

République Algérienne Démocratique et  
Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



## MÉMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Magistère en sciences vétérinaires

Option : Immunologie animale

Thème :

Étude de la séroprévalence de l'infection par *Anaplasma marginale*  
et *Besnoitia besnoiti* chez les bovins dans la wilaya de Mila

Réalisé par : DEBBOUS Mouad

soutenu le : 30-10-2017

Les membres du jury :

	Nom &Prénom	Grade	Institution
Président	KHELEF	Pr.	ENSV
Promoteur	AZZAG N.	MCA.	ENSV
Copromoteur	GHALMI F.	Pr.	ENSV
Examineur 1	HAFSI F.	MCA.	ENSV
Examineur 2	BOUKHOURS K.	Pr.	ENSV

Année Universitaire : 2017/2018

## **Remerciement**

*Au terme de ce travail, c'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet....*

*Je tiens tout d'abord à remercier cordialement le **Pr KHELEF** d'avoir accepté d'être président du jury de notre mémoire. J'ai toujours admiré l'ampleur de vos connaissances, votre modestie et vos qualités humaines. Veuillez trouver ici, le témoignage de mon admiration et de mon respect.*

*Mes sincères remerciements vont au Professeur **BOUKHORS K**, j'ai toujours admiré en vous l'ardeur et le dévouement scientifique. Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.*

*Je remercie vivement le **Dr. HAFSI F**. Soyez assuré que vous me faites un grand honneur en acceptant de prendre part au présent jury.*

*Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse, **Dr AZZAG N**, pour m'avoir choisi et confié ce travail. Vous avez dirigé cette thèse avec la rigueur scientifique, l'enthousiasme et la persévérance qui sont les vôtres. Aussi grande que puisse être ma gratitude, soyez assurée qu'elle ne sera jamais à la hauteur de tous les efforts que vous avez déployés, je vous témoigne le plus profond de mes plaisirs de travailler avec vous.*

*Mes sincères et chaleureux remerciements vont au **Pr. GHALMI F**, ma co-directrice de thèse, votre aide scientifique inestimable, votre soutien moral, votre compréhension et votre gentillesse m'ont beaucoup marqué, j'ai pris un grand plaisir à travailler avec vous. J'espère que ce modeste travail témoigne de ma profonde reconnaissance et de ma haute considération.*

*Mes plus sincères remerciements vont à l'ensemble du personnel de la bibliothèque de l'ENSV pour leur aide, gentillesse et sympathie.*

## *Dédicace*

*Au nom de Dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce du quel j'ai pu mener à son terme ce travail que je dédie :*

*A mes parents,*

*Pour tout l'amour, la confiance et les valeurs que vous m'avez transmises, pour m'avoir soutenue toutes ces années dans la réalisation de ma vocation, pour avoir fait de notre famille ce qu'elle est aujourd'hui,*

*A mes frères,*

*Pour tous ces moments partagés, pour votre solidarité et votre soutien de tous les instants et pour me faire connaître chaque jour l'immense bonheur de la fraternité,*

*A mes grands-parents,*

*Pour tout l'amour que vous nous avez donné et tout le temps que vous nous avez consacré, pour nous rappeler notre identité, pour tous ces moments de soleil et de famille qui ont bercé notre enfance.*

## Résumé

L'anaplasmose à *Anaplasma marginale* et la besnoitiose à *Besnoitia besnoiti*, deux maladies mondialement distribuées, sont à l'origine de pertes économiques considérables en élevage de bovins. L'objectif de cette étude a été de déterminer les séroprévalences vis-à-vis *Besnoitia besnoiti* et *Anaplasma marginale* d'un cheptel bovin dans deux régions de la wilaya de Mila (Bainnane et Tiberguent). Afin de répondre à notre objectif, les anticorps sériques dirigés contre *A. marginale* ont été recherchés par la technique ELISA de compétition et ceux dirigés contre *Besnoitia besnoiti* par la technique ELISA indirecte pour un total de 182 sérums provenant de 45 bovins de la commune de Bainnane et 147 bovins de la région de Tiberguent. Les données ont été enregistrées dans un fichier Excel puis exportées dans le logiciel SpSS version 20. Le test de Chi-carré de tendance a permis d'analyser les facteurs de risque associés à l'infection des bovins par *Anaplasma marginale*. Les séroprévalences globales d'*A. marginale* et de *Besnoitia besnoiti* obtenues ont été respectivement de 24.72% et 0%.

Les bovins échantillonnés à Bainnane (climat chaud et humide) présentaient la plus forte prévalence (51.4%) vis-à-vis d'*Anaplasma marginale* par rapport à ceux prélevés à Tiberguent (climat subhumide à semi-aride) (18.37%). De plus, il est également apparu que les bovins de plus de 2 ans (33%) étaient significativement plus souvent infectés par *Anaplasma marginale* en comparaison aux jeunes (<1 an) (10.3%). Les fréquences d'infection par *A. marginale* se sont avérées significativement plus élevées dans les élevages de type semi-intensif (35.9%) que dans les élevages intensif (16.3%). La race et le facteur sexe ( $p > 0.05$ ) ne semble pas avoir d'impact.

L'ensemble de ces résultats démontrent, d'une part l'absence totale des anticorps anti-*Besnoitia besnoiti* et d'autre part la présence de l'anaplasmose bovine dans les 2 régions étudiées de la wilaya de Mila sévissant probablement sous forme d'enzootie instable mais des études ultérieures sont nécessaires afin de caractériser les tiques vectrices.

**Mots clés :** *Anaplasma marginale*, *Besnoitia besnoiti*, Séroprévalence, Facteurs de risque, Bovin, ELISA, Mila.

## Abstract

Anaplasmosis at *Anaplasma marginal* and besnoitiosis at *Besnoitia besnoiti* two globally distributed diseases, are causing considerable economic losses in cattle rearing. The objective of this study was to determine the seroprevalence of *Besnoitia besnoiti* and *Anaplasma marginal* of a bovine herd in two regions in the wilaya of Mila (Bainnane and Tiberguent). In order to meet our objective, serum antibodies directed against *A. marginale* were searched by the competition ELISA technique and those directed against *Besnoitia besnoiti* by the indirect ELISA technique for a total of 182 sera from 45 cattle from the commune of Bainnane and 147 cattle from the Tiberguent area. Data on sex, race and age were recorded in an Excel file and then exported to SpSS version 20 software. The trend Chi-square test allowed to analyze the risk factors associated with the infection of cattle by anaplasmosis. The overall seroprevalences of *A. marginal* and *Besnoitia besnoiti* obtained were respectively 24.72% and 0%.

The cattle sampled in Bainnane had the highest prevalence (54.1%) compared with those taken at Tiberguent (18.4%) compared to *Anaplasma marginal*. In addition, it was also found that cattle over 2 years of age (33%) were significantly more infected with *Anaplasma marginal* than young (10.3%) (<1 year). Frequency of *A. marginal* infection was significantly higher in semi-intensive (35.9%) than in intensive (16.3%). Race and gender ( $p > 0.05$ ) did not seem to have an impact.

All these results show, on the one hand, the total absence of anticorps anti-*Besnoitia besnoiti* and on the other hand the presence of bovine anaplasmosis in the 2 regions studied in the wilaya of Mila, unstable enzootic but further studies are needed in order to characteristic the ticks vectors

**Key words:** *Anaplasma marginal*, *Besnoitia besnoiti*, Séroprévalence, risk factors, cattle, ELISA, Mila.

## ملخص

مرض *Anaplasma marginale* ب *Anaplasmosis bovine* و *besnoitiose bovine* ب *besnoitia* هما مرضان منتشران عالمياً، حيث يسببان خسائر اقتصادية كبيرة في تربية الأبقار. كان الهدف من هذه الدراسة، تحديد معدل انتشار *besnoitia besnoiti* و *Anaplasma marginale* عند الأبقار في منطقتين من ولاية ميلة (بينان و تيبيرقنت). من أجل تحقيق هدفنا، قمنا بجمع 182 عينة من بلديتي باينان (45 عينة) و تيبيرقنت (147 عينة) و قمنا بالبحث عن الأجسام المضادة ل *Anaplasma marginale* بتقنية (Elisa compétitif) و الأجسام المضادة ل *besnoitia besnoiti* بتقنية (Elisa indirect). المعطيات المتعلقة بالجنس، العرق و العمر تم حفظها في ملف (Excel) ثم نقلت الي برنامج (SpSS) و ذلك من اجل دراسة عوامل الخطر المتعلقة بالاصابة ب *Anaplasmosis bovine*. معدلات الانتشار العام ل *Anaplasma marginale* و *besnoitia besnoiti* المتحصل عليها كانت (24.72%) و (0%) بالترتيب.

العينات التي اخذت من ابقار بلدية باينان (مناخ حار و رطب) اظهرت اكبر معدل انتشار (51.4%) ل *Anaplasma marginale* مقارنة مع العينات التي اخذت من بلدية تيبيرقنت (مناخ شبه رطب الى شبه جاف) (18.37%). وبالإضافة إلى ذلك، تبين أيضاً أن الأبقار التي يزيد عمرها عن سنتين (33%) كانت أكثر إصابة ب *Anaplasma marginale* مقارنة مع الأبقار التي لم يتعدى عمرها سنة واحدة (10.3%). تواترات الإصابة بانابلازما الهامشية كانت مرتفعة في الاماكن التي يتبع فيها نوع التربية (semi-intensif) (35.9%) مقارنة مع النوع الآخر للتربية (intensif) (16.3%). عامل العرق والجنس لم يظهر أي تأثير ( $p > 0.05$ ).

