁵ Des réactions sérologiques croisées ayant été décrites lors du SNAP® test 4Dx avec *Anaplasma platys*, il se peut qu'un test positif révèle également la présence d'anticorps anti-*Anaplasma platys* chez l'individu testé.

<u>Bilan</u>: 323 échantillons sanguins de chiens ont été analysés, entre le 1/03/2011 et le 29/06/2011: 198 cas répertoriés à l'ENVA, 72 cas à VetAgro-Sup Lyon et 53 cas à l'ENVT.

B. Recueil des données épidémiologiques

Pour chaque individu, nous avons relevé lorsque les informations étaient disponibles la race, l'âge, le sexe, les antécédents pathologiques, ainsi que le lieu de vie habituel (région urbaine, campagne, à l'intérieur exclusivement (sortie en laisse), à l'intérieur avec accès à l'extérieur (jardin par exemple), dehors la plupart du temps). D'éventuels déplacements dans d'autres régions (lieu et période) ont été enregistrés. Le code postal du propriétaire ou à défaut le nom du pays de résidence (si réside à l'étranger) ont également été renseignés. Enfin, nous avons noté la date et le nom du dernier traitement antiparasitaire externe préventif réalisé lorsqu'ils étaient précisés.

C. Examen clinique général

Pour chaque animal, on a relevé lorsque les informations étaient disponibles, la température rectale, le poids, des anomalies éventuelles au niveau cutané (lésions, présence de tiques ou de puce...), au niveau de l'appareil cardiovasculaire (rythme, souffle...), pulmonaire (tachypnée, dyspnée...), digestif (diarrhée, vomissements...), locomoteur (douleur, trouble articulaire, boiterie...), ainsi que des anomalies relatives au comportement du chien (abattement...).

D. Réalisation d'un frottis sanguin

Le frottis sanguin n'a pas été réalisé de façon systématique : nous l'avons effectué pour les chiens de la population **P1**, lorsqu'une anomalie était présente sur la numération-formule sanguine, en particulier une anémie et/ou une thrombopénie, afin de rechercher d'éventuelles *Babesia* au sein des globules rouges, des morulas d'*Anaplasma* dans les granulocytes ou les plaquettes ou une sphérocytose notable.

III. Méthode d'analyse sérologique

L'analyse sérologique a été réalisée une seule fois sur les **323 échantillons** sanguins récoltés dans les trois écoles vétérinaires françaises participant à l'étude, populations **P1** et **P2** confondues. Sur le site de Lyon, elle a été effectuée au Laboratoire de Parasitologie, avec l'aide de la Jeune Equipe Hémopathogènes Vectorisés. Le test utilisé est un **test de dosage sérologique rapide** (**SNAP**® **test 4Dx**® **IDEXX**). Nous avons suivi les directives du fabricant pour son utilisation (Annexe 2 A et B).

A. Principe du SNAP® test 4Dx® IDEXX

Il s'agit d'un **test immunoenzymatique ELISA** permettant la détection indirecte simultanée de 4 agents pathogènes sur le sérum, le plasma ou le sang total du chien: *Dirofilaria immitis* ou HW (heartworm), agent d'une filariose cardiaque chez le chien,

Anaplasma phagocytophilum ou AP, agent responsable de l'anaplasmose granulocytaire canine, Borrelia burgdorferi ou LY, agent responsable de la maladie de Lyme et Ehrlichia canis ou EC, agent responsable de l'ehrlichiose monocytaire canine. Pour notre étude, nous avons utilisé comme échantillons le sang prélevé sur tube EDTA nous ayant préalablement permis de réaliser la numération formule sanguine des individus des populations P1 et P2.

Chaque dispositif SNAP® est composé d'un puits à échantillon où l'on dépose l'échantillon sanguin mélangé au conjugué anti-HW/AP/LY/EC (HRPO), d'une fenêtre de lecture à travers laquelle l'échantillon s'écoule avant d'atteindre le cercle d'activation au bout de 30 secondes à une minute, et d'un activateur que l'on enfonce dès que le cercle d'activation commence à changer de couleur (Figure 28).

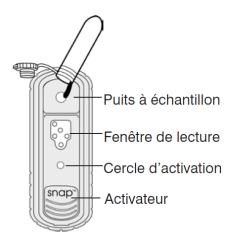


Figure 28: Dispositif SNAP® 4Dx® (source: notice d'utilisation du SNAP® test 4Dx IDEXX)

Les résultats sont lus au bout de huit minutes.

B. <u>Interprétation des résultats</u>

La fenêtre de lecture comporte cinq spots: un spot imprégné avec un antigène peptidique spécifique à toutes les souches d'*Anaplasma phagocytophilum* (peptide synthétique de la protéine majeure de surface recombinante p44/Msp2), un spot imprégné avec un antigène peptidique spécifique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (peptide C₆), un autre avec un antigène peptidique spécifique d'*Ehrlichia canis* (peptides issus des protéines majeures de surface p30 et p30-1). Un quatrième spot contient des dérivés d'anticorps spécifiquement dirigés contre les antigènes de la dirofilariose. Enfin un cinquième et dernier spot sert de contrôle positif du test (Figure 29). Lorsque les **résultats** sont **positifs**, le spot de contrôle positif et ceux pour lesquels le patient testé possèdent des anticorps ou des antigènes (dirofilariose) changent de couleur et deviennent bleus. Lorsque les **résultats** sont **négatifs**, seule la pastille de contrôle positif change de couleur.

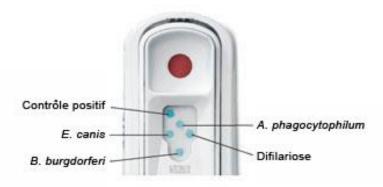


Figure 29 : Les cinq spots permettant l'interprétation du SNAP® test 4Dx® (source : IDEXX Laboratories 2012)

Chapitre 3. Résultats

I. Résultats de l'analyse sérologique à l'aide du test 4Dx®

Pour ces résultats, on notera n le nombre de cas inclus dans les calculs pour chaque valeur mentionnée (cas dont les données étaient connues).

Au total, 16 individus (5% de l'échantillon total (n=323)) sont revenus séropositifs pour un des agents pathogènes du test 4Dx®: **4 individus (1,2%, n=323) séropositifs pour Anaplasma phagocytophilum**, 2 individus (0,6%, n=323) pour *Ehrlichia canis*, 6 individus (1,9%, n=323) pour *Borrelia burgdorferi* et 4 individus (1,2%, n=323) pour *Dirofilaria immitis* (Tableau VII).

		Test 4DX	Test 4DX	Test 4DX	Test 4DX	
	n =	Anaplasma	Ehrlichia	Borrelia	Dirofilaria	Total 4DX
Lyon	72	2 (2,8%)	0 (0,0%)	1 (1,4%)	0 (0,0%)	3 (4,2%)
Alfort	198	2 (1,0%)	1 (0,5%)	5 (2,5%)	3 (1,5%)	11 (5,6%)
Toulouse	53	0 (0,0%)	1 (0,5%)	0 (0,0%)	1 (1,9%)	2 (3,8%)
Total	323	4 (1,2%)	2 (0,6%)	6 (1,9%)	4 (1,2%)	16 (5,0%)

Tableau VII: Nombre (et pourcentage) de cas séropositifs pour *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* ou possédant des antigènes de *Dirofilaria immitis* lors du test sérologique rapide SNAP® 4Dx® IDEXX

Dans cette présentation, nous étudierons uniquement les trois premiers agents pathogènes (la dirofilariose canine, transmise par des moustiques, ne rentre pas dans le cadre de notre sujet sur les maladies vectorielles canines transmises par les tiques) et en particulier ceux du genre *Anaplasma*. On constate que les **séroprévalences sont faibles**, malgré une forte proportion de l'échantillon total suspecte de maladie vectorielle transmise par les tiques (population **P1**, 77% (n=323)).

Compte tenu du très faible nombre de cas séropositifs pour *A. phagocytophilum*, nous ferons uniquement une analyse descriptive des cas, car même si des calculs de Chi 2 sont possibles, on ne peut pas établir de corrélations statistiques à partir d'un nombre de cas positifs aussi faible.

II. Analyse épidémiologique

A. Population séropositive lors du test 4Dx®

La race, le sexe, le poids, la population d'origine (**P1** ou **P2**) et l'Ecole de recrutement des cas séropositifs pour *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* et *Borrelia burgdorferi* sont reportées dans le Tableau VIII ci-dessous.

	N° de cas	RACE	AGE	SEXE (F/M)	POIDS (kg)	P1/P2	ENV D'ORIGINE
	308	Colley	5 ans	F	Non connu	P2	Alfort
	309	Berger Belge Malinois	4,5 ans	М	26,7	P1	Alfort
ANAPLASMA	320	Springer Spaniel	3 ans	F	18	P1	Lyon
	321	Croisé Labrador Retriever	6 ans	F	Non connu	P2	Lyon
EHRLICHIA	322	Croisé Berger Belge Malinois	10 ans	F	32	P1	Alfort
	323	Croisé Berger Allemand	8 ans	M	Non connu	P1	Toulouse
	310	Bouvier Bernois	4 ans	М	38,6	P1	Lyon
	315	Boarded Collie	2 ans	М	23	P1	Alfort
BORRELIA	316	Berger Allemand	4,5 ans	F	28	P1	Alfort
	317	Beauceron	4 ans	М	39,6	P2	Alfort
	318	Bouvier Bernois	2,5 ans	M	48	P1	Alfort
	319	Hovawart	9 ans	F	36	P1	Alfort

Tableau VIII : Données épidémiologiques des cas séropositifs pour *Anaplasma phagocytophilum,*Ehrlichia canis et Borrelia burgdorferi

Pour *A. phagocytophilum*, on constate que l'on a **50%** (n=4) des individus séropositifs qui font partie de la population **P1** et la **même proportion** qui font partie de la population **P2**. Notons que l'on a retrouvé sur le cas 321 des tiques il y a moins de 10 jours.

L'âge moyen est de 4,6 ans alors que celui de l'échantillon total, de la population P1 et de la population P2 est de 6,7 ans (Tableau IX).

Concernant la race des individus séropositifs pour *A. phagocytophilum*, ils sont représentés par un **Colley**, un **Berger Belge Malinois**, un **Springer Spaniel** et un croisé **Labrador Retriever** (Tableau VIII), alors que dans l'échantillon total, on relève 91 races différentes, avec principalement des individus de race « croisée » (8,4%, n=320), des Labradors Retrievers et apparentés (croisés Labradors Retrievers)(7,2%, n=320), ainsi que des Yorkshire Terrier (4,4%, n=320), des Bergers Allemands (3,8%, n=320), des Bichons (3,4%, n=320), des Dobermans (3,4%, n=320), des Golden Retrievers (3,1%, n=320), des Cockers Spaniel Anglais (3,1%, n=320), des Bergers Belges Malinois (3,1%, n=320) et des Bouviers Bernois (2,8%, n=320)(Annexe 3).

En ce qui concerne le **sexe** des chiens séropositifs pour *A. phagocytophilum*, on observe **3 individus femelles** (75%, n=4) et **un seul individu mâle** (25%, n=4) contre une majorité de mâles dans l'échantillon total (55,3%, n=322), la population **P1** (54,4%, n= 248) et la population « témoin » **P2** (58,1%, n=74)(Tableau IX).

Enfin, le **poids moyen** des chiens séropositifs pour *A. phagocytophilum* est de **22,3 kg** (n=2) pour une moyenne de 21,8 kg (n=247) pour l'échantillon total, 22,2 kg (n=204) pour la population **P1** et 20,2 kg pour la population **P2** (n=43)(Tableau IX).

	AGE MOYEN (ans)	SEXE RATIO (M/F)	POIDS MOYEN (kg)
ANAPLASMA	4,6 (n=4)	1/3 (n=4) 75% F ; 25% M	22, 3 (n=2)
EHRLICHIA	9 (n=2)	1/1 (n=2) 50% F : 50% M	32 (n=1)
BORRELIA	4,3 (n=6)	4/2 (n=6) 33,3% F ; 66,7% M	35,5 (n=6)
Echantillon total (323 individus)	6,7 (n=317)	178/144 (n=322) 44,7% F ; 55,3% M	21,8 (n=247)
Population P1 (249 individus)	6,7 (n=247)	135/113 (n= 248) 45,6% F ; 54,4% M	22,2 (n=204)
Population P2 (74 individus)	6,7 (n=70)	43/31 (n=74) 41,9% F ; 58,1% M	20,2 (n=43)

Tableau IX : Age moyen, sexe ratio et poids moyen des individus séropositifs pour *Anaplasma* phagocytophilum, Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi, l'échantillon total et les individus des populations P1 et P2

B. Répartition géographique et saisonnière

1. Origine des échantillons sanguins inclus dans l'étude sérologique

a) Echantillon total

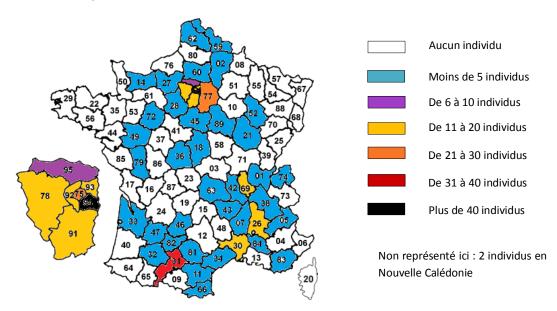


Figure 30 : Origine des échantillons sanguins de l'ensemble des chiens inclus dans l'étude (323 échantillons)

On constate que la répartition géographique de l'ensemble des cas inclus dans l'étude recouvre une grande partie du territoire, même si la plus grosse concentration d'individus se retrouve de façon logique concentrée dans les départements proches de ceux où se situent les écoles vétérinaires de Toulouse (31), Lyon (69) et Alfort (94)(Figure 30).

b) Population P1

La majorité des individus dont on avait une suspicion de maladie vectorielle recrutés dans la population **P1,** proviennent des départements d'Ile-de-France (32,1%, n=249), de Haute-Garonne (31) (16,1%, n=249), de Seine-et-Marne (77) (6,8%, n=249) et du Rhône (69) (6,4%, n=249)(Figure 31).

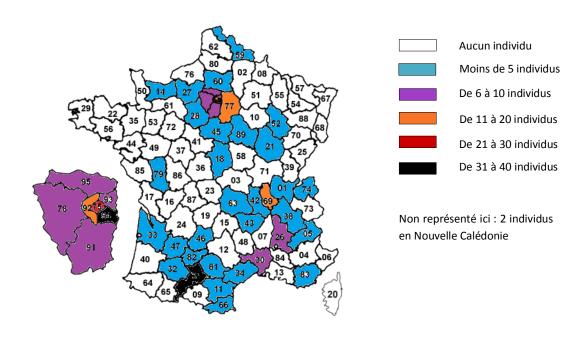


Figure 31 : Origine des échantillons sanguins des individus de la population P1 suspects de maladie vectorielle (249 échantillons)

c) Cas séropositifs au test 4Dx®

Les cas séropositifs pour *A. phagocytophilum* proviennent des départements de la **Drôme** (26) (cas 321), d'**Eure-et-Loir** (28) (cas 308), de **Paris** (75) (cas 309) et un cas provient de **Nouvelle-Calédonie** (988) (cas 320)(Figure 32).

Les deux cas séropositifs pour *Ehrlichia canis* proviennent respectivement du Val-De-Marne (94) (cas 322) et de la Haute-Garonne (31) (cas 323)(Figure 33). Enfin, parmi les six chiens séropositifs pour *Borrelia burgdorferi*, deux (33,3%, n=6) proviennent du Val-De-Marne (94) (cas 315 et 317), deux proviennent de l'Essonne (91) (cas 316 et 319) et les deux autres proviennent respectivement des départements d'Isère (38) et de l'Yonne (89) (cas 310 et 318)(Figure 34).