مجموع هذه النتائج تظهر، من جهة الغياب الكلي للأجسام المضادة (*anti-besnoitia besnoiti*) ومن جهة أخرى تواجد (*Anaplasmosis bovine*) على شكل (enzootie instable) و لهذا يلزم القيام بدراسات مستقبلية لمعرفة القراد الناقل لهذا المرض في كل من منطقتي الدراسة.

**كلمات الدلالية:** ميلة, ELISA, الأبقار, عوامل الخطر, المسح المصلي, *besnoitia besnoiti*, *Anaplasma mariginale*

## Liste des tableaux

Tableau 01 : Séroprévalence de l'infection par <i>besnoitia besnoiti</i> dans certains pays du monde.	14
Tableau 02 : Ancienne classification de l'ordre des Rickettsiales.	37
Tableau 03 : Nouvelle classification proposée par Dumler et al en 2001.	38
Tableau 04 : Principaux vecteurs de tique d' <i>Anaplasma marginale</i> dans différents pays du monde.	44
Tableau 05 : Séroprévalence de l'infection par <i>Anaplamsa marginale</i> dans certains pays du monde.	46
Tableau 06 : Comparaison des différents tests de diagnostic sérologique.	56
Tableau 07 : Nombres de fermes et de bovins prélevés par commune et par localité.	64
Tableau 08 : Séroprévalence globale de l'infection par <i>Anaplasma marginale</i> .	68
Tableau 09 : Répartition des bovins séropositifs en fonction de leurs titres en Anticorps.	69
Tableau 10 : Analyse de certains facteurs de risque potentiels susceptibles d'influencer la séroprévalence d' <i>A. marginale</i>	72

## Liste des figures

Figure 01 : Place de <i>Besnoitia besnoiti</i> dans la classification	6
Figure 02 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences de l'ADNr de la petite sous-unité ribosomale	7
Figure 03 : Les fragments ITS-1 et l'ARN ribosomal 18S	7
Figure 04 : Arbre phylogénétique construit à partir de la région ITS-1 des différentes espèces du genre <i>Besnoitia</i> . Huit <i>Besnoitia</i> sur dix sont présentés avec leurs hôtes naturels connus. La barre d'échelle indique la distance génétique	8
Figure 05 : Cycle et transmission de <i>Besnoitia besnoiti</i>	10
Figure 06 : Répartition de la besnoitiose dans le monde	11
Figure 07 : Pays où ont été décrits des cas de besnoitiose bovine	12
Figure 08 : Principaux vecteurs de la besnoitiose. A : <i>Stomoxys calcitrans</i> (Mouche d'étable) ; B : <i>Tabanus spp</i> (taon)	13
Figure 09 : Pathogénie de la besnoitiose. Les actions du parasite apparaissent en violet, tandis que les effets de ces actions apparaissent en bleu. Les symptômes observés apparaissent en orange souligné.	18
Figure 10 : Phase fébrile : A : photophobie, epiphora et B : écoulements séreux.	20
Figure 11 : Phase des œdèmes, A : œdèmes déclives sur les membres; B : plissements et hyperkératose au niveau des bourses testiculaires; C : zones violacées à la base des trayons.	21
Figure 12 : Phase de sclérodermie chez des bovins atteints de besnoitiose. A : Kystes oculaires sur la sclère conjonctivale, indiqués par la flèche noire; B : Kystes observés lors d'une biopsie de vulve; C : Lichénification; D : Epaissement et plissement cutané.	23
Figure 13 : Schéma de mesures de gestion couplé au diagnostic pour le contrôle de la besnoitiose bovine.	34
Figure 14 : Représentation schématique du cycle de vie d' <i>A. marginale</i> chez le bovin et les tiques.	40
Figure 15 : Répartition mondiale de l'anaplasmose.	43
Figure 16 : Erythrocytes bovins infectés par <i>Anaplasma marginale</i> . A : Les corps d'inclusion situés à la périphérie de l'érythrocyte dans un frottis de sang coloré. B : Un érythrocyte infecté avec cinq corps d'inclusion d' <i>A. marginale</i> . Microphotographie électronique.	49

Figure 17: Situation géographique des régions concernées par l'étude. B : Bainnane ;T :Tiberguent.	63
Figure 18 : Procédure de Préparation du sérum.	65
Figure 19 : Détection des IgG contre <i>Anaplasma marginale</i> par communes.	69
Figure 20 : Variation de la séroprévalence d' <i>A. Marginale</i> en fonction de l'âge.	70
Figure 21 : Variation de la séroprévalence d' <i>A. Marginale</i> en fonction de type du climat	71
Figure 22 : Variation de la séroprévalence d' <i>A. Marginale</i> en fonction de type d'élevage	71
Figure 23 : Variation de la séroprévalence d' <i>A. Marginale</i> en fonction de localité d'élevage.	72

## Liste des abréviations

**ELISA** : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**EFSA** : European Food Safety Authority

**ITS-1** : Internal Transcribed Spacers

**ARN** : Acide ribonucléique

**ETS**: External Transcribed Spacers

**IGS** : non-transcribed intergenic spacers

**B** : *Besnoitia*

**A** : *Anaplasma*

**HD**: hôte définitif

**IgM**: Immunoglobuline M

**IgG** : Immunoglobuline G

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**UV** :Ultra-Violet

**OIE** : Office international des épizooties

**MSP** :Major surface protéin

**R** : *Rhipicephalus*

**CD4** : Cluster of Differnciation

**TNF**: Tumor necrosis factor

**NO** : Monoxyde d'azote

**AGB** : Anaplasmosse granulocytaire bovine

**FC** : Fixation du complément

**CAT** : Agglutination sur carte

**IFI**: Immunofluorescence indirecte

**c-ELISA** : ELISA compétitif

**qPCR** : PCR quantitative

**ul** : microlitre

**HI** : Hôte Intermédiaire

**kg** : kilogramme

**nm** : Nanomètre

**WB** : Western Blot

# Sommaire

<b>Résumé</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Listes des abréviations</b>	
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Partie bibliographique</b>	<b>3</b>
<b>I. Etude bibliographique de la besnoitiose</b>	<b>3</b>
<b>1. Présentation générale</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Définition</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Histoire et découverte</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Importance</b>	<b>4</b>
<b>1.4. Agent étiologique</b>	<b>5</b>
<b>1.4.1. Taxonomie</b>	<b>5</b>
<b>1.4.2. Cycle biologique</b>	<b>9</b>
<b>1.4.2.1. Cycle primaire HD-bovin</b>	<b>9</b>
<b>1.4.2.2. Cycle secondaire de bovin contaminé à bovin sain</b>	<b>10</b>
<b>1.5. Epidémiologie</b>	<b>11</b>
<b>1.5.1. Répartition géographique</b>	<b>11</b>
<b>1.5.1.1. Répartition mondiale</b>	<b>11</b>
<b>1.5.2. Transmission du parasite</b>	<b>12</b>
<b>1.5.2.1. Transmission par des insectes hématophages</b>	<b>12</b>
<b>1.5.2.2. Autres modes de transmission non clarifiés</b>	<b>13</b>
<b>1.5.3. Prévalence et facteurs de réceptivités</b>	<b>14</b>
<b>1.5.3.1. Prévalence</b>	<b>14</b>
<b>1.5.3.2. Facteurs de réceptivités et de sensibilités</b>	<b>15</b>
<b>2. Etude clinique</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Pathogénie</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Immunité</b>	<b>18</b>
<b>2.3. Symptomatologie</b>	<b>19</b>
<b>2.3.1. Phase fébrile</b>	<b>19</b>

<b>2.3.2. Phase des œdèmes</b>	<b>20</b>
<b>2.3.3. Phase de sclérodermie</b>	<b>21</b>
<b>3. Diagnostic</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Suspicion épidémiologique-clinique</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Diagnostic différentiel</b>	<b>25</b>
<b>3.2.1. Pendant la phase fébrile</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2. Pendant la phase des œdèmes</b>	<b>25</b>
<b>3.2.3. Pendant la phase chronique (sclérodermie)</b>	<b>26</b>
<b>3.3. Diagnostic de laboratoire</b>	<b>27</b>
<b>3.3.1. Diagnostic direct</b>	<b>27</b>
<b>3.3.1.1. Examen histologique</b>	<b>27</b>
<b>3.3.1.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)</b>	<b>27</b>
<b>3.3.2. Diagnostic indirect</b>	<b>28</b>
<b>3.3.2.1. IFI</b>	<b>29</b>
<b>3.3.2.2. Test d'agglutination directe</b>	<b>29</b>
<b>3.3.2.3. Test ELISA</b>	<b>29</b>
<b>3.3.2.4. Western Blot</b>	<b>30</b>
<b>4. Méthodes de contrôles</b>	<b>31</b>
<b>Ii. Etude bibliographique de l'anaplasmose</b>	<b>35</b>
<b>1. Présentation générale</b>	<b>35</b>
<b>1.1. Définition</b>	<b>35</b>
<b>1.2. Histoire et découverte</b>	<b>35</b>
<b>1.3. importance</b>	<b>36</b>
<b>1.4. Agent pathogène</b>	<b>36</b>
<b>1.4.1. Place d'<i>Anaplasma marginale</i> dans la taxonomie</b>	<b>36</b>
<b>1.4.2. Cycle biologique</b>	<b>38</b>
<b>1.4.2.1. Chez l'hôte vertébré</b>	<b>38</b>
<b>1.4.2.2. Chez la tique</b>	<b>39</b>
<b>1.4.3. Pouvoir antigénique</b>	<b>40</b>
<b>1.5. Epidémiologie</b>	<b>42</b>
<b>1.5.1. Répartition géographique</b>	<b>42</b>
<b>1.5.1.1. Répartition mondiale</b>	<b>42</b>
<b>1.5.1.2. En Algérie</b>	<b>43</b>