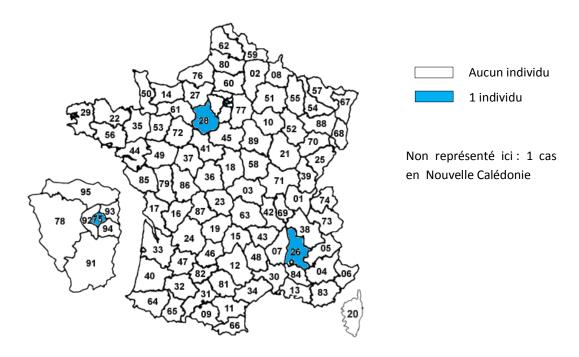


Figure 32 : Origine des échantillons sanguins des cas séropositifs pour *Anaplasma phagocytophilum* (4 échantillons)

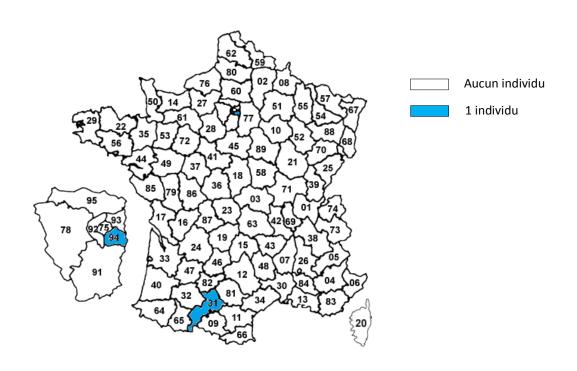


Figure 33 : Origine des échantillons sanguins des cas séropositifs pour *Ehrlichia canis* (2 échantillons)

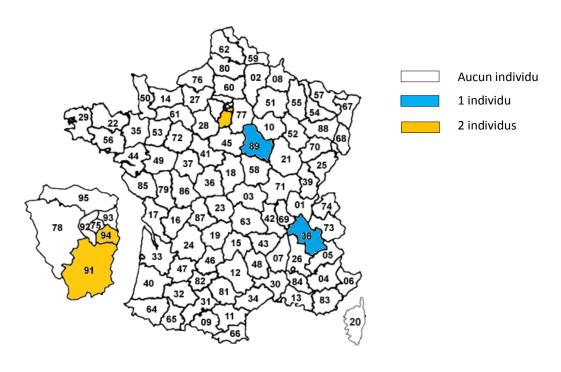


Figure 34 : Origine des échantillons sanguins des cas séropositifs pour *Borrelia burgdorferi* (6 échantillons)

2. Répartition saisonnière

a) Echantillon total et population P1

Parmi les 323 chiens recrutés dans l'échantillon total de l'étude, 48 (14,8%, n=323) ont été prélevés en mars 2011, 134 (41,5%, n=323) en avril 2011, 121 (37,5%, n=323) en mai 2011 et 20 (6,2%) en juin 2011 (Figure 35). On observe à peu près les mêmes proportions pour la population **P1** (respectivement 17,3%, 39,8%, 36,1% et 6,8%, n=249).

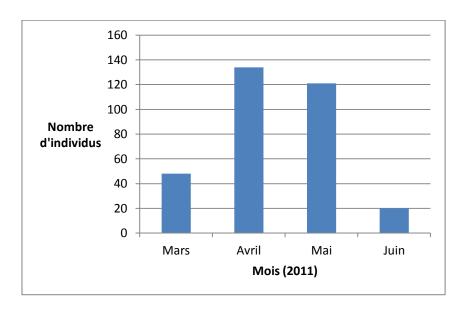


Figure 35 : Répartition des dates de prise de sang des 323 chiens inclus dans l'étude

b) Cas séropositifs au test 4Dx®

La prise de sang des quatre chiens qui sont revenus **séropositifs pour** *Anaplasma phagocytophilum* a été réalisée le **21 mars 2011** (cas 308) (25%, n=4), le **27 avril 2011** (cas 320) (25%, n=4), le **13 mai 2011** (cas 309) (25%, n=4) et le **29 juin 2011** (cas 321) (25%, n=4).

Les cas séropositifs pour *Ehrlichia canis* ont été diagnostiqués le 16 mars 2011 (cas 323) (50%, n=2) et le 21 avril 2011 (cas 322) (50%, n=2). Enfin, parmi les cas séropositifs pour *Borrelia burgdorferi*, 2 ont été diagnostiqués en mars 2011 (12/03 (cas 315) et 21/03 (cas 316)) (33,3%, n=6), 1 en avril 2011 (6/04 (cas 317)) (16,7%, n=6) et 3 en mai 2011 (10/05 (cas 310), 30/05 (cas 318) et 31/05 (cas 319)) (50%, n=6).

III. Analyse clinique

A. Symptômes

1. Cas séropositifs pour Anaplasma phagocytophilum

Sur les 4 cas séropositifs pour A. phagocytophilum lors du test 4Dx®, on constate que :

Un cas (cas 320) présentait de l'abattement soit 25% contre 39,8% dans l'échantillon total et 51,6% dans la population P1. Le même cas (25%) présentait également des anomalies au niveau cutané, contre 20,1% dans l'échantillon total et 19,9% dans la population P1. Un cas différent (cas 321) présentait des tiques depuis moins de 10 jours soit 25% contre 14,9% dans l'échantillon total et 15,3% dans la population P1. Un cas différent (cas 309) présentait des anomalies au niveau de l'appareil digestif (diarrhée) soit 25% contre 45,3% dans l'échantillon total et 51,8% dans la population P1.

Aucun cas ne présentait d'anomalies au niveau de l'appareil locomoteur (contre 23,4% dans l'échantillon total et 30,2% dans la population P1), cardio-vasculaire (contre 28,1% dans l'échantillon total et 29,9% dans la population P1) et pulmonaire (contre 27,2% dans l'échantillon total et 28,1% dans la population P1). Enfin, aucun cas ne présentait de phénomènes algiques contre 14,1% dans l'échantillon total et 12,6% dans la population P1 (Tableau X).

Remarque: Nous n'avons pas pu recueillir d'informations sur la température de ces individus. Pour ce critère, on observe que 20,1% des chiens de l'échantillon total présentait de la fièvre (> 39°C) et 19,9% dans la population **P1.**

2. Cas séropositifs pour Ehrlichia canis et Borrelia burgdorferi

En ce qui concerne les deux cas séropositifs pour *Ehrlichia canis*, seulement un cas (cas 323) présentait de l'abattement (50%), et un cas différent (cas 322) présentait des phénomènes algiques (douleur à la palpation abdominale) et des anomalies au niveau de l'appareil digestif (vomissements) soit 50% pour chaque anomalie (Tableau X).

Les 6 cas séropositifs pour *Borrelia burgdorferi* présentaient quant à eux d'avantage de symptômes cliniques : 2 cas sur 4 dont la température était connue (cas 310 et 316) avaient de la fièvre soit 50%, 3 cas sur 6 présentaient de l'abattement (cas 310, 315 et 316) soit 50% et 3 cas sur 6 présentaient des anomalies au niveau de l'appareil locomoteur (cas 310 (déficit proprioceptif au niveau du postérieur droit), 315 (anomalie non précisée), 318 (ataxie au niveau des deux antérieurs)) soit également 50% des individus séropositifs pour cet agent. On a également pu observer sur le cas 315 des tiques il y a moins de 10 jours (16,7%). Un cas sur 5 dont les données étaient connues (cas 318) présentait aussi des anomalies au niveau de l'appareil pulmonaire (polypnée)(20%) et deux cas sur 5 dont les données étaient connues au niveau du système digestif (cas 310 (vomissements et dysorexie) et 316 (vomissements et constipation)(40%). Le cas 310 présentait en outre de l'hématurie (Tableau X).

Population Symptômes	4 Dx > 0 Anaplasma	4 Dx > 0 Ehrlichia	4 Dx > 0 Borrelia	Echantillon total	P1 « population suspecte »	P2 « population témoin »
Fièvre (> 39°C) °C	Non connue	0 (0%, n=1)	2 (50%, n=4)	41,1% (n=214)	45,8% (n=192)	0% (n=22)
Abattement	1 (25%, n=4)	1 (50%, n=2)	3 (50%, n=6)	39,8% (n=322)	51,6% (n=248)	0% (n=74)
Anomalies de l'appareil locomoteur	0 (0%, n=4)	0 (0%, n=2)	3 (50%, n=6)	23,4% (n=321)	30,2% (n=248)	0% (n=73)
Anomalies de l'appareil cutané	1 (25%, n=4)	0 (0%, n=2)	0 (0%, n=5)	20,1% (n=264)	19,9% (n=221)	20,9% (n=43)
Présence de tiques (< 10 jours)	1 (25%, n=4)	0 (0%, n=2)	1 (16,7%, n=6)	14,9% (n=323)	15,3% (n=249)	13,5% (n=74)
Anomalies de l'appareil cardio- vasculaire	0 (0%, n=4)	0 (0%, n=2)	0 (0%, n=5)	28,1% (n=270)	29,9% (n=224)	19,6% (n=46)
Anomalies de l'appareil pulmonaire	0 (0%, n=4)	0 (0%, n=2)	1 (20%, n=5)	27,2% (n=268)	28,1% (n=224)	22,7% (n=44)
Anomalies de l'appareil digestif	1 (25%, n=4)	1 (50%, n=2)	2 (40%, n=5)	45,3% (n=269)	51,8% (n=226)	11,6% (n=43)
Phénomènes algiques	0 (0%, n=4)	1 (50%, n=2)	0 (0%, n=6)	14,1% (n=320)	12,6% (n=246)	0% (n=74)
Autres anomalies	0 (0%, n=4)	1 (50%, n=2) (épistaxis, splénomégalie)	1 (16,7%, n=6) (hématurie, dysorexie)			

Tableau X : Nombre de chiens (et pourcentage par rapport aux données connues de la population concernée) présentant des anomalies cliniques pour les cas séropositifs pour *Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi,* l'échantillon total, la population P1 et la population P2

B. Frottis sanguin

Le frottis sanguin a été réalisé pour 151 des chiens de l'échantillon total (46,7%, n=323). Des anomalies ont été retrouvées chez 60 individus (39,7%, n=151), dont 59 faisaient partie de la population suspecte **P1** et 1 chien faisait partie de la population **P2**.

En ce qui concerne *Anaplasma phagocytophilum*, aucun frottis sanguin n'a été réalisé pour les cas séropositifs au test 4Dx®, et aucune morula d'*A. phagocytophilum* ou d'*A. platys* n'a pu être observée parmi les frottis anormaux.

Un frottis sanguin a été réalisé pour les deux chiens séropositifs pour *Ehrlichia canis*, qui a révélé une leucocytose neutrophilique pour un cas (cas 322) et une anisocytose combinée à une polychromatophilie pour le deuxième cas (cas 323). Concernant les chiens séropositifs pour *Borrelia burgdorferi*, un frottis sanguin a été effectué pour 4 des 6 cas, et est revenu normal à chaque fois.

19 cas de babésiose à *Babesia canis* ont été mis en évidence par frottis sanguin, soit 12,6% (n=151) des individus pour lesquels un frottis sanguin a été réalisé. Tous ces cas faisaient partie de la population **P1** (critère clinique et/ou hématologique).

Des gamétocytes d'*Hepatozoon canis* ont pu être observés sur le frottis sanguin d'un chien (cas 276). Enfin on a pu mettre en évidence des éléments évoquant des leishmanies phagocytées sur le frottis sanguin du cas 314. Le reste des anomalies est constitué d'anomalies de forme (anisocytose) et de nombre des cellules sanguines. Une sphérocytose est rapportée dans 7 cas (4,6%, n=151).

IV. Analyse hématologique

Nous nous limiterons ici à l'analyse des critères de suspicion hématologique qui nous ont permis d'inclure les chiens dans la population **P1**, c'est-à-dire anémie, thrombopénie, leucopénie et neutropénie.

Sur les 4 cas séropositifs pour *A. phagocytophilum* lors du test 4Dx®, aucun ne présentait d'anémie contre 30,1% dans l'échantillon total et 39,2% dans la population **P1**. Un cas (cas 320, 25%) présentait une **thrombopénie** contre 26,3% dans l'échantillon total et 34,1% dans la population **P1**. Un autre cas sur les 3 dont les données étaient connues (cas 309, 33,3%) présentait une **neutropénie** contre 18,1% dans l'échantillon total et 23,5% dans la population **P1**. Aucun ne présentait de **leucopénie** contre 6,3% dans l'échantillon total et 8,3% dans la population **P1**. Enfin, en bilan, deux chiens (50%) présentaient **au moins une des quatre anomalies** contre 58,3% dans l'échantillon total et 77,1% dans la population **P1** (Tableau XI).

Concernant les deux individus séropositifs pour *Ehrlichia canis*, un seul (50%) présentait au moins une des quatre anomalies (cas 323 : anémie et thrombopénie). Enfin, quatre des six cas séropositifs pour *Borrelia burgdorferi* (66,7%) présentaient au moins une des quatre

anomalies recherchées : on a pu observer chez les cas 315 et 318 une anémie, chez le cas 310 une anémie et une thrombopénie et chez le cas 319 une thrombopénie (Tableau XI).

Population Anomalie	4 Dx> 0 Anaplasma	4 Dx > 0 Ehrlichia	4 Dx > 0 Borrelia	Echantillon total	P1 « population suspecte »
Anémie	0	1	3	30,1%	39,2%
(Hb < 12g/dL)	(0% <i>,</i> n=4)	(50%, n=2)	(50%, n=6)	(n=319)	(n=245)
Thrombopénie (Plaq < 150. 10 ³ /mm ³	1	1	2	26,3%	34,1%
	(25%, n=4)	(50%, n=2)	(40%, n=5)	(n=320)	(n=246)
Neutropénie	1	0	0	18,1%	23,5%
(PNN < 3. 10 ³/mm ³)	(33,3%, n=3)	(0%, n=2)	(0%, n=5)	(n=310)	(n=238)
Leucopénie (Leucocytes < 5.10³/mm³)	0 (0%, n=4)	0 (0%, n=2)	0 (0%, n=5)	6,3% (n=315)	8,3% (n=241)
Au moins une des 4 anomalies hématologiques	2 (50%, n=4)	1 (50%, n=2)	4 (66,7%, n=6)	58,3% (n=295)	77,1% (n=223)

Tableau XI: Nombre de chiens (et pourcentage par rapport aux données connues de la population concernée) présentant des anomalies hématologiques pour les cas séropositifs pour *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, l'échantillon total et la population P1

Chapitre 4. **D**iscussion

I. A propos de la sélection des cas

A. Critères cliniques et hématologiques de suspicion

Les critères cliniques et hématologiques que nous avons choisis pour l'inclusion des cas dans la population P1 sont les paramètres que l'on rencontre le plus fréquemment lors de maladies à transmission vectorielle chez le chien (CHABANNE et al. 2011). Pour l'anaplasmose en particulier, ils étaient cohérents, puisque selon les données de la littérature, une hyperthermie et un abattement sont rapportés dans plus de 75% des cas d'anaplasmose granulocytaire (GREIG & ARMSTRONG 2006; COHN 2003; HESELTINE et al. 2003) et des signes locomoteurs et de douleur musculo-squelettique dans plus de 50% des cas (POITOUT & CHABANNE 2004; GREIG & ARMSTRONG 2006; EGENVALL et al. 1997; CHABANNE et al. 2011). Des phénomènes algiques autres, notamment d'origine nerveuse, sont également possibles même si moins fréquemment rencontrés (POITOUT & CHABANNE 2004; GREIG & ARMSTRONG 2006; FOLEY et al. 2007; CHABANNE et al. 2011).

Concernant les paramètres hématologiques de suspicion choisis, ils sont également cohérents: en effet, d'après les données de la littérature, une **thrombopénie** serait rapportée dans 80 à 90% des cas d'anaplasmose granulocytaire (GREIG et al. 1996; EGENVALL et al. 1997; POITOUT et al. 2005; KOHN et al. 2008) et serait également très fréquente lors d'anaplasmose plaquettaire canine (DAVOUST & PARZY 1995). Une

lymphopénie serait présente dans 67% des cas d'anaplasmose granulocytaire (POITOUT & CHABANNE 2004), mais on peut aussi bien observer une neutropénie qu'une neutrophilie. Une leucopénie modérée et transitoire est possible lors d'infection à *Anaplasma platys* (BEAUFILS et al. 2002). Enfin, une **anémie** non régénérative normochrome et normocytaire serait décrite dans moins de 50% des cas d'anaplasmose granulocytaire (POITOUT & CHABANNE 2004).

B. Population « témoin » P2

Nous avons choisi d'inclure dans la population **P2** uniquement les individus de plus de un an, car les jeunes chiens de moins de un an sont bien moins souvent exposés aux tiques.

Les animaux en apparente bonne santé mais sur lesquels on a pu retrouver des tiques il y a moins de 10 jours ont également été inclus dans cette population. On peut s'interroger sur ce dernier point, la présence de tiques sur l'animal pouvant être considérée comme un critère de suspicion épidémiologique de maladie vectorielle transmise par les tiques. C'est un critère qui aurait donc pu être inclus dans le tableau de suspicion pour la population P1. De cette façon, la population « témoin » P2 aurait été plus représentative d'une population a priori saine et non porteuse de maladie vectorielle (même si pour l'anaplasmose granulocytaire, l'ehrlichiose monocytaire canine et la borréliose de Lyme par exemple, de nombreux cas peuvent être porteurs sains sur de longues périodes). Nous n'avons pas recherché quelle(s) espèce(s) de tiques étai(en)t présente(s) sur l'animal, mais cela aurait pu être intéressant d'un point de vue diagnostique pour se diriger soit d'avantage vers une anaplasmose granulocytaire (transmise par Ixodes ricinus) soit vers une anaplasmose plaquettaire canine (transmise par Rhipicephalus sanguineus) par exemple. Cependant, on ne peut pas exclure d'autres agents (phénomènes de co-infections des vecteurs, infestation concomitante ou antérieure par plusieurs espèces de tiques possibles) et il se peut que les tiques observées sur le chien soient distinctes de celles ayant effectivement transmis le ou les agents pathogènes.

C. A propos de la période et du lieu de recrutement des cas : répartition géographique et saisonnière

1. Répartition géographique

On constate que l'origine des échantillons sanguins inclus dans l'étude se concentre majoritairement autour des écoles vétérinaires d'Alfort, de Lyon et de Toulouse. Ceci peut représenter un biais d'étude, car de ce fait, les résultats ne sont pas représentatifs d'une séroprévalence de l'anaplasmose canine sur l'ensemble du territoire français. Certains départements où l'on a déjà pu rapporter des cas de séropositivité pour *A. phagocytophilum* n'étaient pas représentés : lors de l'étude de PANTCHEV et al. en 2009, également fondée sur l'utilisation du SNAP® test 4Dx®, plus de 6 cas ont par exemple été retrouvés dans le nord-est de la France, non représenté ici, de même pour les départements de Saône-et-Loire (71), de Corrèze (19), de Haute-Vienne (87), d'Indre-et-Loire (37) et des Bouches-du-Rhône

(13). Pour l'infection à *A. platys*, il semble que des cas aient été constatés sur le pourtour méditerranéen (DROUFFE 2007), assez peu représenté ici.

D'autre part, un cas a été retrouvé provenant de Nouvelle Calédonie (cas 320), et il est fort probable qu'il ait été exposé à *Anaplasma phagocytophilum* en dehors de la métropole.

2. Répartition saisonnière

On a centré notre période de recrutement sur les mois de Mars à Juin 2011 car c'est une période de l'année où les tiques sont actives et où l'on retrouve une grande incidence des maladies vectorielles dans notre pays (DROUFFE 2007). **C'est donc a priori la période la plus représentative de la prévalence de ces maladies en France**. On constate que d'avantage de chiens ont été recrutés au mois d'avril et au mois de mai 2011 par rapport aux mois de mars et juin (Figure 35). Cette observation peut être faite aussi bien au sein de la population suspecte **P1** que de la population « témoin » **P2** (6,8% en mars, 47,3% en avril, 41,9% en mai, 4% en juin, n=74). Il ne s'agit donc pas d'une répartition qui reflèterait une plus forte suspicion de maladies vectorielles au mois d'avril et de mai. Simplement, le recrutement a sans doute été plus actif sur cette période.

En ce qui concerne l'échantillonnage des cas séropositifs pour *A. phagocytophilum* (un cas recruté chaque mois), on ne peut conclure quand à une signification des données saisonnières, car les résultats positifs signifient que les individus ont été exposés à l'agent pathogène, mais cela a pu se produire à un autre moment de leur vie. De plus, il y a trop peu de cas pour pouvoir tirer des conclusions.

II. A propos de la méthode pour apprécier la prévalence des maladies vectorielles transmises par les tiques chez le chien en France

A. <u>Sérologie SNAP® test 4Dx® IDEXX</u>

L'utilisation du SNAP® test 4Dx® présente plusieurs intérêts: c'est d'abord un test rapide, facile à réaliser, et qui permet de tester en une seule manipulation le statut immunologique de l'animal pour quatre maladies (pour rappel : la dirofilariose canine, la borréliose de Lyme, l'ehrlichiose monocytaire canine et l'anaplasmose granulocytaire canine). De plus, il utilise des analytes peptidiques hautement purifiés qui permettent selon le laboratoire IDEXX d'obtenir une plus grande spécificité et une plus grande sensibilité que les techniques sérologiques traditionnelles utilisant des cellules infectées (IFI) ou des extraits de cellules (Western Blot). Selon la notice du test, la sensibilité pour *A. phagocytophilum* serait de 99,1% (95% CL 96,5%-100%) et la spécificité de 100% (95% CL 98%-100%)(Annexe 2B). Cependant, une note précise que cette spécificité est discutable, une réactivité croisée avec les anticorps dirigés contre *A. platys* ayant été rapportée. Aussi, les résultats sont à interpréter en fonction du contexte épidémiologique et clinique, particulièrement dans des zones d'endémie de l'anaplasmose plaquettaire canine. Néanmoins, la prévalence d'*A*.

platys étant a priori très faible dans notre pays (DROUFFE 2007), on peut considérer que le test est quasiment spécifique à A. phagocytophilum.

Par ailleurs, les SNAP® tests n'ont pas été réalisés par le même manipulateur dans chaque école, et il y a pu avoir de ce fait un biais de manipulation. Cependant, en suivant minutieusement la notice d'utilisation, celui-ci reste minime.

B. A propos des résultats de l'analyse sérologique

Les résultats obtenus grâce au test 4Dx® permettent de connaître le statut sérologique de chaque animal pour trois des agents testés⁶. Ici, nous avons réalisé **une seule sérologie** pour chaque chien inclus dans l'étude. Pour *A. phagocytophilum*, on a obtenu 4 individus séropositifs. Ce statut signifie qu'ils ont rencontré la bactérie à un moment de leur vie (jusqu'à 7 à 8 mois avant la prise de sang (durée de persistance moyenne des anticorps lors d'anaplasmose granulocytaire canine (POITOUT et al. 2005 ; GREIG & ARMSTRONG 2006))), mais pas forcément que l'infection est active. Cependant, parmi les chiens séropositifs pour *A. phagocytophilum*, deux (cas 309 et 320) faisaient partis de la population **P1** et un cas exprimait des symptômes cliniques couplés à des anomalies hématologiques (abattement et thrombopénie chez le cas 320). Les signes cliniques étant présents le plus souvent pendant la phase aigüe de la maladie (< 28 jours), il y a pour ces deux cas et à fortiori pour le cas 320 une plus forte probabilité que l'infection soit récente. En outre, là encore, la prévalence de l'anaplasmose granulocytaire étant assez faible en France (DROUFFE 2007), une sérologie fortement positive associée aux signes cliniques reste très évocatrice de la maladie.

Néanmoins, les études sérologiques préconisent d'effectuer une cinétique d'anticorps, à l'aide de deux sérologies à 10-15 jours d'intervalle, afin de mettre en évidence une augmentation de leur taux (séroconversion) et faciliter ainsi la distinction entre une infection contemporaine et une infection ancienne (pour laquelle le taux sérique peut même persister à un niveau stable jusqu'à deux ans dans certains cas d'anaplasmose granulocytaire (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012)). Dans notre étude, en réalisant une seule sérologie, outre le fait que les individus positifs ont pu contracter l'infection il y a plusieurs mois, il est probable que nous soyons passés à côté de chiens faux négatifs, c'est-à-dire des animaux en phase aigüe de la maladie, exprimant des symptômes cliniques mais n'ayant pas encore produit suffisamment d'anticorps. Ceci pourrait expliquer en partie la faible séroprévalence obtenue pour l'anaplasmose granulocytaire canine.

Enfin, on remarque qu'aucun cas de co-infection à *Borrelia burgdorferi* et *Anaplasma phagocytophilum* n'a été retrouvé sur cette base sérologique contrairement à la fréquence rapportée de co-infection des chiens avec ces deux agents dans la littérature (NIETO & FOLEY 2009).

-

⁶ Pour la dirofilariose canine, le test 4Dx met en évidence la présence d'antigènes.

C. PCR versus sérologie

La première limite des tests sérologiques 4Dx est qu'il s'agit uniquement de **tests de diagnostic indirect**. Si l'on avait voulu rechercher la **prévalence** de l'**infection** à *A. phagocytophilum*, il aurait été judicieux d'utiliser des méthodes de biologie moléculaire comme la **PCR**, qui est une méthode très sensible et relativement spécifique de la maladie permettant en outre une détection précoce et un diagnostic de certitude (DOMINGOS et al. 2011; GREIG & ARMSTRONG 2006; POITOUT & CHABANNE 2004). De plus, c'est une technique assez bien corrélée à l'expression clinique de l'infection (KOHN et al. 2008).

L'avantage majeur des techniques de biologie moléculaire par rapport à la sérologie est qu'elles permettent de faire la distinction entre *A. phagocytophilum* et *A. platys*. Ce sont des outils intéressants pour caractériser non seulement la nature de l'agent mais aussi la souche en cause, son potentiel zoonotique et son pouvoir pathogène, qui peut varier en fonction notamment de la zone géographique (les souches nord-américaines semblent plus pathogènes que les souches européennes) et de l'hôte infecté (STUEN et al. 2003; GREIG & ARMSTRONG 2006; BARBET et al. 2006; DINIZ & BREITSCHWERDT 2012).

Exemple d'application

En France, en 2011, DOMINGOS *et al.* ont caractérisé pour la première fois *A. phagocytophilum* à l'aide du séquençage du gène de l'ARNr 16S et du gène *AnkA* chez deux chiens, un Beauceron de deux mois et demi et une Cocker Spaniel de six ans. Ils ont mis en évidence une seule souche de la bactérie chez chaque chien et ont montré, via une analyse phylogénétique basée sur le gène *AnkA*, une relation étroite entre ces isolats et ceux de la majorité des souches européennes humaines et animales. La souche mise en évidence était cependant distincte des souches américaines, espagnoles et norvégiennes. Enfin, ces auteurs appuient la nécessité de croiser les données obtenues par le séquençage de gènes différents (*ARNr 16S, AnkA, gltA, groESL*), afin d'obtenir le maximum d'informations possible pour caractériser les isolats d'*A. phagocytophilum*.

III. A propos de l'analyse épidémiologique : population canine séropositive lors du test sérologique 4Dx

Les résultats présentés dans cette étude décrivent les caractéristiques épidémiologiques des chiens séropositifs lors du test 4Dx. Cependant, compte tenu du faible nombre d'individus, aucune conclusion sur une éventuelle prédisposition d'âge, de race ou de sexe ne peut être avancée.

En ce qui concerne les individus séropositifs pour *A. phagocytophilum* en particulier, on n'observe aucune prédominance raciale, conformément à ce qui a été décrit dans des études antérieures (GREIG et al. 1996; POITOUT et al. 2005; KOHN et al. 2008). Les plus fortes proportions raciales observées dans l'échantillon total et dans la population **P1**

(Labrador, Berger Allemand, Golden Retriever, « Croisés », Bouvier Bernois, Bichon, Berger Belge Malinois, Cocker Spaniel Anglais par ordre décroissant du nombre d'individus (Annexe 4)) reflètent a priori d'avantage les races appréciées par la population française qu'une prédisposition raciale concernant les maladies à transmission vectorielle chez le chien.

Concernant le sexe des individus séropositifs pour *A. phagocytophilum*, on observe une majorité de femelles (75%, n= 4). Cependant, on rappelle que l'on a un nombre d'individus trop faible pour tirer des conclusions quant à une prédisposition sexuelle. Les études antérieures ne rapportent d'ailleurs aucune prédisposition (POITOUT & CHABANNE 2004). A contrario, concernant la population « suspecte » de maladies vectorielles **P1**, on peut observer une plus forte proportion de mâles (54,4%, n=248) que de femelles, ainsi que pour les individus séropositifs pour *Borrelia burgdorferi* (66,7%, n=6). Pour l'infection à *A. platys*, une étude avait également rapporté une plus grande fréquence d'infections des mâles, mais il y avait là aussi trop peu de cas pour tirer des conclusions (HARRUS et al. 1997). Ces observations nécessitent donc d'autres études pour être démontrées.

Enfin, l'âge moyen des quatre cas séropositifs pour *A. phagocytophilum* dans cette étude est de 4,6 ans (n=4). C'est un peu plus jeune que celui décrit habituellement qui est de 6-8 ans (GREIG et al. 1996; POITOUT et al. 2005; KOHN et al. 2008; EGENVALL et al. 1997).

<u>Remarque</u>: Nous n'avons pas pu analyser les données concernant le lieu de vie habituel des animaux (région urbaine, campagne, intérieur exclusivement ou avec accès à l'extérieur), leur déplacements éventuels dans d'autres régions ou leur traitement antiparasitaire préventif car trop peu de données ont été renseignées à ce sujet.

IV. A propos de l'analyse des critères cliniques et hématologiques

A. Anomalies cliniques

On remarque que l'on a autant d'individus séropositifs pour *A. phagocytophilum* qui appartiennent à la population « suspecte » de maladies vectorielles **P1** qu'à la population « témoin » **P2**, ce qui illustre la difficulté d'établir une suspicion pour cette maladie, comme cela a déjà pu être constaté auparavant : les chiens expriment peu l'infection, le plus souvent inapparente ou bénigne (CARRADE et al. 2009 ; COCKWILL et al. 2009 ; EGENVALL et al. 1997). Il est cependant regrettable que nous n'ayons obtenu aucune information concernant la température rectale pour les cas séropositifs au test 4Dx. Compte tenu du faible nombre de cas supposés infectés par *A. phagocytophilum* (cas 320 et 309), nous pouvons difficilement comparer les proportions d'individus présentant de l'abattement, des problèmes locomoteurs ou des phénomènes algiques avec les proportions décrites pour les chiens infectés dans la littérature.

D'autre part, dans la population « témoin » **P2**, il est normal de ne retrouver aucun chien ne présentant de la fièvre, de l'abattement, des anomalies au niveau de l'appareil locomoteur ou des phénomènes algiques, puisqu'il s'agissait des critères de suspicion clinique pour inclure les chiens dans la population **P1**.

Concernant ensuite les autres anomalies cliniques recherchées (présence de tiques il y a moins de 10 jours, lésions cutanées, anomalies du système cardio-vasculaire, pulmonaire ou digestif), on peut s'interroger sur leur cohérence dans le cadre de notre étude sur les maladies vectorielles canines : rentrent-elles dans la suspicion de telles infections ? Si l'on compare les effectifs présentant chacune de ces anomalies entre la population **P1** et la population **P2** et que l'on recherche une corrélation significative de chacune d'entre elles avec le caractère « suspicion », à l'aide d'un test du Chi 2 d'indépendance, on trouve une corrélation significative uniquement entre le caractère « suspicion de maladies vectorielles » et les anomalies digestives (p-value= 2,9. 10 ⁻⁶). Cependant, les effectifs faibles incitent à rester prudents face à ces résultats. A noter que dans un petit nombre de cas de maladies vectorielles à bactéries hémotropes, des signes cardio-vasculaires, respiratoires, digestifs ainsi que des lésions cutanées ont effectivement été rapportés dans la littérature (GREIG et al. 1996 ; POITOUT & CHABANNE 2004 ; POITOUT et al. 2005 ; GREIG & ARMSTRONG 2006 ; CARRADE et al. 2009 ; TOZON et al. 2003 ; CHABANNE et al. 2011).

On aurait également pu rechercher de façon plus systématique des signes hémorragiques (épistaxis, pétéchies, méléna) qui peuvent survenir lors d'anaplasmose granulocytaire et plaquettaire (CARRADE et al. 2009; DROUFFE 2007). Une polyadénomégalie est parfois rapportée lors d'anaplasmose plaquettaire et plus généralement lors de maladie vectorielle à bactéries hémotropes (BEAUFILS 2004; CHABANNE et al. 2011; HARVEY 2012). Dans notre étude, celle-ci a été mentionnée en « commentaire » dans 8,4% (n=249) des cas de la population P1. Enfin, des signes oculaires (chassie mucopurulente, lésions d'uvéite, lésions du segment postérieur) et urinaires (signes d'hémolyse, protéinurie) sont aussi décrits lors de maladie vectorielle à bactéries hémotropes (CHABANNE et al. 2011) et auraient pu être recherchés plus spécifiquement dans cette étude.

B. Anomalies hématologiques

Nous n'avons pas pu réaliser d'analyse des données biochimiques car nous n'avions pas assez de données renseignées. Il aurait pourtant été intéressant dans le cadre de l'anaplasmose granulocytaire canine de suivre une augmentation des enzymes hépatiques et notamment des **phosphatases alcalines**, ainsi qu'une éventuelle **hypoalbuminémie**, hyperglobulinémie et diminution de l'urémie parfois décrites dans cette affection (DINIZ & BREITSCHWERDT 2012; GREIG et al. 1996; GRAVINO et al. 1997; EGENVALL et al. 1997; POITOUT et al. 2005). De même, lors d'une infection à *A. platys*, une légère hypoalbuminémie et hyperglobulinémie est possible (HESELTINE et al. 2003; HARVEY 2012).

Là encore, le nombre de cas supposés infectés par *A. phagocytophilum* (cas 320 et 309) étant très faible, nous ne pouvons pas comparer de façon significative les proportions d'individus présentant des anomalies hématologiques avec celles décrites pour les chiens infectés dans la littérature. Enfin, notons que les prises de sang ont été réalisées sur trois sites différents, et pas forcément avec un analyseur identique, ce qui a pu constituer un léger biais dans l'étude de ces anomalies hématologiques.

V. A propos de la similitude Anaplasmose/Borréliose de Lyme

Une publication récente a réalisé une comparaison de l'anaplasmose granulocytaire et de la maladie de Lyme chez le chien (CHABANNE & BOULOUIS 2012) et s'est interrogée sur le degré de similitude entre ces deux maladies. Il est vrai qu'elles sont transmises par le même vecteur *Ixodes ricinus* en France, et présentent ainsi une distribution géographique similaire. De plus, les animaux infectés présentent le plus souvent dans les deux cas des symptômes peu spécifiques, et sont fréquemment asymptomatiques. Le traitement est lui aussi similaire et fait appel à la doxycycline.