<b>1.5.2. Transmission</b>	<b>43</b>
<b>1.5.3. Prévalence et facteurs de réceptivités</b>	<b>46</b>
<b>1.5.3.1. Prévalence</b>	<b>46</b>
<b>1.5.3.2. Facteurs de réceptivités</b>	<b>46</b>
<b>1.5.4. Stabilité endémique</b>	<b>47</b>
<b>2. Etude clinique</b>	<b>48</b>
<b>2.1. Pathogénie</b>	<b>48</b>
<b>2.2. Immunité</b>	<b>49</b>
<b>2.2.1. Réponse en anticorps</b>	<b>49</b>
<b>2.2.2. Réponse cellulaire</b>	<b>50</b>
<b>2.2.2.1. Mécanismes généraux de la réponse cellulaire</b>	<b>50</b>
<b>2.2.2.1. Synergie entre les protéines</b>	<b>52</b>
<b>2.3. Symptomatologie</b>	<b>53</b>
<b>3. Diagnostic</b>	<b>54</b>
<b>3.1. Diagnostic bactériologique</b>	<b>54</b>
<b>3.2. Diagnostic sérologique</b>	<b>54</b>
<b>3.2.1. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)</b>	<b>55</b>
<b>3.2.2. Test de fixation du complément</b>	<b>55</b>
<b>3.2.3. Agglutination sur carte</b>	<b>55</b>
<b>3.2.4. Immunofluorescence indirecte</b>	<b>55</b>
<b>3.3. Diagnostic moléculaire (Réaction de Polymérase en Chaîne)</b>	<b>56</b>
<b>4. Méthodes de contrôles</b>	<b>58</b>
<b>4.1. Chimiothérapie</b>	<b>58</b>
<b>4.2. Contrôle des arthropodes</b>	<b>58</b>
<b>4.3. Vaccination</b>	<b>59</b>
<b>4.3.1. Vaccins vivants</b>	<b>59</b>
<b>4.3.2. Vaccins inactivés</b>	<b>60</b>
<b>4.4. Maintenance de troupeaux sans anaplasnose</b>	<b>60</b>
<b>Partie expérimentale</b>	<b>61</b>
<b>1. Objectif de l'étude</b>	<b>61</b>
<b>2. Matériel et méthodes</b>	<b>62</b>
<b>2.1. Région d'étude</b>	<b>62</b>
<b>2.2. Récolte des échantillons</b>	<b>63</b>

<b>2.3. Description du cheptel prélevé</b>	<b>64</b>
<b>2.4. Préparation des prélèvements</b>	<b>64</b>
<b>2.5. Analyses sérologiques</b>	<b>65</b>
<b>2.5.1. Pour la recherche des anticorps anti-<i>Anaplasma marginale</i></b>	<b>65</b>
<b>2.5.2. Pour la recherche des anticorps anti-<i>Besnoitia besnoiti</i></b>	<b>66</b>
<b>2.6. Saisie des données et analyses statistiques</b>	<b>67</b>
<b>3. Résultats</b>	<b>68</b>
<b>3.1. <i>Besnoitia besnoiti</i></b>	<b>68</b>
<b>3.2. <i>Anaplasma marginale</i></b>	<b>68</b>
<b>3.2.1. Etude de séroprévalence</b>	<b>68</b>
<b>3.2.1.1. Séroprévalence globale</b>	<b>68</b>
<b>3.2.1.2. Séroprévalence par commune</b>	<b>68</b>
<b>3.2.1.3. Séroprévalence en fonction des titres en anticorps</b>	<b>69</b>
<b>3.2.2. Etude des facteurs de risques</b>	<b>69</b>
<b>4. Discussion</b>	<b>74</b>
<b>4.1. Méthode d'échantillonnage</b>	<b>75</b>
<b>4.2. Durée d'échantillonnage</b>	<b>75</b>
<b>4.3. Méthodes de diagnostic employées</b>	<b>75</b>
<b>4.3.1. Pour <i>Besnoitia besnoiti</i></b>	<b>75</b>
<b>4.3.2. Pour <i>Anaplasma marginale</i></b>	<b>76</b>
<b>4.4. Comparaison des résultats avec la littérature et interprétations</b>	<b>77</b>
<b>4.4.1. Séroprévalence vis-à-vis d'<i>Anaplasma marginale</i></b>	<b>77</b>
<b>4.4.1.1. Séroprévalence globale</b>	<b>77</b>
<b>4.4.1.2. Séroprévalence par régions d'élevage</b>	<b>78</b>
<b>4.4.1.3. Étude des facteurs de risque associés</b>	<b>78</b>
<b>4.4.2. Séroprévalence vis-à-vis de <i>Besnoitia besnoiti</i></b>	<b>80</b>
<b>Conclusion</b>	<b>82</b>
<b>Bibliographie</b>	
<b>Annexe</b>	

## INTRODUCTION GENERALE

Les arthropodes et les maladies dont ils sont les vecteurs demeurent un important facteur limitant la production animale dans les pays tropicaux et subtropicaux (BRAM, 1983 ; MINJAUW et LEOD A, 2003). Ils sont responsables de pertes directes (lésions cutanées et action hématophage), et indirectes (morbidité et mortalité causées par les maladies transmises) (RASULOV, 2007). DE CASTRO en 1997 a estimé que le coût global annuel induit par les arthropodes et les maladies transmises était compris entre 13,9 milliards et 18,7 milliards de dollars.

Parmi les maladies vectorielles potentiellement émergentes l'Anaplasmose et la Besnoitiose bovine, elles constituent une contrainte importante pour le développement et l'amélioration de l'élevage bovin en Afrique et dans d'autres régions du globe. Leur épidémiologie est régie par des interactions complexes impliquant les vecteurs, l'hôte et l'environnement (NORVAL *et al.*, 1992). Des facteurs tels que les variations climatiques, l'irrigation ainsi que l'utilisation des pâturages et du couvert végétal peuvent jouer un rôle majeur en raison de leurs effets sur la répartition et l'abondance des tiques et des insectes hématophages (GUBLER D.J, 1988 ; PATZ J.A *et al.*, 2000 ; SUTHERST R.W, 2004).

Dans la wilaya de Mila, la politique d'irrigation liée à la construction de barrage Beni Harroune a entraîné des changements microclimatiques des régions telles que Bainnane et Tiberguent favorisant ainsi le développement et la survie de plusieurs espèces d'arthropodes et une éventuelle augmentation de la prévalence des maladies transmises par ces derniers.

A l'heure actuelle, les données disponibles sur la besnoitiose et l'anaplasmose bovine sont insuffisantes et nécessitent d'être actualisées en terme de leur distribution, la prévalence et l'importance économique dans notre pays.

Afin d'établir un état des lieux vis à vis de ces deux pathologies en Algérie, une enquête sérologique de type transversale a été réalisée durant le mois de mars 2017 dans quelques élevages des 2 communes étudiées de la wilaya de Mila dont celles de Bainnane et de Tiberguent. Dans cette étude, il sera question de déterminer la séroprévalence et les facteurs de risque associés.

La première partie de ce travail est une étude bibliographique dans laquelle est réalisé un bilan sur les connaissances actuelles sur la besnoitiose et l'anaplasmose bovine, en insistant notamment sur les aspects étiologiques, épidémiologiques, immunologiques, cliniques ainsi que le diagnostic et les moyens de lutte.

Dans la deuxième partie, nous aborderons la partie expérimentale. Nous décrirons en premier lieu le protocole de l'étude en détail puis nous présenterons les résultats obtenus. Enfin, nous conclurons ce travail de magistère par une discussion et des perspectives.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA BESNOITIOSE

## 1. Présentation générale

### 1.1. Définition

La besnoitiose est une maladie infectieuse parasitaire et vectorielle des bovins, due au protozoaire *Besnoitia besnoiti*. Il s'agit d'une coccidie identifiée pour la première fois en 1912 par Besnoit et Robin à l'école nationale vétérinaire de Toulouse, et qui est responsable de la formation de nombreux kystes dans différents tissus de l'organisme (ESQUERRE, 2015). Les bovins sont des hôtes intermédiaires du parasite, l'hôte définitif étant simplement suspecté aujourd'hui : on considère traditionnellement qu'il s'agit du chat ou du lynx mais ces informations sont aujourd'hui remises en question (JACQUIET *et al.*, 2010). Une étude récente a trouvée des séquences d'ADN de type *Besnoitia* dans un échantillon fécal d'une chauve-souris, ce qui peut justifier une investigation plus poussée (HORNOK *et al.*, 2015a). La maladie touche plus particulièrement les jeunes animaux (entre deux et quatre ans notamment), et se manifeste cliniquement par trois phases successives : la phase fébrile, la phase d'œdème et la phase de sclérodermie (ALZIEU, 2007a).

Encore peu connue aujourd'hui, il nous reste beaucoup d'interrogations à lever sur cette affection, afin de pouvoir mettre en place des méthodes de lutte efficace qui permettront d'endiguer sa progression (ESQUERRE, 2015).

**1.2. Histoire et découverte** (FERRIE J, 1984 ; FRANC M, 1987 ; LEGRAND P, 2003 ; JACQUIET *et al.*, 2010 ; ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013) :

**Depuis l'Antiquité**, la besnoitiose bovine intrigue et fascine. Les premières descriptions datent de la fin du IV<sup>e</sup> siècle, lorsque VEGECE énonce les symptômes de la phase terminale de la maladie qu'il dénomme alors éléphantiasis.

**En 1817**, SANTIN, vétérinaire dans le Tarn, décrit d'une manière très imagée les phases d'œdèmes et de sclérodermie : « en ces endroits où il existe des engorgements, le dessèchement de la peau prend l'apparence d'un cuir tanné, elle tombe en lambeaux et s'exfolie comme l'écorce d'un platane ».