La publication met cependant en avant les particularités propres aux deux maladies : agents et durée de traitement différents, méthodes de diagnostic pas toujours équivalentes, expression clinique, lorsqu'elle survient, pas exactement identique: atteinte oligoarticulaire, lésions d'arthrite chronique non érosive (lors d'infection prolongée), signes d'atteinte rénale grave (néphropathie de Lyme), dysfonctionnements cardiaques, anomalies neurologiques centrales pour la maladie de Lyme; syndrome pyrétique, signes articulaires, thrombopénie, lymphopénie, lymphocytose relative, anémie modérée normocytaire et normochrome, polyadénomégalie, splénomégalie, symptômes respiratoires et gastrointestinaux, troubles neurologiques centraux, épistaxis, hypoalbuminémie, hyperglobulinémie, augmentation des phosphatases alcalines pour l'anaplasmose granulocytaire (cf. Part 1. Chap. 2. II. A.). De plus, ces signes cliniques ont tendance à apparaitre de façon plus tardive pour la maladie de Lyme (2 à 5 mois) que pour l'anaplasmose granulocytaire (1 à 2 semaines).

Dans ce contexte de confusion parfois possible entre les deux maladies, notre étude, malgré le peu d'individus concernés, met en évidence une séroprévalence plus élevée pour Borrelia burgdorferi que pour Anaplasma phagocytophilum (1,9% contre 1,2%). Même si a priori la présence d'anticorps anti-C6 pour B. burgdorferi et anti-p44/Msp2 pour A. phagocytophilum n'est pas corrélée à l'apparition de signes cliniques et hématologiques (CHABANNE & BOULOUIS 2012), on peut tout de même constater de façon descriptive que les cas séropositifs pour B. burgdorferi, par rapport à ceux séropositifs pour A. phagocytophilum, sont plus nombreux à présenter de la fièvre (33,3% contre aucun des individus séropositifs pour A. phagocytophilum), de l'abattement (50% contre 25%), des anomalies au niveau de l'appareil locomoteur (50% contre aucun des individus séropositifs pour A. phagocytophilum), de l'appareil pulmonaire (16,7% contre aucun de ceux séropositifs pour A. phagocytophilum) ou de l'appareil digestif (33,3% contre 25%). A contrario, 25% des individus séropositifs pour A. phagocytophilum possèdent des lésions

cutanées contre aucun de ceux séropositifs pour *B. burgdorferi* (Tableau X). Ces observations montrent que les individus séropositifs pour chacun des agents présentent un tableau clinique distinct et soulignent donc l'importance de ne pas confondre les deux maladies et de réaliser un diagnostic étiologique précis.

VI. Bilan sur l'étude de la séroprévalence des maladies vectorielles transmises par les tiques chez le chien en France

Plusieurs facteurs peuvent expliquer que l'on ait eu un faible nombre de cas séropositifs à *A. phagocytophilum* (1,2%) comparé à l'étude sérologique réalisée en 2009 par PANTCHEV et al., basée sur le même test diagnostic et qui rapportait une séroprévalence de 2,72%:

- Un **biais de manipulateur** pour la réalisation du test 4Dx a pu avoir lieu, celui-ci étant différent dans chaque école.
- La **répartition géographique** de l'échantillon d'étude n'était pas forcément idéale pour refléter l'ensemble du territoire français: les cas étaient principalement regroupés autour des écoles vétérinaires et certains départements où l'on a déjà décrit des cas séropositifs pour *A. phagocytophilum* et *A. platys* n'étaient pas représentés.
- Des individus **faux négatifs** ont pu être présents, car certains chiens ont pu contracter l'infection très peu de temps avant la prise de sang et dans ce cas, les anticorps n'étaient pas encore présents : d'où l'intérêt de réaliser une double sérologie à 15 jours d'intervalle pour mettre en évidence une séroconversion. Dans ce contexte, il aurait également été judicieux pour chaque cas de réaliser une PCR : celle-ci reste l'outil diagnostic le plus pertinent pour détecter une infection précoce (EGENVALL et al. 1998 ; EGENVALL, LILLIHÖÖK et al. 2000). De plus, cela aurait permis de faire la distinction entre *A. phagocytophilum* et *A. platys*.
- Il aurait aussi été intéressant de réaliser un frottis sanguin de façon systématique pour optimiser le diagnostic et préciser le moment de l'infection: les morulae apparaissent dès 4 jours post-inoculation, persistent jusqu'à 8 jours (EGENVALL et al. 1998; GREIG & ARMSTRONG 2006; CARRADE et al. 2009) et précèdent de quelques jours l'apparition des anticorps. Dans le cas d'un frottis positif et d'une sérologie positive nous aurions donc pu déterminer si le chien était atteint ou non de la maladie.

Certaines données n'ont malheureusement pas pu être exploitées, faute de renseignements pour une majorité des cas de l'échantillon d'étude (biochimie, milieu de vie, déplacements dans d'autres régions, date du dernier traitement antiparasitaire). Les paramètres biochimiques ont été renseignés à partir du logiciel Clovis®, lorsque leur analyse avait été entreprise au cours de la consultation. Nous aurions pu la réaliser de façon systématique grâce un prélèvement sanguin sur tube hépariné.

De plus, un test sérologique positif pour *A. phagocytophilum* n'équivaut pas à l'existence de cet agent dans une région spécifique mais reflète seulement une exposition antérieure du chien à cet agent à un certain moment et endroit de sa vie. Pour cette raison, il est effectivement dommage que très peu de renseignements aient été disponibles concernant le milieu de vie et le déplacement éventuel dans d'autres régions des individus de notre échantillon d'étude.

Concernant les autres agents transmis par les tiques chez le chien, on constate dans cette étude que la piroplasmose canine à *Babesia canis* reste la maladie vectorielle la plus fréquemment diagnostiquée avec un taux de prévalence de 5,9% (n=323)(19 cas mis en évidence par frottis sanguin). Deux cas sont revenus séropositifs pour *Ehrlichia canis* soit une séroprévalence de 0,6 % et 6 cas pour *Borrelia burgdorferi*, soit une séroprévalence de 1,9%. Ces valeurs, bien que faibles, sont en augmentation par rapport à celles que rapportaient PANTCHEV et al. en 2009 (respectivement 0,33% et 1,09%) et semblent présager de l'importance que sont en train de prendre ces maladies en France. On note également la mise en évidence d'un cas d'hépatozoonose canine.

CONCLUSION

Les anaplasmoses, anciennement confondues avec les ehrlichioses chez le chien, sont des maladies de description relativement récente en France. Elles sont causées par des bactéries du genre *Anaplasma*, Ordre des Rickettsiales, Famille des *Anaplasmataceae*, qui sont des agents pathogènes vectorisés transmis par la morsure de tiques dures. Ces bactéries Gram négatives, intracellulaires strictes, infectent les cellules matures ou immatures du système hématopoïétique, notamment les leucocytes, les thrombocytes ou les érythrocytes des mammifères. Chez le chien, deux espèces ont un pouvoir pathogène reconnu :

Anaplasma phagocytophilum infecte préférentiellement les granulocytes neutrophiles. Elle est transmise par des tiques du genre *Ixodes* (*Ixodes ricinus* en Europe) et est responsable de l'anaplasmose granulocytaire, une maladie pouvant toucher de nombreux mammifères, dont le chien, le chat, le cheval, les ruminants et l'homme.

Anaplasma platys infecte les thrombocytes. Elle est transmise par la tique brune du chien Rhipicephalus sanguineus et est responsable de la thrombopénie infectieuse cyclique, maladie connue chez le chien uniquement.

Les anaplasmoses canines, comme nombre de maladies transmises par les arthropodes piqueurs hématophages, représentent désormais un enjeu fort qui préoccupe épidémiologistes et acteurs de la santé humaine comme vétérinaire en raison d'une augmentation de leur incidence depuis plusieurs décennies, surtout dans les zones tempérées de l'hémisphère Nord. Si certaines de ces maladies sont de diagnostic clinique assez aisé, ou tout au moins bien codifié et connu de tous comme la piroplasmose canine, d'autres le sont moins, en particulier les anaplasmoses. Du fait de la difficulté du diagnostic, peu de données sont disponibles quant à leur prévalence en France. Par conséquent, leur implication dans certains syndromes et signes cliniques est très probablement sous-évaluée.

Depuis le début des années 2000, un certain nombre d'études ont été initiées pour évaluer la circulation de ce type d'agents pathogènes, notamment au sein des populations de tiques. Notre travail se présente comme une contribution à l'étude des infections à *Anaplasma sp.* chez le chien en France. Se situant dans le cadre d'une étude plus vaste initiée par les laboratoires Bayer®, notre travail a permis d'évaluer la séroprévalence de ces infections à partir de chiens présentés en consultation dans les Ecoles vétérinaires françaises d'Alfort, de Lyon et de Toulouse. Les résultats obtenus sont en faveur d'une faible séroprévalence (1,2%), dont l'interprétation doit toutefois être pondérée en raison d'un certain nombre de biais et de difficultés rencontrées au cours de l'étude (notamment effectif faible, période limitée sur l'année, non représentation de l'ensemble du territoire).

Le Président de la thèse

Professeur P. KROLAK-SALMONI
Hospices Civils de Lvon
Hôpital des Charpennes
27 rue Gobriel Péri
69100 Villeurbanne

Lyon, le 16 NOV. 2012

Pour le Président de l'Université,

Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,

Professeur F.N GILLY

Par délégation
Pr F. Grain - DEVI

VetAgro Sup

Campus Vétérinaire

Annexe 1 : feuille de données standardisée pour chaque cas inclus dans l'étude experimentale

Etude Baye Prévalence			BHCFR025 ctorielles canine	es	BAYER	Bayer I Animal I	HealthCare Health
Identification	du chie	n ⅓ %:		N°de cas			
Site de recrutement :			☐ Alfort ☐ Lyon	□ Nantes □	Toulou	se	
Nom du chien							***
Code postal du	propriétai	re		THE CONTRACT CONTRACT			
N° de dossier			1 11 11	1	42 10		
Date de la prise	de sang	(EDTA)	<u> </u>	(jjmmaa)			
Critères d'inc	lusion p	our test 4	IDX : Prise de sang	(tube EDTA) fa	ite sur c	hien P1 d	ou P2:
Population			Suspicion de maladie				Population témoin
116	TI A 4		ins 1 critère suivant	rempli: U		de chie	ns > 1 an avec U
Hématologie	☐ Thron ☐ Neutr	nbopénie (I opénie (PN pénie (Leu	2 g/dL) et/ou Num. Plaq.< 150 .′ IN<3.10³/mm³) et/ icocytes<5.10³/mn	ou	u	☐ Form normale	ule sanguine et/ou
Frottis	☐ Babes		rula d'Anaplasma				
sanguin Clinique	☐ Autre ☐ Fièvre		☐ Abatteme	unt ot	/ou	☐ Présence d'une tique	
Cililique	☐ Boiter		s locomoteurs et/		Jou	sur l'animal	
→ Veuillez e	nsuite: 0	Compléte	r les données qui s est 4DX (sur le rest		ent sar	nauin)	
Anamèse / in			rnant le chien			gann	34.74
	ovis ; notez	ND= Non L	Disponible en l'abser	nce de données)			
Race:			Sexe:		_м с	1 F	
Antécédents pa	thologiqu	es?	COXO .			- 1	
si oui préciser 🕻				1			
		ine 🗆 Camp	pagne Déplacements dans nent (sortie en laisse) régions ? si oui Préc				
vie ¬		r exclusiven r et dehors		quand : 3	11 1 10013	iei oa a	ou nom du pays .
		plupart du te	emps				
Date et nom du antiparasitaire e			Traité le		(jjmma	ıa)	
Commentaire							
		Land design			72.7	w	
Température re		arai (voir di	onnées Clovis ; note	Poids (kg)	ornible e	an i abser	ice de données)
remperature i	ectate						
Peau			normal 🗆 Lésions		te) ⊃		
			ence de □ tiques □ Puces □ Autre:				
Appareil ☐ Normal ☐ Anormal (Ex. rythme, souffle) つ							
			mal □ Anormal •				
			II □ Anormal (ex. diarrhée, autre,) ⊃				
Appareil locomoteur ☐ Normal ☐ Anormal (ex. douleur, trouble articulaire,) ⊃					•		
Comportement 🗆 I		☐ Normal	nal □ Anormal (ex . Abattement) つ				
Autre / commer	ntaire					out Ho	,

Tél. Moniteur: 01.49.06.57.72 / 06 20 60 80 71

Contacts: christophe.lesueur@bayer.com, sandy.limousin@bayer.com

Fax. Moniteur: 01.49.06.58.48

Page 1 /2

Etude Bayer Santé/ ENV- N° BHCFR025 Prévalence des maladies vectorielles canines



Identification du chien		N°de cas		
	Examens	complén	nentaires :	
Frottis sanguin : □ No	n effectué □ Fffe	ectué : comi	oléter SVP ()	
	omalie visible ⊃	☐ Babesi		□ Sphérocytose notable
		a construction		
Analyse hématologiqu				
Paramètres	Mes	ure	V.U.	Unités
Erythrocytes			5,5-8,5	millions/mm³
Hémoglobine			12-18	g/100 ml
Hématocrite			37-55	%
Volume globulaire moyen (VGM)			66-77	fl
CCMH (Conc Moyen en F	lg)		20-25	μg/globule
Réticulocytes			0,1-1,5	% des érythrocytes
Leucocytes			6-18	10 ³ /ml (leucopénie si <5.10 ³ /mm ³)
Neutrophiles			60-75	% (neutropénie si <3.10 ³ /mm ³)
Eosinophiles			. 2-6	%
Lymphocytes			12-30	%
Monocytes			3-10	%
Numération plaquettaire)		150-400	10 ³ /mm ³
Biochimie sanguine:				
Paramètres	Mes	ure	V.U.	Unités
ALAT			< 30	UI/I
Phosphatase alcaline (PA	L)		30-120	UI/I
Bilirubine totale			1-6	mg/100ml
Créatinine			10-20	mg/l
Urée			0,2-0,5	g/l
Glucose			0,7-1,1	g/l
Protéines totales			54-71	g/l
Albumine			23-32	g/l
Globulines			27-44	g/l
Fer			90-120	µg/100 ml
Autres analyses : □ N	on effectuées □	Effectuées	; complèter S\	/P O
Test de Coombs	direct 🗀	Positif	□ Négati	f
Auto-agglutination per milieu salin	sistante en	Présence	☐ Absend	ce ou non constatée
Résultat du test 4DX :	- 1	era sept capity		
Anaplasma	Positif D	Végatif	Ehrlichia	☐ Positif ☐ Négatif
Borrelia		Végatif	Dirofilaria	☐ Positif ☐ Négatif
Commentaire/		-cyaiii	Diromana	L 1 Ositii L Negatii
conclusion:				0.000
Nom/ Signature de la				
personne ayant rempli la			Date :	II fl F
fiche:				(jjmmaa)

ANNEXE 2 (A): LE SNAP® TEST 4Dx® D'IDEXX

Principe du test

Diagnostic in vitro pour la détection d'antigènes de *Dirofilaria immitis* (HW) et d'anticorps contre *Anaplasma phagocytophilum* (AP), *Borrelia burgdorferi* (LY) et *Ehrlichia canis* (EC) dans le sérum, le plasma ou le sang entier canin.

Précautions et mises en garde

- Tous les déchets doivent être décontaminés comme il se doit avant leur mise au rebut.
- Ne pas mélanger les composants des trousses comportant des numéros de lots différents.
- Ne pas utiliser le dispositif SNAP s'il a été activé avant que n'y soit ajouté l'échantillon

Conditions de conservation

- Conserver entre 2–8°C jusqu'à la date de péremption.
- Les dispositifs SNAP et les réactifs peuvent être conservés à la température ambiante (18–25°C) pendant 90 jours ou jusqu'à la date de péremption figurant sur l'emballage, en privilégiant la première de ces deux dates.
- Dès que les dispositifs SNAP et réactifs ne sont plus maintenus à une température de 2–8°C pendant plus de 24 heures, la date de péremption est de 90 jours ou la date figurant sur l'emballage, en privilégiant la première de ces deux dates. Si la date de péremption de 90 jours survient avant la date de péremption figurant sur l'emballage, noter la nouvelle date dans l'espace prévu à cet effet sur la trousse.

Composants de la trousse

Article	Réactif	Volume			
1	1 flacon de conjugué anti-HW/AP/LY/EC: HRPO	7,0 ml			
2	Dispositif SNAP	5, 15 ou 30			
Chaque dispositif SNAP contient 0,4 ml de solution de lavage et 0,6 ml de solution de substrat.					
Autres composants: pipettes de transfert, tubes d'échantillon, et support à réactifs					

Informations concernant les échantillons

- Les échantillons doivent être amenés à la température ambiante (18-25°C) avant d'effectuer le test.
- Il est possible d'utiliser du sérum, plasma ou sang entier anticoagulé (par ex., EDTA, héparine), frais ou conservé entre 2–8°C pendant une période d'une semaine maximum.
- Pour une durée de conservation supérieure, il est possible de congeler le sérum ou le plasma (-20°C ou en dessous) et de le centrifuger à nouveau avant l'emploi.
- Des échantillons hémolysés ou lipémiques n'affecteront pas les résultats.

Source: Notice d'utilisation du test 4Dx® IDEXX

ANNEXE 2 (B): LE SNAP® TEST 4Dx® D'IDEXX

Procédure du test



1. Transférez 3 gouttes d'échantillon et 4 gouttes de conjugué dans un tube à échantillon jetable.



2. Retournez doucement le 3. Versez la totalité du tube à échantillon 4 à 5 fois pour le mélanger.



contenu du tube à échantillon dans le puits échantillon d'un dispositif SNAP8.



4. Dès qu'une coloration apparaît dans le cercle d'activation, appuyez fermement pour activer le dispositif, Vous entendez alors distinctement un petit bruit sec (« snap » en anglais).



5. Lisez les résultats du test 8 minutes après l'activation.

Témoin de l'échantillon bleu

Toute apparition de coloration dans le témoin de l'échantillon indique un résultat positif. (Le Test SNAP cPL est la seule exception parce qu'il fournit des résultats comparatifs)

Sensibilité et spécificité du test

Test comparatif	Taille de l'échantillon		Туре	Sensibilité et spécificité relatives	Statistique			
	Test SNAP 4Dx/Test de référence		d'échantillon	limites de confiance à 95%	Карра			
	+/+	-/+	+/-	-/-	Total			
HTWM1,2	118	1	0	236	355	Sérum	Sens., 99,2% (95% CL 94,8%-100%)	0,99
							Spéc., 100% (95% CL 98%-100%)	
A.	217	2	0	236	455	Sérum	Sens., 99,1% (95% CL 96,5%-100%)	0,99
phagocytophilum3							Spéc., 100% (95% CL 98%-100%)	
B. burgdorferi5	166	2	0	236	404	Sérum	Sens., 98,8% (95% CL 95,4%-99,9%)	0,99
							Spéc, 100% (95% CL 98%-100%)	
E. canis4	100	4	0	236	340	Sérum	Sens., 96,2% (95% CL 90,1%-98,8%)	0,97
							Spéc, 100% (95% CL 98%-100%)	

Référence : 1Référence 2PetChek 3A. phagocytophilum IFA/Western Blot 4E. canis IFA/Western Blot 5B. burgdorferi IFA/Western Blot La sensibilité et la spécificité sont basées sur l'interprétation visuelle des résultats SNAP. LC = limites de confiance

Source: Site internet d'IDEXX: http://www.idexx.fr/html/fr_fr/smallanimal/inhouse/snap/4dx.html

ANNEXE 3: LES DIFFERENTES RACES REPRESENTEES DANS L'ECHANTILLON TOTAL

Race	Nombre d'individus	% (n=320)
Aidi	1	0,3
Airedale Terrier	1	0,3
Akita Inu	1	0,3
American Staffordshire Terrier	5	1,6
Beagle	4	1,3
Boarded Collie	3	0,9
Beauceron	4	1,3
Berger	2	0,6
Berger Allemand	12	3,8
Berger Australien	3	0,9
Berger Belge Malinois	10	3,1
Berger Belge Tervuren	1	0,3
Berger Blanc Suisse	2	0,6
Berger des Pyrénées	5	1,6
Berger Polonais	1	0,3
Bichon	11	3,4
Bobtail	1	0,3
Border Collie	7	2,2
Boston Terrier	1	0,3
Bouledogue Français	7	2,2
Bouvier Bernois	9	2,8
Boxer	3	0,9
Braque Allemand	3	0,9
Braque De Weimar	3	0,9
Braque Hongrois	1	0,3
Bull Terrier	3	0,9
Bulldog	3	0,9
Bullmastiff	1	0,3
Cairn Terrier	2	0,6
Cane Corso	2	0,6
Caniche	5	1,6
Carlin	2	0,6
Cavalier King Charles Spaniel	4	1,3
Chien de chasse	9	2,8
Cocker Américain	5	1,6
Cocker Spaniel Anglais	10	3,1
Colley	3	0,9
Coton de Tulear	2	0,6
"Croisé"	12	3,8
Croisé Berger	1	0,3
Croisé Berger Allemand	1	0,3
Croisé Berger de Beauce	1	0,3

Croisé Bichon	1	0,3
Croisé Border Collie Fox Terrier	1	0,3
Croisé Caniche	1	0,3
Croisé Caniche Lhassa Apso	1	0,3
Croisé Cavalier King Charles Spaniel	1	0,3
Croisé Chien de Montagne des Pyrénées	1	0,3
Croisé Dogue de Bordeaux	1	0,3
Croisé Epagneul	1	0,3
Croisé Fox Terrier	1	0,3
Croisé Golden Retriever	1	0,3
Croisé Griffon	2	0,6
Croisé Labrador Golden Retriever	1	0,3
Croisé Labrador Retriever	13	4,1
Croisé Malinois	1	0,3
Croisé Saint Bernard	1	0,3
Croisé Yorkshire	1	0,3
Dalmatien	2	0,6
Doberman	11	3,4
Dogue Allemand	3	0,9
Dogue Argentin	5	1,6
Dreher	1	0,3
Epagneul Breton	6	1,9
Fox Terrier	2	0,6
Golden Retriever	10	3,1
Griffon	2	0,6
Hovawart	1	0,3
Jack Russell Terrier	6	1,9
Labrador Retriever	19	5,9
Léonberg	3	0,9
Lhassa Apso	3	0,9
Pékinois	2	0,6
Petit Bleu de Gascogne	1	0,3
Pinscher	2	0,6
Ratier	1	0,3
Rottweiler	4	1,3
Saint Bernard	1	0,3
Schapendoes	1	0,3
Scottish Terrier	2	0,6
Setter Anglais	1	0,3
Sharpei	3	0,9
Shi Tzu	4	1,3
Springer Spaniel	1	0,3
Staffordshire Bull Terrier	1	0,3
Teckel	4	1,3
Terre Neuve	3	0,9
West Highland White Terrier	4	1,3
	'	-,0

Whippet	1	0,3
Yorkshire Terrier	14	4,4

Annexe 4: les differentes races representees dans la population P1

Race	Nombre d'individus	% (n=246)
Aidi	1	0,4
Airedale Terrier	1	0,4
Akita Inu	1	0,4
American Staffordshire Terrier	3	1,2
Beagle	4	1,6
Boarded Collie	3	1,2
Beauceron	3	1,2
Berger	2	0,8
Berger Allemand	11	4,5
Berger Australien	2	0,8
Berger Belge Malinois	9	3,7
Berger Belge Tervuren	1	0,4
Berger Blanc Suisse	2	0,8
Berger de Beauce	1	0,4
Berger des Pyrénées	5	2
Berger Polonais	1	0,4
Bichon	9	3,7
Border Collie	5	2
Bouledogue Français	5	2
Bouvier Bernois	9	3,7
Boxer	1	0,4
Braque Allemand	3	1,2
Braque De Weimar	3	1,2
Braque Hongrois	1	0,4
Bull Terrier	2	0,8
Bulldog	3	1,2
Bullmastiff	1	0,4
Cairn Terrier	1	0,4
Cane Corso	2	0,8
Caniche	3	1,2
Carlin	1	0,4
Cavalier King Charles Spaniel	3	1,2
Chien de chasse	1	0,4
Cocker Américain	5	2
Cocker Spaniel Anglais	7	2,8
Colley	1	0,4
Coton de Tuléar	2	0,8
« Croisé »	9	3,7

Croisé Berger	1	0,4
Croisé Berger Allemand	1	0,4
Croisé Berger de Beauce	1	0,4
Croisé Bichon	1	0,4
Croisé Border Collie Fox Terrier	1	0,4
Croisé Caniche	1	0,4
Croisé Caniche Lhassa Apso	1	0,4
Croisé Cavalier King Charles Spaniel	1	0,4
Croisé Chien de Montagne des Pyrénées	1	0,4
Croisé Dogue de Bordeaux	1	0,4
Croisé Fox Terrier	1	0,4
Croisé Golden Retriever	1	0,4
Croisé Griffon	2	0,8
Croisé Labrador	10	4,1
Croisé Labrador Golden Retriever	1	0,4
Croisé Malinois	1	0,4
Croisé Saint Bernard	1	0,4
Croisé Yorkshire	1	0,4
Dalmatien	2	0,8
Doberman	5	2
Dogue Allemand	2	0,8
Dogue Argentin	4	1,6
Dreher	1	0,4
Epagneul Breton	6	2,4
Fox Terrier	2	0,8
Golden Retriever	10	4,1
Hovawart	1	0,4
Jack Russel Terrier	6	2,4
Labrador	15	6,1
Léonberg	3	1,2
Lhassa Apso	2	0,8
Pékinois	1	0,4
Pinscher	1	0,4
Rottweiler	3	1,2
Scottish Terrier	2	0,8
Sharpei	2	0,8
Shi Tzu	2	0,8
Schapendoes	1	0,4
Springer Spaniel	1	0,4
Teckel	2	0,8
Terre Neuve	3	1,2
West Highland White Terrier	4	1,6
Whippet	1	0,4
Yorkshire Terrier	9	3,7

BIBLIOGRAPHIE

ABARCA, K., LOPEZ, J., PERRET, C. et al., 2007. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), pp.1392-1395.

ACHA, P.N. & SZYFRES, B., 2005. Infestations par les tiques. In: OIE. *Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux*, vol. II, 3ème édition, 405 p.

AKKOYUNLU, M., MALAWISTA, S.E, ANGUITA, J. et al., 2001. Exploitation of Interleukin-8-Induced Neutrophil Chemotaxis by the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Infection and Immunity*, 69(9), pp.5577-5588.

AKKOYUNLU, M. & FIKRIG, E., 2000. Gamma Interferon Dominates the Murine Cytokine Response to the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis and Helps To Control the Degree of Early Rickettsemia. *Infection and Immunity*, 68(4), pp.1827-1833.

ALBERDI, M.P., WALKER, A.R. & URQUHART, K.A., 2000. Field evidence that roe deer (Capreolus capreolus) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. *Epidemiology and Infection*, 124(02), pp.315-323.

ALLEMAN, A.R., BARBET, A.F., SORENSON, H.L. et al., 2006. Cloning and expression of the gene encoding the major surface protein 5 (Msp5) of *Anaplasma phagocytophilum* and potential application for serodiagnosis. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(4), pp.418-425.

ALLEMAN, A.R. & WAMSLEY, H.L., 2008. An update on anaplasmosis in dogs. *Veterinary Medicine*, 103(4), pp.212-222.

AMIEL, C., ABADIA, G. & CHOUDAT, D., 2004. L'ehrlichiose granulocytique humaine en Europe. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 34(3), pp.111-122.

ANDERSON, B. E., GREENE, C.E., JONES, D.C. et al., 1992. NOTES: *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the Etiologic Agent of Canine Granulocytic Ehrlichiosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), pp.299-302.

ANDERSON, B.E., DAWSON, J.E., JONES, D.C. et al., 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a New Species Associated with Human Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(12), pp.2838-2842.

ARNEZ, M., PETROVEC, M., LOTRIC-FURLAN, S. et al., 2001. First European Pediatric Case of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), pp.4591-4592.

ARRAGA-ALVARADO, C., PALMAR, M., PARRA, O. et al., 2003. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in Dogs from Maracaibo, Venezuela: An Ultrastructural Study of Experimental and Natural Infections. *Veterinary Pathology*, 40(2), pp.149-156.

ASANOVICH, K.M., BAKKEN, J.S., MADIGAN, J.E. et al., 1997. Antigenic Diversity of Granulocytic *Ehrlichia* Isolates from Humans in Wisconsin and New York and a Horse in California. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(4), pp.1029-1034.

BAKER, D.C., SIMPSON, M., GAUNT, S.D. et al., 1987. Acute *Ehrlichia platys* Infection in the Dog. *Veterinary Pathology*, 24(5), pp.449-453.

BAKKEN, J.S., 1998. The discovery of human granulocytotropic ehrlichiosis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 132(3), pp.175–180.

BAKKEN, J.S. & DUMLER, J.S., 2000. Human Granulocytic Ehrlichiosis. In: Special Section: Emerging Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 31, pp.554-560.

BAKKEN, J.S. & DUMLER, J.S., 2008. Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(3), pp.433-448.

BAKKEN, J.S, KRUETH, J.K., LUND, T. et al., 1996. Exposure to Deer Blood May Be a Cause of Human. *Clinical Infectious Diseases*, 23, pp.198.

BALDRIDGE, G.D., SCOLES, G.A., BURKHARDT, N.Y. et al., 2009. Transovarial Transmission of *Francisella*-Like Endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* Variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 46(3), pp.625-632.

BARBET, A.F., LUNDGREN, A.M., ALLEMAN, A.R. et al., 2006. Structure of the Expression Site Reveals Global Diversity in MSP2 (P44) Variants in *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and Immunity*, 74(11), pp.6429-6437.

BARBET, A.F., MEEUS, P.F.M., BELANGER, M. et al., 2003. Expression of Multiple Outer Membrane Protein Sequence Variants from a Single Genomic Locus of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and Immunity*, 71(4), pp.1706-1718.

BAYARD-MC NEELEY, M., BANSAL, A., CHOWDHURY, I. et al., 2004. In vivo and in vitro studies on *Anaplasma phagocytophilum* infection of the myeloid cells of a patient with chronic myelogenous leukaemia and human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 57(5), pp.499-503.

BEALL, M.J., CHANDRASHEKAR, R., EBERTS, M.D. et al., 2008. Serological and Molecular Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* Species in Dogs from Minnesota. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), pp.455-464.

BEAUFILS, J.P., 2004. *Anaplasma platys* [Ex-Ehrlichia platys] 1ère partie: étude bibliographique. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 39(4), pp.23-30.

BEAUFILS, J.P. & LEGROUX, J.P., 1992. Présence simultanée d'*Ehrlichia sp*.et d'*Hepatozoon canis* dans des granulocytes de chien: à propos de 2 cas. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 27(1), pp.81-86.

BEAUFILS, J.P., INOKUMA, H., MARTIN-GRANEL, J. et al., 2002. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case, and characterization of the agent. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 153(2), pp.85-90.

BEAUFILS, J.P., MARTIN-GRANEL, J., JUMELLE, Ph. et al., 2006. *Anaplasma platys* [Ex-Ehrlichia platys] 2ème partie: Etude rétrospective de douze cas chez le Chien. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 41(3), pp.111-119.

BEUGNET, F., CHALVET-MONFRAY, K. & LOUKOS, H., 2009. FleaTickRisk: a meteorological model developed to monitor and predict the activity and density of three tick species and the cat flea in Europe. *Geospatial health*, 4(1), pp.97-113.

BEUGNET, F. & MARIE, J.L., 2009. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163(4), pp.298-305.

BEXFIELD, N.H., VILLIERS, E.J. & HERRTAGE, M.E., 2005. Immune-mediated hemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, 46(11), pp.543-548.

BIRKNER, K., STEINER, B., RINKLER, C. et al., 2008. The elimination of *Anaplasma phagocytophilum* requires CD4+ T cells, but is independent of Th1 cytokines and a wide spectrum of effector mechanisms. *European Journal of Immunology*, 38(12), pp.3395-3410.

BLAGBURN, B.L., SPENCER, J.A., BILLETER, S.A. et al., 2004. Use of imidacloprid-permethrin to prevent transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from naturally infected *Ixodes scapularis* ticks to dogs. *Veterinary Therapeutics*, 5(3), pp.212-217.

BLANCO, J.R. & OTEO, J.A., 2002. Human Granulocytic Ehrlichiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(12), pp.763-772.

BOBIN, A., CHABASSOL, C. et al., 1962. Syndrome hémorragique thrombotique thrombocytopénique du chien en Tunisie. *Revue de Pathologie Générale*, 62, pp.317-334.

BOOZER, A.L. & MACINTIRE, D.K., 2003. Canine Babesiosis. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 33(4), pp.885-904.

BORJESSON, D.L, BRAZZELL, J.L. & FEFERMAN, R., 2005. Platelet Dysfunction after Association with *Anaplasma phagocytophilum* in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1063, pp.413-415.

BORJESSON, D.L., KOBAYASHI, S.D., WHITNEY, A.R. et al., 2005. Insights into Pathogen Immune Evasion Mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* Fails to Induce an Apoptosis Differentiation Program in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 174(10), pp.6364-6372.

BORJESSON, D.L., SIMON, S.I., TABLIN, F. et al., 2001. Thrombocytopenia in a Mouse Model of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(11), pp.1475-1479.

BOURDEAU, P., 2008. Canine Vector-borne Diseases in France: Information Obtained from Veterinary Clinics in National Surveys. In: *The Third Canine Vector-Borne Disease (CVBD) Symposium, Germany, 16-19 April.* pp. 78-84.

BOURDEAU, P., 1993. Les tiques d'importance vétérinaire et médicale. Première et deuxième parties. *Le Point Vétérinaire*, 25(151), pp.13-41.

BOURDOISEAU, G., 2006. Canine Babesiosis in France. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), pp.118-125.

BOWN, K.J., BEGON, M., BENNETT, M. et al., 2003. Seasonal Dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a Rodent-Tick (*Ixodes trianguliceps*) System, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), pp.63-70.

BRANGER, S., ROLAIN, J.M. & RAOULT, D., 2004. Evaluation of Antibiotic Susceptibilities of *Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by Real-Time PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), pp.4822-4828.