**En 1840**, GELLE, après avoir étudié quelques cas chroniques sévères de la maladie, la définit comme une lèpre, une lèpre éléphantiasique ou bien encore d'éléphantiasis tuberculeux.

**En 1843**, LAFORE fait la distinction entre une phase aiguë et une phase chronique de la maladie.

**En 1858**, LAFOSSE distingue 3 phases : début, état, et déclin.

**En 1869**, CRUZEL nous expose les premiers éléments épidémiologiques : « l'éléphantiasis pourrait être une de ces affections que l'on attribue à la présence d'insectes ou de zoophytes microscopiques ».

**En 1912**, BESNOIT et ROBIN, professeurs à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, isolent le parasite à partir de lésions cutanées, et prouvent ainsi l'étiologie parasitaire de la besnoitiose.

**En 1936**, CUILLE arrive à transmettre la maladie à des bovins sains à partir d'injection intraveineuse de sang de bovins contaminés en phase fébrile.

**En 1954**, POLS réalise une étude approfondie sur la maladie, et permet l'isolement du protozoaire dans le sang de bovins contaminés en phase fébrile.

**En 1968**, BIGALKE expose l'aspect contagieux de la maladie entre bovins, et démontre l'importance de vecteurs mécaniques dans la transmission.

**En 1974**, PETESHEV propose un cycle épidémiologique avec pour hôte définitif le chat, le bovin étant l'hôte intermédiaire. Cependant, ses résultats n'ont pas été démontrés par des études ultérieures. L'hôte définitif demeure encore inconnu. Le mode de transmission majoritaire de bovin à bovin se réaliserait par la piqûre d'insectes hématophages.

### **1.3. Importance**

La besnoitiose bovine a suscité peu d'intérêt jusqu'à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle. Aujourd'hui, on la considère comme une maladie vectorielle émergente en Europe, et en forte extension géographique (EFSA, 2010). C'est une maladie très préoccupante d'un point de vue médical et zootechnique qui risque d'affecter les échanges nationaux et internationaux. La besnoitiose bovine s'achète et doit donc être systématiquement dépistée lors de nouvelles transactions (ALZIEU *et al.*, 2011).

La mortalité due à la besnoitiose est faible, inférieure à 10 % (EFSA, 2010). Cependant, les pertes économiques sont lourdes puisque la forme clinique de la maladie s'accompagne de pertes de production majeures et les animaux atteints deviennent des non-valeurs économiques même s'ils ne meurent pas. Et bien que la plupart des animaux ne développent pas de besnoitiose clinique, ils constituent un réservoir de bradyzoïtes que les insectes piqueurs vont pouvoir transmettre aux animaux sains. La propagation de la maladie est alors insidieuse, et lorsqu'un cas clinique se déclare, la prévalence dans l'élevage concerné est déjà importante, limitant les moyens de lutte et augmentant leurs coûts (FLORENTIN, 2016). De plus, les taureaux atteints présentent une infertilité transitoire ou définitive (KUMI-DIAKA *et*

*al.*, 1981) qui peut être responsable de pertes économiques considérables dans les systèmes d'élevages extensifs ou pastoraux pratiquant la monte naturelle.

## **1.4. Agent étiologique**

### **1.4.1. Taxonomie : une phylogénie obscure**

*Besnoitia besnoiti* est un protozoaire appartenant à l'embranchement des Apicomplexa et à la famille des Sarcocystidae. De cette famille résulte deux sous-famille : les Sarcocystinae d'une part, où l'on retrouve les genres *Sarcocystis* et *Frenkelia* ; les Toxoplasmatinae d'autre part, où l'on retrouve les genres *Hammondia*, *Neospora*, *Toxoplasma*, et *Besnoitia* (FRENKEL, 1977 ; TENTER et JOHNSON, 1997) (Figure 01).

Dix espèces sont décrites au sein du genre *Besnoitia*, mais le statut taxonomique reste douteux pour certaines d'entre elles. On compte quatre espèces pouvant infecter les grands mammifères (*B.besnoiti*, *B.caprae*, *B.tarandi*, *B.benetti*) : bétail, chèvres, chevreuils, rennes, caribous, chevaux,...et six espèces infectant les petits mammifères (*B. wallacei*, *B.jelisoni*, *B.darlingi*, *B.akodoni*, *B.neotomofelis* et *B.oryctofelisi*) : singes, opossums, lapins, rongeurs,... (JACQUIET *et al.*, 2010; OLIAS *et al.*, 2011). Les lézards peuvent aussi être infectés (JACQUIET *et al.*, 2010).

D'après les analyses moléculaires des fragments Internal Transcription Spacer 1 (ITS-1) et de l'ARN ribosomal 18S (Figure 02 et 03), ces espèces seraient phylogénétiquement proches des genres *Neospora*, *Hammondia* et *Toxoplasma* (ELLIS *et al.*, 2000). A l'intérieur même du genre, la variabilité génétique du fragment ITS-1 est en faveur d'une dichotomie entre les espèces infectant les grands mammifères tels que les ongulés (*besnoiti*, *benetti*, *caprae*, *tarandi*) et celles infectant les petits mammifères tels que les rongeurs, lagomorphes et marsupiaux (*darlingi*, *jellisoni*, *wallacei*, *oryctofelisi*, *akodoni*, *neotomofelis*) (JACQUIET *et al.*, 2010; OLIAS *et al.*, 2011).

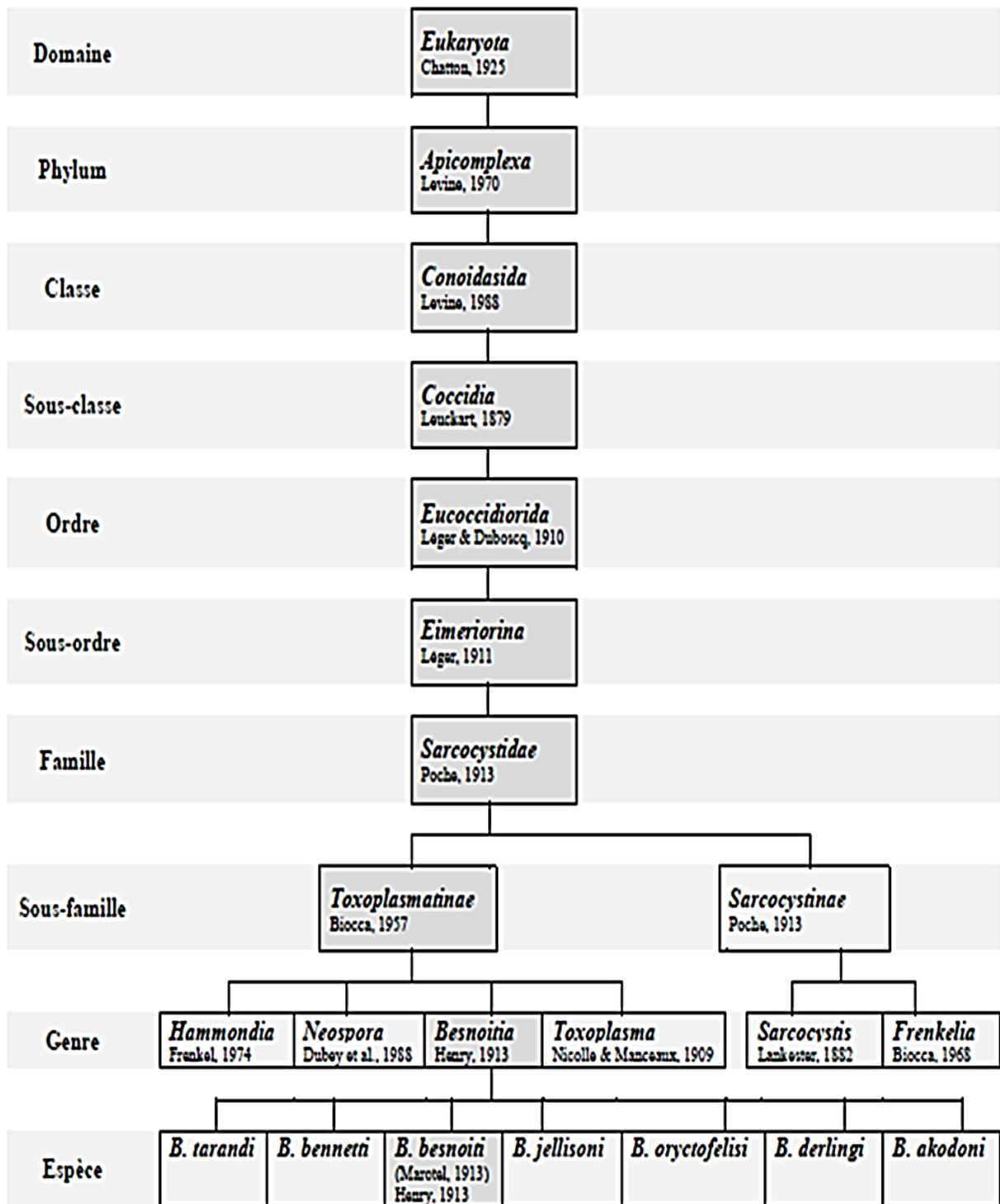


Figure 01 : Place de *Besnoitia besnoiti* dans la classification (EUZEBY, 1987 ; DUBEY *et al.*, 2004).