BREITSCHWERDT, E.B., 2000. "The Rickettsioses". In: ETTINGER, S.J. & FELDMAN, E.C., *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, WB Saunders, Philadelphia, Pa, USA, pp. 400-408.

BREITSCHWERDT, E.B., HEGARTY, B.C. & HANCOCK, S.I., 1998. Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), pp.2645-2651.

BRENNER, D.J., O'CONNOR, S.P., STEIGERWALT, A.G. et al., 1993. Proposals to Unify the Genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with Descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and To Remove the Family *Bartonellaceae* from the Order *Rickettsiales*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, 43(4), pp.777-786.

BROSSARD, M. & PAPATHEODOROU, V., 1990. Immunity Against Females *Ixodes ricinus L.*: Effect on Feeding and Haemoglobin Digestion. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65(1), pp.32-36.

BROWN, G.K., MARTIN, A.R., ROBERTS, T.K. et al., 2001. Detection of *Ehrlichia platys* in Dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 79(8), pp.554-558.

CARDOSO, L., TUNA, J., VIEIRA, L. et al., 2010. Molecular Detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in Dogs from the North of Portugal. *Veterinary Journal*, 183(2), pp.232-233.

CARILLO, J.M. & GREENE, R.A., 1978. A Case Report of Canine Ehrlichiosis: Neutrophilic Strain. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 14, pp.100-104.

CARLYON, J.A., ABDEL-LATIF, D., PYPAERT, M. et al., 2004. *Anaplasma phagocytophilum* Utilizes Multiple Host Evasion Mechanisms To Thwart NADPH Oxidase-Mediated Killing during Neutrophil Infection. *Infection and Immunity*, 72(8), pp.4772-4783.

CARLYON, J.A. & FIKRIG, E., 2003. Invasion and Survival Strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular Microbiology*, 5(11), pp.743-754.

CARLYON, J.A. & FIKRIG, E., 2006. Mechanisms of Evasion of Neutrophil Killing by *Anaplasma phagocytophilum*. *Current Opinion in Hematology*, 13(1), pp.28-33.

CARON, N. & HERNANDEZ, J., 2011. Anaplasmose granulocytaire chez un chien. *Le Point Vétérinaire*, 42(315), pp.48-51.

CARRADE, D.D., FOLEY, J.E., BORJESSON, D.L. et al., 2009. Canine Granulocytic Anaplasmosis: a Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), pp.1129-1141.

CHABANNE, L. & BOULOUIS, H.J., 2012. Maladie de Lyme ou anaplasmose granulocytaire chez le chien. *Le Point Vétérinaire*, 325, pp.37-41.

CHABANNE, L. & BOURDOISEAU, G., 2006. Les maladies infectieuses émergentes : pourquoi ?, comment ?, quels sont les facteurs de risque ? *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, Hors-Série, pp. 351-354.

CHABANNE, L., BOURDOISEAU, G., BOULOUIS, H.J. & BEUGNET, F., 2011. Maladies vectorielles à bactéries hémotropes chez le chien. In: *EMC Vétérinaire - Médecine générale*, 3(1100), *Elsevier Masson*, *Paris*, 14 p.

CHABANNE, L. & MARTIN, C., 2005. Comment diagnostiquer et traiter l'ehrlichiose chez le chien. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, 24, pp.25-29.

CHAE, J.S., KIM, C.M., KIM, E.H. et al., 2003. Molecular Epidemiological Study for Tick-Borne Disease (*Ehrlichia* and *Anaplasma* spp.) Surveillance at Selected U.S. Military Training Sites/Installations in Korea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1), pp.118-125.

CHANG, A.C., CHANG, W.L., LIN, C.T. et al., 1996. Canine Infectious Cyclic Thrombocytopenia Found in Taiwan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 58(5), pp.473-476.

CHASTEL, C., 2012. (Page consultée le 2 Novembre 2012). Maladies liées à la morsure des tiques en France, [en ligne]. Adresse URL: http://www.maladies-a-tiques.com/.

CHEN, S.M., DUMLER, J.S., BAKKEN, J.S. & WALKER, D.H., 1994. Identification of a Granulocytotropic *Ehrlichia* Species as the Etiologic Agent of Human Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3), pp.589-595.

CHIMIER, A.M.., 2006. Contribution à l'étude de la prévalence de l'infection à *Anaplasma Phagocytophilum* dans la faune sauvage en France. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Faculté de Médecine (ENVA), Créteil, 110 p.

CHOI, K.S. & DUMLER, J.S., 2003. Early Induction and Late Abrogation of Respiratory Burst in A. phagocytophilum -Infected Neutrophils. Annals of the New York Academy of Sciences, 990(1), pp.488-493.

CHOI, K.S., GRAB, D.J. & DUMLER, J.S., 2004. *Anaplasma phagocytophilum* Infection Induces Protracted Neutrophil Degranulation. *Infection and Immunity*, 72(6), pp.3680-3683.

CHOI, K.S., PARK, J.T. & DUMLER, J.S., 2005. *Anaplasma phagocytophilum* Delay of Neutrophil Apoptosis through the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Pathway. *Infection and Immunity*, 73(12), pp.8209-8218.

CHOPRA, I. & ROBERTS, M., 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), pp.232-260.

COCKWILL, K.R., TAYLOR, S.M., SNEAD, C.R. et al., 2009. Granulocytic anaplasmosis in three dogs from Saskatoon, Saskatchewan. *The Canadian Veterinary Journal*, 50(8), pp.835-840.

COHN, L.A., 2003. Ehrlichiosis and related infections. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 33(4), pp.863-884.

COLLINS, J.D., HANNAN, J., FERGUSSON, A.R. et al., 1970. Tick-Borne Fever in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 24, pp.162–164.

COTTE, V., BONNET, S., COTE, M. et al., 2010. Prevalence of Five Pathogenic Agents in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from Western France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(8), pp.723-730.

DANIELS, T.J., BATTALY, G.R., LIVERIS, D. et al., 2002. Avian Reservoirs of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis? *Emerging Infectious Diseases*, 8(12), pp.1524-1525.

DANTAS-TORRES, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3(26), 11 p.

DANTAS-TORRES, F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152(3-4), pp.173-185.

DAVOUST, B. & PARZY, D., 1995. Actualités des ehrlichioses. *Bulletin de la Société Vétérinaire Pratique de France*, 79(4), pp.183-204.

DAWSON, J.E., ANDERSON, B.E., FISHBEIN, D.B. et al., 1991. Isolation and Characterization of an *Ehrlichia sp.* from a Patient Diagnosed with Human Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(12), pp.2741-2745.

DE ANDRADE, G.M., MACHADO, R.Z., VIDOTTO, M.C. et al., 2004. Immunization of Bovines Using a DNA Vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) Prepared from the Jaboticabal Strain of *Anaplasma marginale*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026, pp.257-266.

DE LA FUENTE, J., MASSUNG, R.F., WONG, S.J. et al., 2005. Sequence Analysis of the *msp4* Gene of *Anaplasma phagocytophilum* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), pp.1309-1317.

DE LA FUENTE, J., NARANJO, V., RUIZ-FONS, F. et al., 2004. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *European Journal of Wildlife Research*, 50(4), pp.187-196.

DINIZ, P.P. & BREITSCHWERDT, E.B., 2012. *Anaplasma phagocytophilum* Infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis). In: Greene C.E., *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4th edition, Elsevier, pp. 244-254.

DOMINGOS, M.C., TROTTA, M., BRIEND-MARCHAL, A. et al., 2011. Anaplasmosis in two dogs in France and molecular and phylogenetic characterization of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(2), pp.215-221.

DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F., 1937. Etat actuel des connaissances sur les rickettsioses animales. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 15, pp.142-187.

DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F., 1935. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 28, pp.418-419.

DREHER, U.M., DE LA FUENTE, J., HOFMANN-LEHMANN, R. et al., 2005. Serologic Cross-Reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(10), pp.1177-1183.

DROUFFE, A., 2007. Situation actuelle des ehrlichioses canines en France : Enquête nationale auprès des cliniques vétérinaires. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Faculté de Médecine (ONIRIS), Nantes, 220 p.

DUMLER, J.S., BARAT, N.C., BARAT, C. et al., 2007. Human Granulocytic Anaplasmosis and Macrophage Activation. *Clinical Infectious Diseases*, 45(2), pp.199-204.

DUMLER, J.S., CHOI, K.S., GARCIA-GARCIA, J.C. et al., 2005. Human Granulocytic Anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), pp.1828-1834.

DUMLER, J.S., ASANOVICH, K.M., BAKKEN, J.S. et al., 1995. Serologic Cross-Reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and Human Granulocytic Ehrlichia. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), pp.1098-1103.

DUMLER, J.S., MADIGAN, J.E., PUSTERLA, N. et al., 2007. Ehrlichioses in Humans: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 45 Suppl. 1, pp.S45-S51.

DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, C.P.J. et al., 2001. 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt. 6), pp.2145-2165.

DUMLER, J. S., RIKIHISA, Y. & DASCH, G.A., 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Volume 2, 2nd edition, Springer, New-York, 2898 p.

DUNNING HOTOPP, J.C., LIN, M., MADUPU, R. et al., 2006. Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. *PLoS Genetics*, 2(2 (e21)), pp.0208-0223.

DU PLESSIS, L., REYERS, F. & STEVENS, K., 1997. Morphological Evidence for Infection of Impala, *Aepyceros melampus*, Platelets by a *Rickettsia*-Like Organism. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 64(4), pp.317-318.

DYACHENKO, V., PANTCHEV, N., BALZER, H.J. et al., 2012. First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. *Parasites & Vectors*, 5(49), 7 p.

EBERTS, M.D., DINIZ, P.P., BEALL, M.J. et al., 2011. Typical and Atypical Manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(6), pp.e86-e94.

EDDLESTONE, S.M., GAUNT, S.D., NEER, T.M. et al., 2007. PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. *Experimental parasitology*, 115(2), pp.205-210.

EGENVALL, A., BJÖERSDORFF, A., LILLIHÖÖK, I. et al., 1998. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *Veterinary Record*, 143(15), pp.412-417.

EGENVALL, A., BONNETT, B.N., GUNNARSSON, A. et al., 2000. Sero-prevalence of Granulocytic *Ehrlichia spp.* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Swedish Dogs 1991-94. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 32(1), pp.19-25.

EGENVALL, A., LILLIHÖÖK, I., KARLSTAM, E. et al., 2000. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Veterinary Record*, 146(7), pp.186-190.

EGENVALL, A.E., HEDHAMMAR, A.A. & BJOERSDORFF, A.I., 1997. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Veterinary Record*, 140(9), pp.222-226.

ENGVALL, E.O., PETTERSSON, B., PERSSON, M. et al., 1996. A 16S rRNA-Based PCR Assay for Detection and Identification of Granulocytic *Ehrlichia* Species in Dogs, Horses, and Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), pp.2170-2174.

EUZEBY, J.P., 2001a. (Page consultée le 30 Octobre 2012).

Anaplasma. In: Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, [en ligne]

Adresse URL: http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/anaplasma.html.

EUZEBY, J.P., 2002. (Page consultée le 30 Octobre 2012).

Anaplasma Phagocytophilum. In: Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, [en ligne] Adresse URL: http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/phagocytophila.html.

EUZEBY, J.P., 2001b. (Page consultée le 30 Octobre 2012). Anaplasma platys. In: Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, [en ligne] Adresse URL: http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/platys.html.

EWING, S.A., ROBERSON, W.R., BUCKNER, R.G. & HAYAT, C.S., 1971. A new strain of *Ehrlichia canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 159(12), pp.1771- 1774.

FERQUEL, E., GARNIER, M., MARIE, J. et al., 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and *Anaplasmataceae* Members in *Ixodes ricinus* Ticks in Alsace, a Focus of Lyme Borreliosis Endemicity in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), pp.3074-3078.

FOGGIE, A., 1949. Studies on tick-borne fever in sheep. *Journal of General Microbiology,* 3(1): v.

FOGGIE, A., 1962. Studies on tick pyaemia and tick-borne fever. *Symposia of Zoological Society of London*, 6, pp.51–58.

FOLEY, J.E., DRAZENOVICH, N., LEUTENEGGER, C.M. et al., 2007. Association between polyarthritis and thrombocytopenia and increased prevalence of vectorborne pathogens in Californian dogs. *Veterinary Record*, 160(5), pp.159-162.

FOLEY, J.E., FOLEY, P. & MADIGAN, J.E., 2001. Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. *American Journal of Veterinary Research*, 62(10), pp.1599-1605.

FOLEY, J.E., NIETO, N.C., BARBET, A. et al., 2009. Antigen Diversity in the Parasitic Bacterium *Anaplasma phagocytophilum* Arises from Selectively-Represented, Spatially Clustered Functional Pseudogenes. *PloS One*, 4(12):e8265, 8 p.

FRANKE, J., FRITZSCH, J., TOMASO, H. et al., 2010. Coexistence of Pathogens in Host-Seeking and Feeding Ticks within a Single Natural Habitat in Central Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), pp.6829-6836.

FRANTA, Z., SOJKA, D., FRANTOVA, H. et al., 2011. *IrCL1* - the haemoglobinolytic cathepsin L of the hard tick, *Ixodes ricinus*. *International Journal for Parasitology*, 41(12), pp.1253-1262.

GARCIA-GARCIA, J.C., RENNOLL-BANKERT, K.E., PELLY, S. et al., 2009. Silencing of Host Cell CYBB Gene Expression by the Nuclear Effector AnkA of the Intracellular Pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and Immunity*, 77(6), pp.2385-2391.

GARRITY, G.M., BELL, J.A. & LILBURN, T.G., 2004. Taxonomic Outline of the Procaryotes. In: *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, 2nd edition, Springer, New-York. 401 p.

GAUNT, S.D., BAKER, D.C. & BABIN, S.S., 1990. Platelet aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia platys* infection. *American Journal of Veterinary Research*, 51(2), pp.290-293.

- GE, Y. & RIKIHISA, Y., 2007. Identification of Novel Surface Proteins of *Anaplasma phagocytophilum* by Affinity Purification and Proteomics. *Journal of Bacteriology*, 189(21), pp.7819-7828.
- GHAFAR, M.W. & AMER, S.A., 2012. Prevalence and first molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum*, the agent of human granulocytic anaplasmosis, in *Rhipicephalus sanguineus* ticks attached to dogs from Egypt. *Journal of Advanced Research*, 3(2), pp.189-194.
- GOODMAN, J.L., NELSON, C.M., KLEIN, M.B. et al., 1999. Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(3), pp.407-412.
- GORDON, W.S., BROWNLEE, A. & WILSON, D.R., 1940. Studies in louping ill, tick-borne fever and scrapie. Proceedings of the Third International Congress on microbiology, New York, pp. 362-363.
- GRANICK, J.L., RENEER, D.V., CARLYON, J.A. et al., 2008. *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocytic lineage through sialylated ligands but fails to alter platelet production. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt. 4), pp.416-423.
- GRANQUIST, E.G., STUEN, S., LUNDGREN, A.M. et al., 2008. Outer Membrane Protein Sequence Variation in Lambs Experimentally Infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and Immunity*, 76(1), pp.120-126.
- GRAY, J.S., DAUTEL, H., ESTRADA-PENA, A. et al., 2009. Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, 12 p.
- GREIG, B. & ARMSTRONG, P.J., 2006. Canine Granulocytotropic Anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In: Greene C.E., *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Elsevier, pp. 219-224.
- GREIG, B., ASANOVICH, K.M., ARMSTRONG, P.J. et al., 1996. Geographic, Clinical, Serologic, and Molecular Evidence of Granulocytic Ehrlichiosis, a Likely Zoonotic Disease, in Minnesota and Wisconsin Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(1), pp.44-48.
- GRIBBLE, D.H., 1969. Equine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 155(2), pp.462-469.
- GUETARD, M., 2001. *Ixodes ricinus*: Morphologie, biologie, élevage. Données bibliographiques. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Université Paul Sabatier (ENVT), Toulouse, 188 p.
- GUIGEN, C. & DEGEILH, B., 2001. Les tiques d'intérêt médical : rôle vecteur et diagnose de laboratoire. *Revue Française des Laboratoires*, 338, pp.49-57.

GÜNES, T., POYRAZ, Ö. & BABACAN, A., 2011. The seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in clinically healthy dogs from Sinop region of Turkey. *Cumhuriyet Medical Journal*, 33(4), pp.396-401.

HALOS, L., MAVRIS, M., VOURC'H, G. et al., 2006. Broad-range PCR-TTGE for the first-line detection of bacterial pathogen DNA in ticks. *Veterinary Research*, 37(2), pp.245-253.

HALOS, L., VOURC'H, G., COTTE, V. et al., 2006. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia sp.* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from France. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, pp.316-319.

HARRUS, S., AROCH, I., LAVY, E. et al., 1997. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Veterinary Record*, 141(10), pp.247-250.

HARVEY, J.W., 2012. *Anaplasma platys* infection (Thrombocytotropic Anaplasmosis). In: Greene C.E., *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4th edition, Elsevier. pp. 256-258.

HARVEY, J.W., SIMPSON, C.F. & GASKIN, J.M., 1978. Cyclic Thrombocytopenia Induced by a *Rickettsia*-Like Agent in Dogs. *Journal of Infectious Diseases*, 137(2), pp.182-188.

HESELTINE, J., CARR, A. & NIELSSEN, A., 2003. Diagnosing and treating ehrlichiosis in dogs and cats. *Veterinary Medicine*, 98(7), pp.595-601.

HEYMAN, P., COCHEZ, C., BIGAIGNON, G. et al., 2003. Human Granulocytic Ehrlichiosis in Belgium: an underestimated cause of disease. *Journal of Infection*, 47(2), pp.129-132.

HOROWITZ, H.W., HSIEH, T.C., AGUERO-ROSENFELD, M.E. et al., 2001. Antimicrobial Susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), pp.786-788.

HOROWITZ, H.W., KILCHEVSKY, E., HABER, S. et al., 1998. Perinatal Transmission of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *The New England Journal of Medicine*, 339(6), pp.375-378.

HOSKINS, J.D., 1991. Tick-transmitted Diseases. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 21(1), WB Saunders, Philadelphia, 202 p.

HUA, P., YUHAI, M., SHIDE, T. et al., 2000. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. *Microbiology and Immunology*, 44(9), pp.737-739.

HUANG, B., 2011. (Page consultée le 2 Septembre 2012)

Anaplasma phagocytophilum remodels its host cell-derived vacuole into a protective niche by redecorating the vacuolar membrane with select Rab GTPases and bacterial proteins. In: Virginia Commonwealth University Digital Archives, [en ligne] Adresse URL: http://hdl.handle.net/10156/3609

HUDSON, J.R., 1950. The recognition of Tick-Borne Fever as a disease of cattle. *British Veterinary Journal*, 106, pp.3–17.

HUXSOLL, D.L., HILDEBRANDT, P.K., NIMS, R.M. & WALKER, J.S. 1970. Tropical Canine Pancytopenia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 157(11), pp.1627-1632.

IDEXX Laboratories, 2012. (Page consultée le 15 Octobre 2012)
Test SNAP® 4Dx®, [en ligne]

Adresse URL: http://www.idexx.fr/html/fr_fr/smallanimal/inhouse/snap/4dx.html

IJDO, J.W. & MUELLER, A.C., 2004. Neutrophil NADPH Oxidase Is Reduced at the *Anaplasma phagocytophilum* Phagosome. *Infection and Immunity*, 72(9), pp.5392-5401.

INOKUMA, H., BEPPU, T., OKUDA, M. et al., 2003. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. *Veterinary Parasitology*, 115(4), pp.343-348.

INOKUMA, H., FUJII, K., OKUDA, M. et al., 2002. Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon *gro*ESL and the Citrate Synthase Gene (*gltA*) of *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *platys* for Phylogenetic and Diagnostic Studies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5), pp.1132-1136.

INOKUMA, H., RAOULT, D. & BROUQUI, P., 2000. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in Brown Dog Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), pp.4219-4221.

IRWIN, P.J., 2001. The first report of canine ehrlichiosis in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 79(8), pp.552-553.

JÄDERLUND, K.H., EGENVALL, A., BERGSTRÖM, K. et al., 2007. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs with neurological signs. *Veterinary Record*, 160(24), pp.825-831.

JENSEN, J., SIMON, D., ESCOBAR, H.M. et al., 2007. *Anaplasma phagocytophilum* in Dogs in Germany. *Zoonoses and Public Health*, 54(2), pp.94-101.

JONCOUR, G., 2007. L'ehrlichiose granulocytaire bovine/ovine à Anaplasma phagocytophilum et la faune sauvage. Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires, 40, pp.33-36.

JONCOUR, G., 2006. Utilisation des Ongulés sauvages en France, en tant que « marqueurs / bio-indicateurs » potentiels dans l'étude épidémiologique d'une zoonose, l'ehrlichiose granulocytaire/anaplasmose humaine et révélateurs de la présence d'A. phagocytophilum. « Le chevreuil peut-il être sentinelle de la vache et de l'homme ? ». In: Actes du colloque Yaboumba, 30 mars-2 avril 2006, Paris.

KATARGINA, O., GELLER, J., ALEKSEEV, A. et al., 2012. Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in Estonia, the European part of Russia and Belarus. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(1), pp.40-46.

KEMPERMAN, M., NEITZEL, D. & JENSEN, K., 2008. *Anaplasma phagocytophilum* transmitted through blood transfusion—Minnesota, 2007. *Journal of the American Medical Association*, 300, pp.2718–2720.

KIM, H.Y. & RIKIHISA, Y., 2000. Expression of Interleukin-1β, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Interleukin-6 in Human Peripheral Blood Leukocytes Exposed to Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent or Recombinant Major Surface Protein P44. *Infection and Immunity*, 68(6), pp.3394-3402.

KIRTZ, G., CZETTEL, B., THUM, D. et al., 2007. *Anaplasma phagocytophilum* in einer österreischichen Hundepopulation: eine Prävalenz-Studie (2001–2006). *Kleintierpraxis*, 52(9), pp.562-568.

KIRTZ, G., LEIDINGER, E. & MOSER, V., 2000. Canine granulozytäre Ehrlichiose (CGE) bei einem Hund in Österreich. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 87, pp.241-246.

KLAG, A.R., DUNBAR, L.E. & GIRARD, C.A., 1991. Concurrent ehrlichiosis and babesiosis in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*, 32(5), pp.305-307.

KLEIN, M.B., MILLER, J.S., NELSON, C.M. et al., 1997. Primary Bone Marrow Progenitors of Both Granulocytic and Monocytic Lineages Are Susceptible to Infection with the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(5), pp.1405-1409.

KOHN, B., GALKE, D., BEELITZ, P. et al., 2008. Clinical Features of Canine Granulocytic Anaplasmosis in 18 Naturally Infected Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6), pp.1289-1295.

KORDICK, S.K., BREITSCHWERDT, E.B., HEGARTY, B.C. et al., 1999. Coinfection with Multiple Tick-Borne Pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(8), pp.2631-2638.

KRAUSE, P.J. & WORMSER, G.P., 2008. Nosocomial Transmission of Human Granulocytic Anaplasmosis? *The Journal of the American Medical Association*, 300(19), pp.2308-2309.

KYBICOVA, K., SCHANILEC, P., HULINSKA, D. et al., 2009. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Dogs in the Czech Republic. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(6), pp.655-661.

LAPPIN, M.R., GRIFFIN, B., BRUNT, J. et al., 2006. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia* risticii DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8(2), pp.85-90.

LESTER, S.J., BREITSCHWERDT, E.B., COLLIS, C.D. et al., 2005. *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. *The Canadian Veterinary Journal.*, 46(9), pp.825-827.

LEWIS, G.E.J., HUXSOLL, D.L., RISTIC, M. et al., 1975. Experimentally induced infections of dogs, cats and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. *American Journal of Veterinary Research*, 36(1), pp.85-88.

LILLIEHÖÖK, I., EGENVALL, A. & TVEDTEN, H.W., 1998. Hematopathology in Dogs Experimentally Infected with a Swedish Granulocytic *Ehrlichia* Species. *Veterinary Clinical Pathology*, 27(4), pp.116-122.

LILLINI, E., MACRI, G., PROIETTI, G. et al., 2006. New Findings on Anaplasmosis Caused by Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, pp.360-370.

LIN, Q., ZHANG, C. & RIKIHISA, Y., 2006. Analysis of Involvement of the RecF Pathway in *p44* Recombination in *Anaplasma phagocytophilum* and in *Escherichia coli* by Using a Plasmid Carrying the *p44* Expression and *p44* Donor Loci. *Infection and Immunity*, 74(4), pp.2052-2062.

LITTLE, S.E., HOSTETLER, J. & KOCAN, K.M., 2007. Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. *Veterinary Parasitology*, 150(1-2), pp.139-145.

LIZ, J.S., ANDERES, L., SUMNER, J.W. et al., 2000. PCR Detection of Granulocytic *Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* Ticks and Wild Small Mammals in Western Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), pp.1002-1007.

LIZ, J.S., SUMNER, J.W., PFISTER, K. et al., 2002. PCR Detection and Serological Evidence of Granulocytic Ehrlichial Infection in Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and Chamois (*Rupicapra rupicapra*). *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), pp.892-897.

MAC LEOD, J., 1932. Preliminary studies in tick transmission of louping ill. II. A study of the reaction of sheep to tick infestation. *Veterinary Journal*, 88, pp.276-284.

MADEWELL, B.R. & GRIBBLE, D.H., 1982. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi. Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180(5), pp.512–514.

MAEDA K., MARKOWITZ, N., HAWLEY, R.C. et al., 1987. Human Infection with *Ehrlichia canis*, a Leukocytic Rickettsia. *The New England Journal of Medicine*, 316(14), pp.853-856.

MAGNARELLI, L.A., IJDO, J.W., VAN ANDEL, A.E. et al., 2001. Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses. *American Journal of Veterinary Research*, 62(1), pp.29-32.

MARTIN, C., 2004. Les Ehrlichioses du chien: étude bibliographique, diagnostic et comparaison de trois kits de diagnostic sérologique rapide de l'ehrlichiose monocytaire. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Université Claude Bernard (VetAgroSup Campus Vétérinaire de Lyon), Lyon, 180 p.

MASSUNG, R. F. & SLATER, K.G., 2003. Comparison of PCR Assays for Detection of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), pp.717-722.

MASSUNG, R.F., COURTNEY, J.W., HIRATZKA, S.L. et al., 2005. *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. *Emerging Infectious Diseases*, 11(10), pp.1604–1606.

MASSUNG, R.F., LEVIN, M.L., MILLER, N.J. et al., 2006. Reservoir Competency of Goats for *Anaplasma phagocytophilum*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, pp.476-478.

MASSUNG, R.F., LEVIN, M.L., MUNDERLOH, U.G. et al., 2007. Isolation and Propagation of the Ap-Variant 1 Strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a Tick Cell Line. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7), pp.2138-2143.

MAURIN, M., BAKKEN, J. S. & DUMLER, J. S., 2003. Antibiotic Susceptibilities of *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *phagocytophilum* Strains from Various Geographic Areas in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), pp.413-415.

MAYER-SCHOLL, A., AVERHOFF, P. & ZYCHLINSKY, A., 2004. How do neutrophils and pathogens interact? *Current Opinion in Microbiology*, 7(1), pp.62-66.

MERINO, F.J., NEBRADA, T., SERRANO, J.L. et al., 2005. Tick species and tick-borne infections identified in population from a rural area of Spain. *Epidemiology and Infection*, 133(5), pp.943-949.

MORISSETTE, E., MASSUNG, R.F., FOLEY, J.E. et al., 2009. Diversity of *Anaplasma phagocytophilum* Strains, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 15(6), pp.928-931.

MOTOI, Y., SATOH, H., INOKUMA, H. et al., 2001. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiology and Immunology*, 45(1), pp.89-91.

MOULDER, J.W., 1974. Order I. Rickettsiales. In: BUCHANAN, R.E., GIBBONS, N.E. (eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, pp. 882-890.

MUNDERLOH, U.G., LYNCH, M.J., HERRON, M.J. et al., 2004. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Veterinary Microbiology*, 101(1), pp.53-64.

MURPHY, C.I., STOREY, J.R., RECCHIA, J. et al., 1998. Major Antigenic Proteins of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis Are Encoded by Members of a Multigene Family. *Infection and Immunity*, 66(8), pp.3711-3718.

MYLONAKIS, M.E., KOUTINAS, A.F., BANETH, G. et al., 2004. Mixed *Ehrlichia canis, Hepatozoon canis*, and presumptive *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(4), pp.249-251.

NARANJO, V., RUIZ-FONS, F., HÖFLE, U. et al., 2006. Molecular Epidemiology of Human and Bovine Anaplasmosis in Southern Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, pp.95-99.

NEER, T.M. & HARRUS, S., 2006. Canine ehrlichiosis, neorickettsiosis, anaplasmosis, and *Wolbachia* infection. In: Greene C.E., *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Elsevier, pp. 203-217.

NIETO, N.C. & FOLEY, J.E., 2009. Meta-Analysis of Coinfection and Coexposure with *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Humans, Domestic Animals, Wildlife, and *Ixodes ricinus*-Complex Ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(1), pp.93-102.

NIU, H., YAMAGUCHI, M. & RIKIHISA, Y., 2008. Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum. Cellular Microbiology*, 10(3), pp.593-605.

NYARKO, E., GRAB, D.J. & DUMLER, J.S., 2006. *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils enhance transmigration of *Borrelia burgdorferi* across the human blood brain barrier in vitro. *International Journal for Parasitology*, 36(5), pp.601-605.

NYINDO, M., ESSUMAN, S., CHESANG, R. et al., 1996. Immunity Induced by Vaccination with *Rhipicephalus appendiculatus* Salivary Gland Antigens Does Not Augment Protective Immunity Acquired Naturally by Exposing Rabbits to Adult Ticks. *Journal of Medical Entomology*, 33(4), pp.559-565.

NYINDO, M.B., RISTIC, M., HUXSOLL, D.L. et al., 1971. Tropical canine pancytopenia: *in vitro* cultivation of the causative agent-- *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 32(11), pp.1651-1658.

OGDEN, N. H., BOWN, K., HORROCKS, B.K. et al., 1998. Granulocytic *Ehrlichia* infection in Ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Medical and Veterinary Entomology*, 12(4), pp.423-429.

OGDEN, N.H., CASEY, A.N.J., WOLDEHIWET, Z. et al., 2003. Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* Ticks from Sheep in the Acute and Post-Acute Phases of Infection. *Infection and Immunity*, 71(4), pp. 2071-2078.

OTEO, J.A., BLANCO, J.R., MARTINEZ DE ARTOLA, V. et al., 2000. First Report of Human Granulocytic Ehrlichiosis from Southern Europe (Spain). *Emerging Infectious Diseases*, 6(4), pp.430-432.

OVERAS, J. & HUNSHAMAR, P., 1962. Tick-borne fever ('sjodogg') hos storfe. (Tick-borne fever in cattle). *Nordisk Veterinaer Medicin*, 14, pp.631–641.

PANTCHEV, N., SCHAPER, R., LIMOUSIN, S. et al., 2009. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and Tick-Borne Infections Caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in Domestic Dogs in France: Results of a Countrywide Serologic Survey. *Parasitology Research*, 105(Suppl.1), pp.S101-S114.

PAROLA, P. & RAOULT, D., 2001. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), pp.897-928.

PAROLA, P., BEATI, L., CAMBON, M. et al., 1998. Ehrlichial DNA Amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. *Journal of Medical Entomology*, 35(2), pp.180-183.

PAROLA, P., CORNET, J.P., SANOGO, Y.O. et al., 2003. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and Other Eubacteria in Ticks from the Thai-Myanmar Border and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), pp.1600-1608.

PAROLA, P., SOCOLOVSCHI, C., JEANJEAN, L. et al., 2008. Warmer Weather Linked to Tick Attack and Emergence of Severe Rickettsioses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(11):e338, 8 p.

PEDRA, J.H.F., MATTNER, J., TAO, J. et al., 2008. C-Jun NH2-Terminal Kinase 2 Inhibits Gamma Interferon Production during *Anaplasma phagocytophilum* Infection. *Infection and Immunity*, 76(1), pp.308-316.

PEDRA, J.H.F., SUTTERWALA, F.S., SUKUMARAN, S. et al., 2007. ASC/PYCARD and Caspase-1 Regulate the IL-18/IFN-γ Axis during *Anaplasma phagocytophilum* Infection. *The Journal of Immunology*, 179(7), pp.4783-4791.

PEDRA, J.H.F., TAO, J., SUTTERWALA, F.S. et al., 2007. IL-12/23p40-dependent clearance of *Anaplasma phagocytophilum* in the murine model of human anaplasmosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(3), pp.401-410.

PEREZ-EID, C. & GILOT, B., 1998a. Bio-écologie des tiques induisant les pathologies les plus importantes en France. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 28(4): compl.1, pp.325-334.

PEREZ-EID, C. & GILOT, B., 1998b. Les tiques : cycles, habitat, hôtes, rôle pathogène, lutte. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 28(4): compl. 1, pp.335-343.

PETROVEC, M., FURLAN, S.L., ZUPANC, T.A. et al., 1997. Human Disease in Europe Caused by a Granulocytic *Ehrlichia* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), pp.1556-1559.

PETROVEC, M., SIXL, W., SCHWEIGER, R. et al., 2003. Infections of Wild Animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, pp.103-106.

POITOUT, F.M. & CHABANNE, L., 2004. Anaplasmose chez un chien. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, 16, pp.45-48.

POITOUT, F.M., SHINOZAKI, J.K., STOCKWELL, P.J. et al., 2005. Genetic Variants of *Anaplasma phagocytophilum* Infecting Dogs in Western Washington State. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), pp.796-801.

PUSTERLA, N., BRAUN, U., WOLFENSBERGER, C. et al., 1997. Intrauterine infection with *Ehrlichia phagocytophila* in a cow. *Veterinary Record*, 141(4), pp.101-102.

PUSTERLA, N., CHAE, J.S., KIMSEY, R.B. et al., 2002. Transmission of *Anaplasma phagocytophila* (Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent) in Horses Using Experimentally Infected Ticks (*Ixodes scapularis*). *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 49(10), pp.484-488.