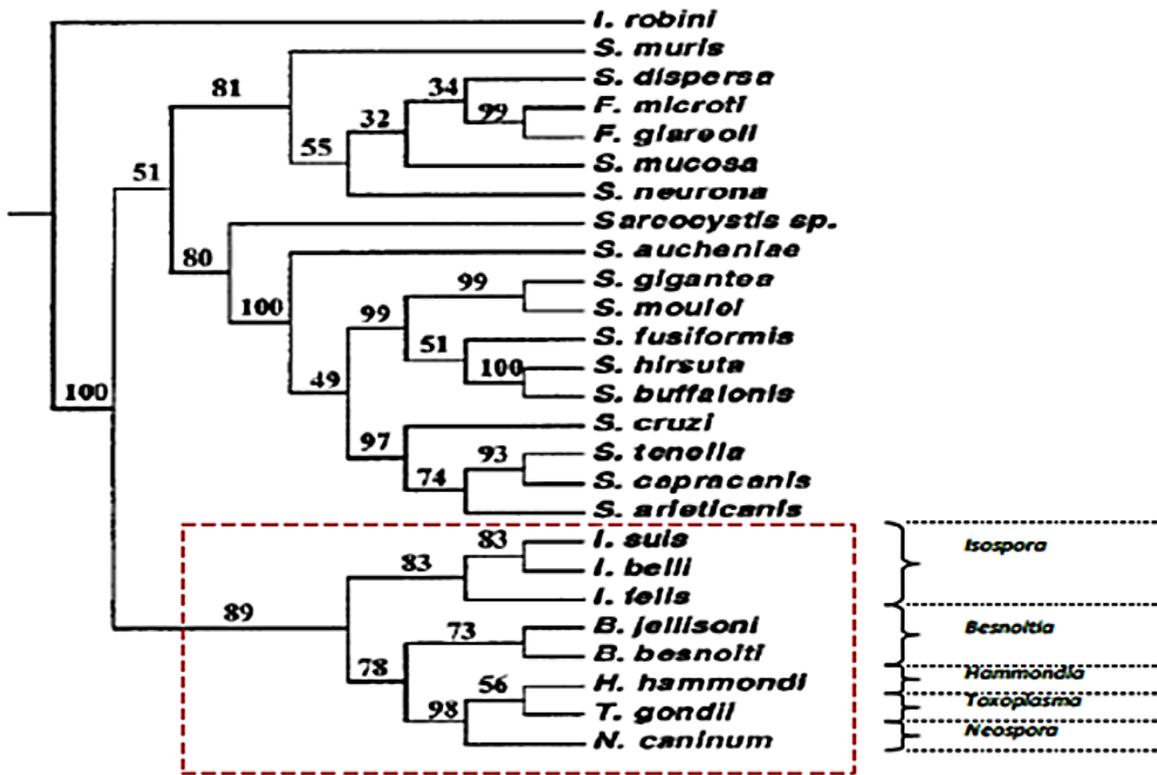


Figure 02 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences de l'ADNr de la petite sous-unité ribosomale (ELLIS *et al.*, 2000).

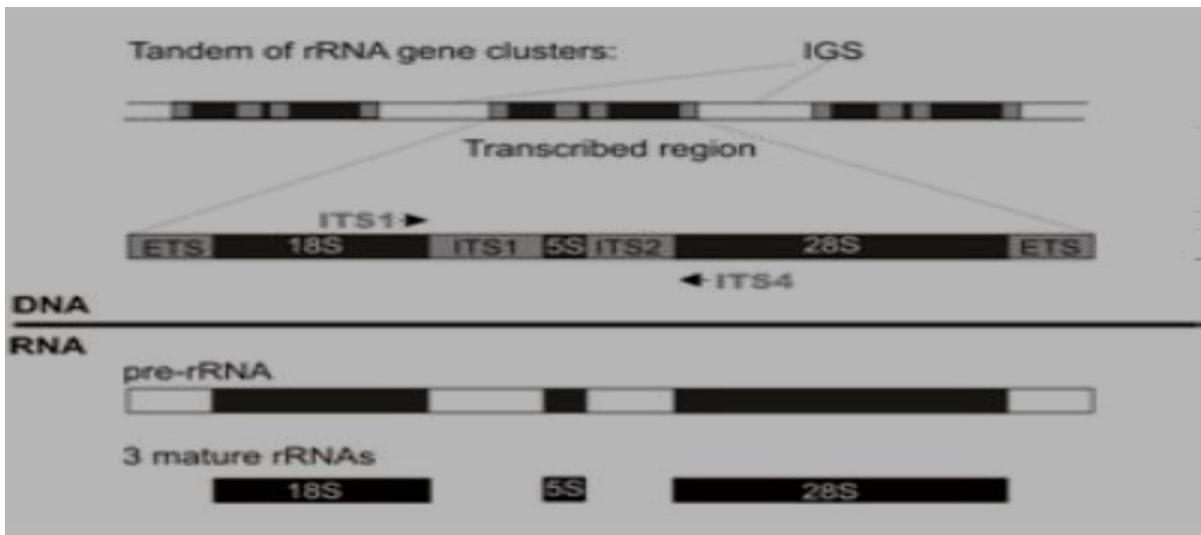


Figure 03 : Les fragments ITS-1 et l'ARN ribosomal 18S (modifié d'après KORABECNA, 2007)

ITS = Internal Transcribed Spacers (espaces internes transcrits) - ETS = External Transcribed Spacers (espaces externes transcrits) - IGS = non-transcribed intergenic spacers (espaces intergéniques non transcrits)

D'autres questions se posent au sein même de l'espèce *B. besnoiti*. Ainsi, l'étude moléculaire de ce même fragment laisse à penser que *B. caprae* et *B. besnoiti* ne seraient en fait qu'une seule et même espèce : elles présentent des fragments ITS-1 identiques. Leurs morphologies sont également identiques, malgré des propriétés biologiques différentes (les rongeurs peuvent être infectés par *B. besnoiti* mais pas par *B. caprae*). Par ailleurs, une étude comparative entre deux parasites *B. besnoiti* isolés d'un bovin et d'une antilope, basée sur l'électrophorèse de 8 enzymes, serait en faveur de l'existence de deux souches distinctes (JACQUIET *et al.*, 2010). Elles présentent une immunité proche et des fragments ITS 1 également identiques (Ellis *et al.*, 2000), mais la souche de l'antilope serait moins pathogène que la souche bovine. La différence entre ces deux souches pourrait être due à des variations géographiques ou de l'hôte (JACQUIET *et al.*, 2010).

La phylogénie de *Besnoitia besnoiti* demeure donc encore obscure (Figure 04), et de nombreuses études restent à faire pour mieux connaître ce parasite et sa taxonomie.

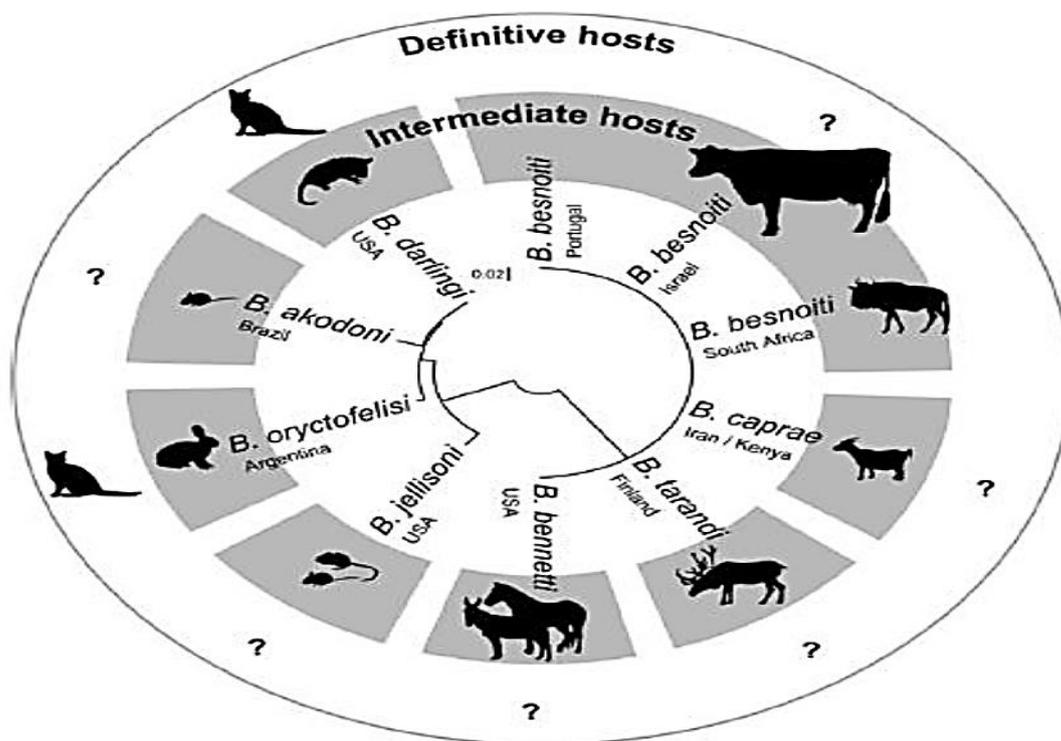


Figure 04 : Arbre phylogénétique construit à partir de la région ITS-1 des différentes espèces du genre *Besnoitia*. Huit *Besnoitia* sur dix sont présentés avec leurs hôtes naturels connus. La barre d'échelle indique la distance génétique (OLIAS *et al.*, 2011).

## 1.4.2. Cycle biologique

*Besnoitia besnoiti* présente un cycle coccidien hétéroxène intestinal classique avec schizogonie et gamogonie chez l'hôte définitif (HD), aboutissant à la production d'ookystes excrétés dans le milieu extérieur. Toutefois, ce cycle serait minoritaire par rapport au cycle monoxène entre bovins (ALZIEU, 2007b).

### 1.4.2.1. Cycle primaire HD-bovin : un cycle minoritaire et encore peu connu

Même si le cycle chez l'hôte définitif n'a jamais pu être mis en évidence, on suppose que celui-ci fonctionne comme pour les autres coccidies, et notamment *Toxoplasma gondii*.

Ainsi, l'hôte définitif se contaminerait par ingestion de kystes à bradyzoïtes contenus dans les tissus musculaires de ses proies, ou d'ookystes libérés dans l'environnement par un autre hôte définitif. Sous l'action des sucs digestifs, les kystes libèrent les bradyzoïtes et sporozoïtes. Ils pénètrent dans les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et subissent une schizogonie (reproduction asexuée), puis une gamogonie (reproduction sexuée). Cette dernière aboutit à la formation d'un zygote, qui s'entoure d'une coque pour former un ookyste. L'ookyste est ensuite excrété dans le milieu extérieur, où survient la sporogonie : l'oeuf se divise en deux sporocystes qui donneront chacun quatre sporozoïtes (BEUGNET et BOURDOISEAU, 2005; DUBEY, 1998; FRANC et CADIERGUES, 1999).

Dans le cas du cycle primaire, le bovin se contaminerait par ingestion d'ookystes sporulés via des végétaux ou des céréales souillées par les fèces de l'hôte définitif (FRANC et CADIERGUES, 1999). Une fois parvenus dans le tube digestif, les sporozoïtes contenus dans les kystes sont libérés et traversent la muqueuse intestinale pour gagner les cellules endothéliales.

Ils se transforment alors en tachyzoïtes, formes végétatives du parasite, qui se multiplient par un type particulier de schizogonie : l'endodyogenèse (où deux tachyzoïtes fils se forment au sein d'un tachyzoïte mère) (BIGALKE, 1981). Ils forment ensuite des pseudo-kystes qui conduisent à la destruction des cellules hôtes et à la sortie des tachyzoïtes. Ceux-ci se retrouvent libres dans le sang ou pénètrent dans les monocytes ou neutrophiles (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013), puis envahissent les cellules endothéliales des capillaires, des noeuds lymphatiques, du foie, de la rate, des conjonctives, de la muqueuse nasale, des testicules et de la peau (ALZIEU, 2007b). On se trouve alors entre le quatrième et le huitième jour après infection, période caractérisée par une intense parasitémie.

Les tachyzoïtes colonisent ensuite des cellules d'origine mésenchymateuse (histiocytes, fibroblastes, myofibroblastes, cellules endothéliales et musculaires) (ÁLVAREZ-GARCIA *et*

al., 2013), où ils sont convertis en bradyzoïtes. La multiplication des bradyzoïtes à l'intérieur de ces cellules conduit à la formation de kystes globuleux, mûrs au bout de la dixième semaine post-infection et qui peuvent persister plus de dix ans (ALZIEU, 2007b; FRANC et CADIERGUES, 1999; TRINH, 2002).

#### 1.4.2.2. Cycle secondaire de bovin contaminé à bovin sain : un cycle majoritaire et mieux connu

C'est en 1960 que Bigalke envisage pour la première fois la possibilité d'une transmission vectorielle de la besnoitiose entre deux bovins, avant de confirmer cette hypothèse en 1968. En effet, les bradyzoïtes issus des kystes cutanés peuvent être transmis mécaniquement d'un animal infecté à un animal sain par des insectes piqueurs comme les tabanidés et les stomoxes (ALZIEU et JACQUIET, 2010; FRANC et CADIERGUES, 1999; LIENARD *et al.*, 2011) . Ce cycle est dominant par rapport au cycle primaire, et explique la saisonnalité marquée de la maladie ainsi que son allure pseudo-contagieuse (ALZIEU, 2007b, 2009) (Figure 05).

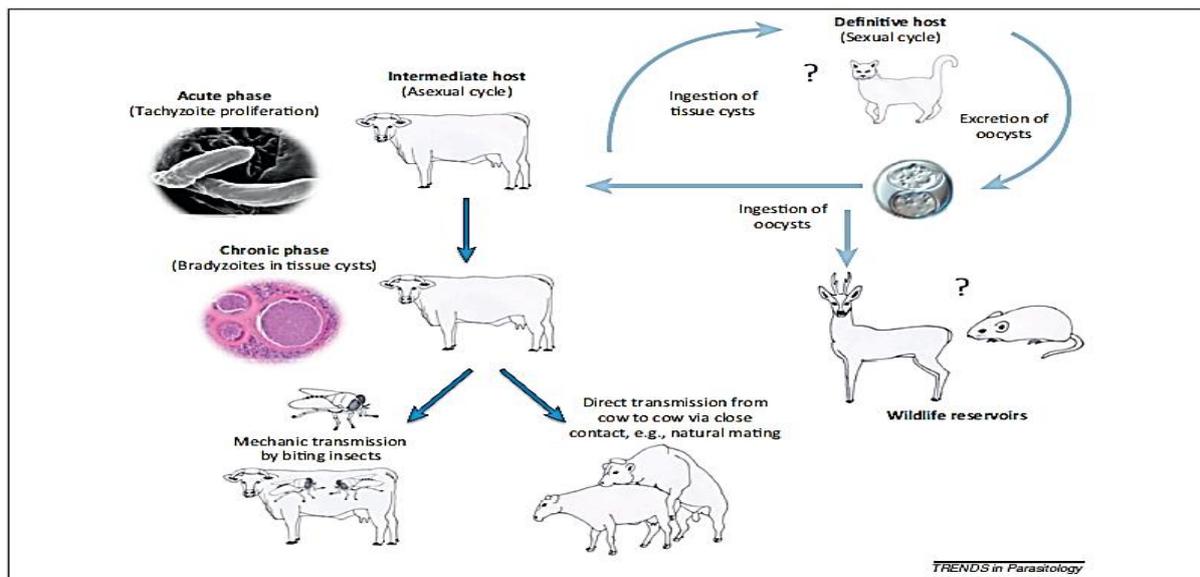


Figure 05 : Cycle et transmission de *Besnoitia besnoiti* (modifié d'après (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013).

## 1.5. Epidémiologie

### 1.5.1. Répartition géographique

#### 1.5.1.1. Répartition mondiale

Même si la première description du parasite a eu lieu en France, il s'agit principalement d'une maladie des pays chauds (Figure 06). Ainsi, elle a été décrite en Afrique Sub-Saharienne et en Asie. En Europe, les pays méditerranéens sont les principaux affectés, avec le Portugal (FRANCO et BORGES, 1915 ; CORTES *et al.*, 2005), l'Espagne (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009), l'Italie (AGOSTI *et al.*, 1994) et la France (BESNOIT et ROBIN, 1912). Mais ces dernières années, de nouveaux foyers ont été décrits en Allemagne (MEHLHORN *et al.*, 2009), en Suisse (LESSER *et al.*, 2012), et en Irlande (RYAN *et al.*, 2016) suggérant une extension de la maladie (Figure 07).

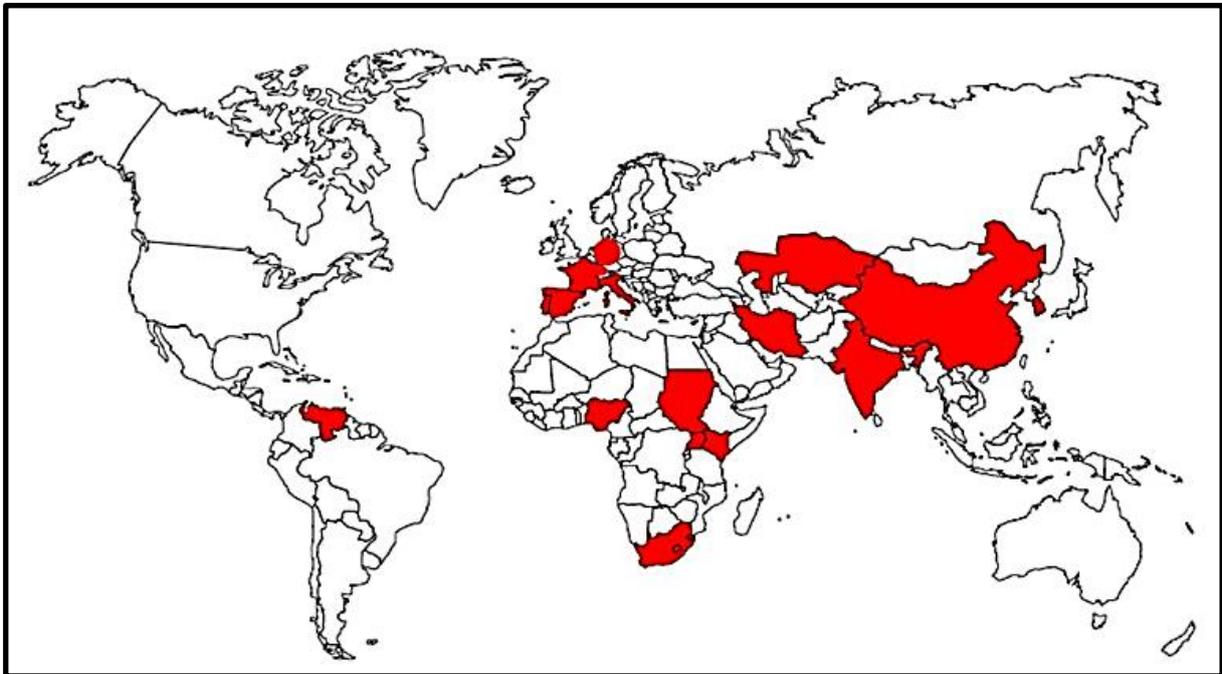


Figure 06 : Répartition de la besnoitiose dans le monde (modifié d'après THOMAS, 2007)



Figure 07 : Pays où ont été décrits des cas de besnoitiose bovine (d'après RYAN *et al.*, 2016 ; EFSA, 2010 ; THOMAS, 2007).