PUSTERLA, N., HUDER, J., WOLFENSBERGER, C. et al., 1998. Experimental oral transmission of *Ehrlichia phagocytophila* to calves. *Veterinary Record*, 143(9), pp.250-251.

PUSTERLA, N., PUSTERLA, J.B., DEPLAZES, P. et al., 1998. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of Canine Granulocytic Ehrlichia Infection in Dogs in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12), pp.3460-3462.

PUSTERLA, N., CHANG, C.C., CHOMEL, B.B. et al., 2000. Serologic and molecular evidence of *Ehrlichia* spp. in Coyotes in California. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(3), pp.494-499.

RAOULT, D. & BROUQUI, P., 1998. Les rickettsioses, Monographie EMC, Elsevier, Paris, 254p.

RAR, V.A., LIVANOVA, N.N., PANOV, V.V. et al., 2008. Prevalence of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals from different regions of the Asian part of Russia. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, pp.222-230.

RECHAV, Y. & NUTTALL, P.A., 2000. The effect of male ticks on the feeding performance of immature stages of *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 24, pp.569-578.

REJMANEK, D., FOLEY, P., BARBET, A. et al., 2012. Evolution of Antigen Variation in the Tick-Borne Pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *Molecular Biology and Evolution*, 29(1), pp.391-400.

REMY, V., HANSMANN, Y., DE MARTINO, S. et al., 2003. Human Anaplasmosis Presenting as Atypical Pneumonitis in France. *Clinical Infectious Diseases*, 37(6), pp.846-848.

RIKIHISA, Y., 1999. Ehrlichieae of veterinary importance. In: RAOULT, D. BROUQUI, P. *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millennium,* Elsevier, Paris, pp. 393-405.

RIKIHISA, Y., 2011. Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3), pp.469-489.

RIKIHISA, Y., 2010. Molecular Events Involved in Cellular Invasion by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum. Veterinary Parasitology*, 167(2-4), pp.155-175.

RIKIHISA, Y., 1991. The Tribe *Ehrlichieae* and Ehrlichial Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3), pp.286-308.

RISTIC, M. & HUXSOLL, D.L., 1984. Tribe II: Ehrlichiae. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., *Bergey's manual of systematic bacteriology,* vol.I, The William's and Wilkins Co., Baltimore, pp. 704-711.

RODHAIN, F., 2003. Emergences de maladies à transmission vectorielle. *Epidémiologie et Santé Animale*, 43, pp. 33-49.

RODRIGUEZ-MALLON, A., FERNANDEZ, E., ENCINOSA, P.E. et al., 2012. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine*, 30(10), pp.1782-1789.

RYMASZEWSKA, A. & ADAMSKA, M., 2011. Molecular evidence of vector-borne pathogens coinfecting dogs from Poland. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59(2), pp.215-223.

SAINZ, A., KIM, C.H., TESOURO, M.A. et al., 2000. Serological Evidence of Exposure to *Ehrlichia* Species in Dogs in Spain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916, pp.635-642.

SANOGO, Y.O., INOKUMA, H., PAROLA, P. et al., 2003. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 70(3), pp.205-212.

SANTOS, A.S., SANTOS-SILVA, M.M., ALMEIDA, V.C. et al., 2004. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* Ticks (Acari : *Ixodidae*) from Madeira Island and Setúbal District, Mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), pp.1643-1648.

SARIH, M., M'GHIRBI, Y., BOUATTOUR, A. et al., 2005. Detection and Identification of *Ehrlichia* spp. in Ticks Collected in Tunisia and Morocco. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), pp.1127-1132.

SARKAR, A., HELLBERG, L., BHATTACHARYYA, A. et al., 2012. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* Activates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and NF-κB Survival Pathways in Neutrophil Granulocytes. *Infection and Immunity*, 80(4), pp.1615-1623.

SAUGER, B., 2005. Maladies bactériennes transmises par les tiques en Europe et leurs particularités. *Thèse de Doctorat vétérinaire*, Faculté de Médecine (ONIRIS), Nantes, 154 p.

SCAIFE, H., WOLDEHIWET, Z., HART, C.A. et al., 2003. *Anaplasma phagocytophilum* Reduces Neutrophil Apoptosis In Vivo. *Infection and Immunity*, 71(4), pp.1995-2001.

SCHICHT S., JUNGE, S., SCHNIEDER, T. et al., 2011. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and Coinfection with *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in the Hard Tick *Ixodes ricinus* in the City of Hanover (Germany). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(12), pp.1595-1597.

SCHOULS, L.M., VAN DE POL, I., RIJPKEMA, S.G.T. et al., 1999. Detection and Identification of *Ehrlichia, Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(7), pp.2215-2222.

SCORPIO, D.G., AKKOYUNLU, M., FIKRIG, E. & DUMLER, J.S., 2004. CXCR2 Blockade Influences *Anaplasma phagocytophilum* Propagation but Not Histopathology in the Mouse Model of Human Granulocytic Anaplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(5), pp.963-968.

SELLS, D.M., HILDEBRANDT, P.K., LEWIS, G.E. et al., 1976. Ultrastructural Observations on *Ehrlichia equi* Organisms in Equine Granulocytes. *Infection and Immunity*, 13(1), pp.273-280.

SHAW, S.E. & DAY, M.J., 2005. *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Manson Publishing, 128 p.

SIMPSON, R.M., GAUNT, S.D., HAIR, J.A. et al., 1991. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *American Journal of Veterinary Research*, 52(9), pp.1537-1541.

SKORACKI, M., MICHALIK, J., SKOTARCZAK, B. et al., 2006. First detection of *Anaplasma phagocytophilum* in quill mites (Acari: Syringophilidae) parasitizing passerine birds. *Microbes and Infection*, 8(2), pp.303-307.

SPARAGANO, O.A.E., DE VOS, A.P., PAOLETTI, B. et al., 2003. Molecular detection of *Anaplasma Platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15(6), pp.527-534.

STOREY, J.R., DOROS-RICHERT, L.A., GINGRICH-BAKER, C. et al., 1998. Molecular Cloning and Sequencing of Three Granulocytic *Ehrlichia* Genes Encoding High-Molecular-Weight Immunoreactive Proteins. *Infection and Immunity*, 66(4), pp.1356-1363.

STRIK, N.I., ALLEMAN, A.R., BARBET, A.F. et al., 2007. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* Major Surface Protein 5 and the Extent of Its Cross-Reactivity with *A. marginale*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(3), pp.262-268.

STUEN, S., 2003. *Anaplasma phagocytophilum* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) infection in sheep and wild ruminants in Norway. A study on clinical manifestation, distribution and persistence. *Doctor Philosophiae Thesis*, Norwegian School of Veterinary Science, Oslo, 132 p.

STUEN, S., BERGSTRÖM, K., PETROVEC, M. et al., 2003. Differences in Clinical Manifestations and Hematological and Serological Responses after Experimental Infection with Genetic Variants of *Anaplasma phagocytophilum* in Sheep. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(4), pp.692-695.

STUEN, S., HANDELAND, K., FRAMMARSVIK, T. & BERGSTRÖM, K., 2001. Experimental *Ehrlichia phagocytophila* infection in red deer (*Cervus elaphus*). *Veterinary Record*, 149(13), pp.390–392.

STUEN, S., HARDENG, F. & LARSEN, H.J., 1992. Resistance to tick-borne fever in young lambs. *Research in Veterinary Science*, 52(2), pp.211-216.

SUKSAWAT, J., PITULLE, C., ARRAGA-ALVARADO, C. et al., 2001. Coinfection with Three *Ehrlichia* Species in Dogs from Thailand and Venezuela with Emphasis on Consideration of 16S Ribosomal DNA Secondary Structure. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), pp.90-93.

SUKUMARAN, B., MASTRONUNZIO, J.E., NARASIMHAN, S. et al., 2011. *Anaplasma phagocytophilum* AptA modulates Erk1/2 signalling. *Cellular Microbiology*, 13(1), pp.47-61.

SUKUMARAN, B., NARASIMHAN, S., ANDERSON, J.F. et al., 2006. An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(6), pp.1507-1517.

SUN, W., IJDO, J.W., TELFORD, S.R. et al., 1997. Immunization against the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(12), pp.3014-3018.

TARELLO, W., 2003. Canine granulocytic ehrlichiosis (cge) in Italy. *Acta Veterinaria Hungarica*, 51(1), pp.73-90.

TATE, C.M., MEAD, D.G., LUTTRELL, M.P. et al., 2005. Experimental Infection of White-Tailed Deer with *Anaplasma phagocytophilum*, Etiologic Agent of Human Granulocytic Anaplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), pp.3595-3601.

TELFORD, S.R., KORENBERG, E.I., GOETHERT, H.K. et al., 2002. Detection of natural foci of babesiosis and granulocytic ehrlichiosis in Russia. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii*, (6), pp.21-25.

TOLEDO, A., OLMEDA, A.S., ESCUDERO, R. et al., 2009. Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Ticks Collected from Central Spain. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), pp.67-74.

TORINA, A., ALONGI, A., NARANJO, V. et al., 2008. Prevalence and Genotypes of *Anaplasma* Species and Habitat Suitability for Ticks in a Mediterranean Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), pp.7578-7584.

TOZON, N.A., PETROVEC, M. & AVSIC-ZUPANC, T., 2003. Clinical and Laboratory Features of the First Detected Cases of *A. phagocytophila* Infections in Dogs from Slovenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, pp.424-428.

TROMBINI, G., 2008. L'anaplasmose canine à *Anaplasma phagocytophilum*: présentation de cas cliniques et infection expérimentale. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Université Claude Bernard (VetAgro-Sup Campus Vétérinaire de Lyon), Lyon, 160 p.

TUOMI, J., 1967. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 1. Clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 70(3), pp.429–445.

TYZZER, E.E., 1938. *Cytoecetes microti*, N-G., N.S.P.: a parasite developing in granulocytes and infective for small rodents. *Parasitology*, 30, pp.242–257.

UNVER, A., FELEK, S., PADDOCK, C.D. et al., 2001. Western Blot Analysis of Sera Reactive to Human Monocytic Ehrlichiosis and Human Granulocytic Ehrlichiosis Agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), pp.3982-3986.

VAYSSIER-TAUSSAT, M., VOURC'H, G., HALOS, L. et al., 2004. Co-infections bactériennes des tiques: marqueurs moléculaires et évaluation des risques en milieu naturel. In: Séminaire bilan de l'action thématique programmée 2002-2004 du Département de Santé Animale de l'INRA "Bases moléculaires et cellulaires de la spécificité d'hôte chez les agents responsables de zoonoses infectieuses et parasitaires", Nouzilly, Septembre 2004, pp. 42-53.

VIAL, L., 2008. (Page consultée le 2 Octobre 2012)

Tiques et Maladies transmises. In: Cours Module "Biologie et contrôle des vecteurs", INRA/CIRAD.

Adresse URL:

http://www.google.fr/imgres?q=hypostome+tiques&um=1&hl=fr&safe=off&biw=1249&bih=569&tbm=isch&tbnid=WK9oeArA2KDjtM:&imgrefurl=http://oglass.free.fr/IMG/pdf/tiquesVial.pdf&docid=iTriv7v3i9NaoM&imgurl=http://www.maladies-a-tiques.com/

VON LOEWENICH, F.D., BAUMGARTEN, B.U., SCHRÖPPEL, K. et al., 2003. High Diversity of ankA Sequences of Anaplasma phagocytophilum among Ixodes ricinus Ticks in Germany. Journal of Clinical Microbiology, 41(11), pp.5033-5040.

VON LOEWENICH, F.D., STUMPF, G., BAUMGARTEN, B.U. et al., 2003. A Case of Equine Granulocytic Ehrlichiosis Provides Molecular Evidence for the Presence of Pathogenic Anaplasma phagocytophilum (HGE Agent) in Germany. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 22(5), pp.303-305.

WALKER, D.H. & DUMLER, J.S., 1996. Emergence of the Ehrlichioses as Human Health Problems. *Emerging Infectious Diseases*, 2(1), pp.18-29.

WALLS, J.J., CATUREGLI, P., BAKKEN, J.S. et al., 2000. Improved Sensitivity of PCR for Diagnosis of Human Granulocytic Ehrlichiosis Using *epank1* Genes of *Ehrlichia phagocytophila*-Group Ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), pp.354–356.

WANG, X., CHENG, Z., ZHANG, C. et al., 2007. *Anaplasma phagocytophilum p44* mRNA Expression Is Differentially Regulated in Mammalian and Tick Host Cells: Involvement of the DNA Binding Protein ApxR. *Journal of Bacteriology*, 189(23), pp.8651-8659.

WANG, X., KIKUCHI, T. & RIKIHISA, Y., 2006. Two Monoclonal Antibodies with Defined Epitopes of P44 Major Surface Proteins Neutralize *Anaplasma phagocytophilum* by Distinct Mechanisms. *Infection and Immunity*, 74(3), pp.1873-1882.

WEKSLER, B., 1998. Rôle des plaquettes dans l'inflammation. In: RUSSO-MARIE, F., PELTIER, A., POLLA, B.S. *L'inflammation*, J.L. Eurotext, Paris, pp. 103-116.

WOLDEHIWET, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology*, 167(2-4), pp.108-122.

WOLDEHIWET, Z. & SCOTT, G.R., 1982. Stages in the development of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever. *Journal of Comparative Pathology*, 92(3), pp.469-474.

WONG, S.J. & THOMAS, J.A., 1998. Cytoplasmic, Nuclear, and Platelet Autoantibodies in Human Granulocytic Ehrlichiosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), pp.1959-1963.

WORMSER, G.P., HOROWITZ, H.W., NOWAKOWSKI, J. et al., 1997. Positive Lyme disease serology in patients with clinical and laboratory evidence of human granulocytic ehrlichiosis. *American Journal of Clinical Pathology*, 107(2), pp.142-147.

YOSHIIE, K., KIM, H.Y., MOTT, J. & RIKIHISA, Y., 2000. Intracellular Infection by the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent Inhibits Human Neutrophil Apoptosis. *Infection and Immunity*, 68(3), pp.1125-1133.

YU, Q., CHEN, C.F., CHEN, Q. & ZHANG, L.J., 2012. Expression and Immunogenicity of Recombinant Immunoreactive Surface Protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(6), pp.919-923.

ZEIDNER, N.S., MASSUNG, R.F., DOLAN, M.C. et al., 2008. A sustained-release formulation of doxycycline hyclate (Atridox) prevents simultaneous infection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* transmitted by tick bite. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt. 4), pp.463-468.

ZHANG, L.J., LIU, Y., NI, D. et al., 2008. Nosocomial Transmission of Human Granulocytic Anaplasmosis in China. *The Journal of the American Medical Association*, 300(19), pp.2263-2270.

NOM PRENOM: SUCHET Aurore

TITRE : Séroprévalence des maladies vectorielles transmises par les tiques chez le chien en France : Importance du genre *Anaplasma*

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 7 décembre 2012

RESUME:

Les anaplasmoses canines sont des maladies émergentes en France, causées par deux bactéries Gram -, appartenant au genre Anaplasma, famille des Anaplasmataceae, ordre des Rickettsiales: Anaplasma phagocytophilum, responsable de l'anaplasmose granulocytaire, infectant principalement les granulocytes neutrophiles et transmise par les tiques dures Ixodes ricinus; et Anaplasma platys, responsable de la thrombopénie infectieuse cyclique, infectant les thrombocytes et transmise par Rhipicephalus sanguineus. Caractérisées par des symptômes peu spécifiques, leur diagnostic repose sur des arguments épidémiocliniques, complétés par des méthodes directes (cytologie, PCR, culture) et indirecte (sérologie). Le traitement (doxycycline) conduit à une amélioration rapide de l'état général du chien. L'anaplasmose granulocytaire, considérée comme une zoonose, présente en outre un intérêt en santé humaine.

Aujourd'hui, ces maladies intéressent de nombreux acteurs de la santé publique et vétérinaire, en raison d'une augmentation depuis plusieurs décennies de leur incidence, surtout dans les zones tempérées de l'Hémisphère Nord. Cependant en France, très peu de données sont disponibles quant à leur prévalence. Cette thèse présente une étude réalisée sur les échantillons sanguins de 323 chiens présentés en consultation dans les Ecoles Vétérinaires françaises d'Alfort, Lyon et Toulouse, permettant d'évaluer la séroprévalence de ces infections, à partir de la réalisation de tests sérologiques 4Dx®. Les résultats sont en faveur d'une séroprévalence faible mais leur interprétation doit être pondérée, compte-tenu d'un certain nombre de biais et de difficultés rencontrés au cours de l'étude.

MOTS CLES:

- Anaplasma sp.
- Sérologie
- Tiques
- Chien

JURY:

Président : Monsieur le Professeur KROLAK-SALMON, Pierre

1er Assesseur : Monsieur le Professeur CHABANNE, Luc 2ème Assesseur : Monsieur le Professeur BOURDOISEAU, Gilles

DATE DE SOUTENANCE: 7 décembre 2012

ADRESSE DE L'AUTEUR : Melle SUCHET Aurore

7, allée des Créneaux 42100 SAINT-ETIENNE