### 1.5.2. Transmission du parasite

La connaissance des modes de transmission reste un défi pour les chercheurs (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013) et le rôle possible des arthropodes (HORNOK *et al.*, 2015) et des ruminants sauvages (GUTIERREZ-EXPOSITO *et al.*, 2013 , 2016) dans l'épidémiologie de la maladie est une préoccupation majeure.

#### 1.5.2.1. Transmission par des insectes hématophages

Actuellement, le seul mode avéré de transmission du parasite est une transmission mécanique via des insectes piqueurs qui inoculent des bradyzoïtes aux bovins, par voie transcutanée (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013 ; PAPADOPOULOS *et al.* 2014).

Les vecteurs mis en jeu sont les tabanidés (*Atylotus nigromaculatus*, *Tabanocella denticornis*, *Haematopota albikinta*) et les mouches d'étable (*Stomoxys calcitrans*) (Figure 08). Les tabanidés semblent être plus compétents que les mouches d'étables. En effet, le volume des pièces buccales de *Stomoxys calcitrans* est 32 fois plus petit que celui des tabanidés, respectivement 0,4 ml et 12,5 ml (LIENARD *et al.*, 2012). Plus de 52 000 piqûres de *Stomoxys calcitrans* sont nécessaires pour provoquer l'infection, alors que seulement 3 piqûres de taons suffisent (BIGALKE, 1968). (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013; BIGALKE, 1968; JACQUIET *et al.*, 2010). Toutefois, les stomoxes sont plus abondants et sont actifs en intérieur comme en extérieur, ce qui augmente le risque de contamination (ALZIEU, 2009;

JACQUIET *et al.*, 2010). A ce jour, aucune transmission biologique n'a été mise en évidence au sein des insectes vecteurs (JACQUIET *et al.*, 2010).

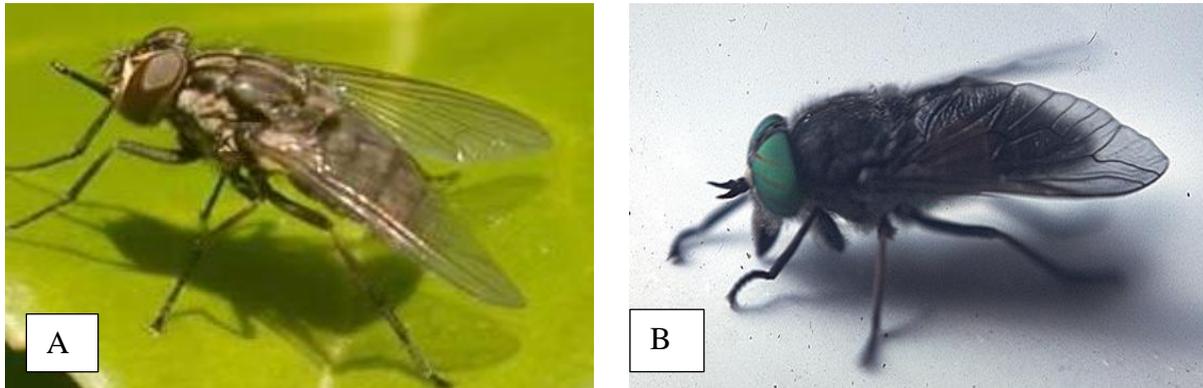


Figure 08 : Principaux vecteurs de la besnoitiose. A : *Stomoxys calcitrans* (Mouche d'étable) ; B : *Tabanus spp* (taon) (LENFANT, 2013).

En ajoutant à la transmission mécanique déjà connue de *B. besnoiti* par les mouches hématophages, les résultats de l'étude réalisée par Hornok et ses collaborateurs en 2015, suggèrent que les mouches *secretophagous flies* ont été évaluées comme des vecteurs potentiels de ce parasite (HORNOK *et al.*, 2015).

D'autres arthropodes tels que les moustiques, les mouches plates (*Hippobosca sp*), les tiques et des espèces non piqueuses comme les mouches domestiques (*Musca domestica et Musca autumnalis*) ont été suggérés comme vecteurs, mais cette hypothèse n'a pas encore été démontrée (BIGALKE, 1968; POLS, 1960 ; CORTES *et al.*, 2005 ; ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013).

#### 1.5.2.2. Autres modes de transmission non clarifiés

La transmission pourrait aussi se faire par contacts directs entre les animaux (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013). En effet, des bradyzoïtes ont pu être inoculés expérimentalement par les narines, ce qui suggère qu'ils pourraient traverser les muqueuses (BIGALKE, 1968). Par ailleurs, La transmission vénérienne n'a pas été établie comme méthode de transmission et dans une étude récente, qui comprenait le sperme provenant de 17 taureaux séropositifs infectés par voie sous-clinique et de 12 taureaux séropositifs cliniquement infectés, aucun ADN de *B. besnoiti* n'a été détecté, ce qui indique que la transmission de la besnoitiose par le Sperme des taureaux chroniquement infectés est peu probable (ESTEBAN-GIL *et al.*, 2014). De plus, on pense que les animaux récupérés et subcliniquement infectés restent porteurs de longue durée et sont considérés comme une source importante d'infection (ÁLVAREZ GARCIA *et al.*, 2013, BASSO *et al.*, 2013, FREY *et al.*, 2013).

Enfin, une transmission transplacentaire a été envisagée du fait de la présence d'anticorps chez de très jeunes veaux (FRANC, 1996; FRANC et CADIERGUES, 1999; SHKAP *et al.*, 1994), mais n'a jamais été confirmée.

### 1.5.3. Prévalence et facteurs de réceptivités

#### 1.5.3.1. Prévalence

Les taux de prévalence différent en fonction des situations épidémiologiques des régions où l'on se trouve (JACQUIET *et al.*, 2010). En zone d'enzootie comme la France et le Portugal, la séroprévalence y est de l'ordre de 50 à 60%, ce qui suggère l'existence d'un équilibre par stabilité enzootique (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013; ALZIEU et JACQUIET, 2010; JACQUIET *et al.*, 2010). Par contre, en zone d'émergence la littérature rapporte que la séroprévalence n'est que de 20 à 30% (JACQUIET *et al.*, 2010).

La séroprévalence de l'infection par *besnoitia besnoiti* chez l'espèce bovine dans différents pays du monde est résumé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 01 : Séroprévalence de l'infection par *besnoitia besnoiti* dans certains pays du monde.

Pays	ELISA	IFI	WB	Référence
<b>Australie</b>	18.4	0	0	NASIR <i>et al.</i> , 2012
<b>Brésil</b>	-	3.48	0	UZEDA <i>et al.</i> , 2014
<b>Espagne (Navarra)</b>	16	-	-	ÁLVAREZ-GARCIA <i>et al.</i> , 2014b
<b>Espagne (Castella-la Manxa)</b>	90.5	-	-	FERNANDEZ-GARCIA <i>et al.</i> , 2010
<b>Espagne</b>	87.3			GUTIERREZ-EXPOSITO <i>et al.</i> , 2012
<b>Espagne (Osca)</b>	49.2-52.3	-	-	GUTIERREZ-EXPOSITO <i>et al.</i> , 2014
<b>Espagne</b>		38,34		ESTEBAN-GILA <i>et al.</i> , 2016
<b>France</b>	-	-	29.8-89.5	LIENARD <i>et al.</i> , 2011
<b>Italie</b>	-	-	41.2	GOLLNICK <i>et al.</i> , 2010
<b>Italie</b>	-	-	9.7	GENTILE <i>et al.</i> , 2012
<b>Italie</b>	44.1	-	-	RINALDI <i>et al.</i> , 2013
<b>Italie</b>	36.5	-		GAZZONIS <i>et al.</i> , 2017

<b>Nigeria</b>	-	-	80.3	SAMBO <i>et al.</i> , 2014
<b>Suisse</b>	13.2	2.1	0.001	BASSO <i>et al.</i> , 2013
<b>Jordanie</b>	28.5	-	-	ABDELSALAM Q <i>et al.</i> , 2015
<b>Irlande</b>	68	-	-	RYAN <i>et al.</i> , 2016
<b>Egypte</b>	13.75	-	-	K I. ASHMAWY et S.S. ABU-AKKADA., 2014

### 1.5.3.2. Facteurs de réceptivités et de sensibilités

#### a. Saisonnalité

La besnoitiose présente une variation saisonnière marquée, à mettre en relation avec la période d'activité des insectes vecteurs (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013). On observe la besnoitiose du printemps à l'automne, avec un pic épidémiologique de juillet à septembre et pour certains auteurs de juin à octobre (ALZIEU, 1991 ; ALZIEU *et al.*, 2007 ; LEGRAND, 2003 ; RENAUD, 2004 ; TARTERA, 2001 ; THOMAS, 2007). Toutefois des formes hivernales sont décrites, ce qui est en faveur d'une expression différée de la maladie chez les bovins porteurs de kystes (ALZIEU, 2009; JACQUIET *et al.*, 2010).

#### b. Age

La maladie clinique a été principalement observée chez les animaux plus âgés et a été caractérisée par des réponses immunitaires d'intensité plus élevée. De plus, les veaux peuvent être infectés et peuvent même développer une maladie clinique lorsqu'ils ont moins de 6 mois (ESTEBAN-GIL *et al.*, 2017).

A l'opposé, de multiples études rapportent qu'il n'y a que très peu d'atteinte clinique des animaux de moins de 6 mois (LEGRAND, 2003 ; FREUDIGER, 2008 ; FOUQUET, 2009), la maladie apparaissant sous forme clinique, préférentiellement, chez les animaux de 2 à 4 ans (FERRIE, 1984 ; LEGRAND, 2003), voire à partir de 1 an (FRANC et CADIERGUES, 1999 ; FREUDIGER, 2008).

#### c. Sexe

Le sexe ne semble pas avoir d'influence sur la réceptivité à la maladie (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013; FERRIE, 1984; GOLDMAN et PIPANO, 1983).

Cependant, les mâles développent des formes cliniques plus graves que les femelles et leur taux de mortalité, face à la maladie, est plus élevé (LEGRAND, 2003 ; JACQUIET, *et al.*, 2010).

Cette sensibilité supérieure des mâles a des conséquences sur l'impact de la besnoitiose sur la gestion d'élevage. En effet, outre la mortalité plus importante, les formes cliniques provoquent des séquelles, comme l'infertilité, conduisant les animaux vers la réforme (ESTEBAN-GIL *et al.*, 2016).

#### d. Race

La plupart des études s'accordent à dire qu'il n'existe pas de prédispositions raciales concernant la besnoitiose (ALZIEU, 2007b, 2009, 2011; FRANC et CADIERGUES, 1999; LEGRAND, 2003).

On considère que le véritable facteur influençant la contamination d'un bovin est la conduite d'élevage (LEGRAND, 2003). Il est difficile de dissocier cette notion de mode d'élevage de celle de race, c'est sans doute pourquoi il y a eu confusion (FOUQUET, 2009).

En Israël, ce sont surtout les races allaitantes qui sont touchées, comme les Charolaises, les Brunnes des Alpes et les Herefords (THOMAS, 2007 ; FERRIE, 1984). En Israël, 90% des bovins laitiers étaient séronégatifs, alors que 50% des bovins de boucherie étaient séropositifs (GOLDMAN ET PIPANO, 1983).

Il semblerait que les croisements et les animaux non nés en zone d'enzootie soient plus sensibles à la maladie (THOMAS, 2007 ; FERRIE, 1984 ; SAHUN, 1998 ; SHKAP *et al.*, 1994).

#### e. Mode d'élevage (JACQUIET *et al.*, 2010 ; LEGRAND, 2003)

On distingue trois modes d'élevage à risque pour la contamination :

La transhumance est un facteur de risque majeur dans la réceptivité des bovins. En effet, il s'agit du regroupement d'animaux provenant de divers cheptels, dont le statut sanitaire diffère, auquel s'ajoute une abondance d'insectes piqueurs et vecteurs de la besnoitiose.

L'élevage allaitant dit « sédentaire », non transhumant, où la transmission du parasite se réalise par l'achat de bovins porteurs, ou bien par le biais d'insectes vecteurs qui se propagent à distance d'élevage en élevage.

L'élevage laitier « sédentaire », où les contaminations prennent des allures épizootiques (quelques animaux atteints), sans aucune explication satisfaisante. Ce dernier mode d'élevage serait même assez rarement touché. Toutefois, comme pour l'élevage allaitant « sédentaire », l'introduction d'un animal infecté est un facteur de risque non négligeable.

## 2. Etude clinique

### 2.1. Pathogénie

La phase fébrile est liée à la parasitémie avec multiplication des parasites dans les cellules de l'endothélium vasculaire (CORTES *et al.*, 2005 ; EL HADEF EL OKKI-BOUCHAIR, 1987 ; FERRIE, 1984 ; FRANC *et al.*, 1987), mais aussi les macrophages et les fibroblastes (CORTES *et al.*, 2005 ). Cette multiplication va provoquer une hyperplasie de l'endothélium, la formation de thrombi et une inflammation vasculaire, surtout des capillaires et des petites veines du derme, des tissus sous-cutanés, des fascias, des testicules, et des muqueuses des voies respiratoires supérieures (CORTES *et al.*, 2005 ; FERRIE, 1984 ; EL HADEF EL OKKI-BOUCHAIR, 1987 ; FRANC *et al.*, 1987), puis des veines plus importantes (jusqu'à 4 mm de diamètre) (FERRIE, 1984 ). On assiste donc à la formation d'œdèmes dans ces régions mal irriguées par ces vaisseaux lésés (FERRIE, 1984; FRANC, 1996; FRANC *et al.*, 1987). Ce phénomène explique ainsi la deuxième phase de la maladie, appelée phase d'œdèmes.

La sclérodermie observée en phase chronique de besnoitiose fait suite à (FERRIE, 1984; FRANC, 1996) :

- ✓ La formation d'amas de kystes provoquant un épaissement de la peau et une rugosité des muqueuses avec dans la plupart de cas une dégénérescence des follicules pileux ;
- ✓ La nécrose vasculaire consécutive aux lésions de thrombophlébite provoque une mauvaise irrigation sanguine ;
- ✓ L'apparition des complications mécaniques comme les crevasses dues aux œdèmes et à l'épaississement de la peau ;
- ✓ La surinfection bactérienne secondaire.

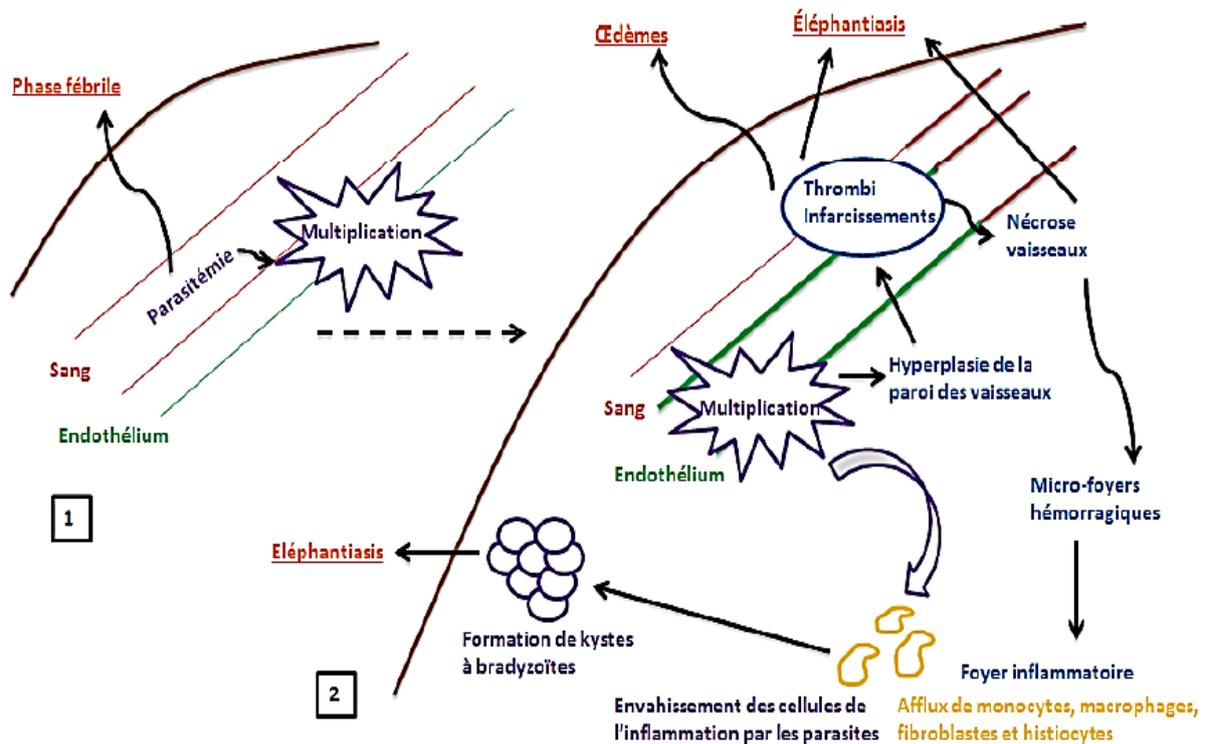


Figure 09 : Pathogénie de la besnoitiose. Les actions du parasite apparaissent en violet, tandis que les effets de ces actions apparaissent en bleu. Les symptômes observés apparaissent en orange souligné (ESQUERRE, 2015).

## 2.2. Immunité

Le pouvoir immunogène de *Besnoitia besnoiti* est encore très mal connu. Seules quelques données scientifiques provenant d'expérimentations réalisées sur rongeurs prouvent l'existence et l'importance de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Celle-ci dépend en partie de l'activation des macrophages à partir de l'interféron gamma (ALZIEU *et al.*, 2011).

Chez les individus porteurs, les kystes restent vivants pendant au moins neuf ans (FRANC et CADIERGUES, 1999), voir pendant toute la vie de l'animal (EUZEBY, 1987). Il y a donc développement d'une immunité acquise chez les individus parasités, d'installation rapide, solide et durable, elle est de type prémunitaire car les kystes restent vivants.

Cependant, les kystes permettent au parasite d'échapper au système immunitaire. Leur devenir est variable : soit les parasites survivent dans les kystes durant plusieurs années, soit les parasites se multiplient à la suite d'une réactivation. Celle-ci peut survenir suite à une baisse de l'immunité ou suite à une maladie intercurrente (ALZIEU, 2009; JACQUIET *et al.*, 2010). Par contre, l'élimination totale des kystes est peu probable.

Des anticorps IgM et IgG ont été mis en évidence dans le sang d'animaux infestés, cependant l'immunité est plutôt à médiation cellulaire acquise spécifique de *besnoitia besnoiti* (BIGALKE, 1981), ce qui s'explique partiellement par le fait que, chez l'hôte intermédiaire, les parasites sont intracellulaires (FREUDIGER, 2008).

Il semble que l'on puisse attribuer la persistance d'un taux d'anticorps spécifiques au parasite, à la présence chez le bovin de kystes parasitaires. Un animal séropositif est donc potentiellement porteur sain (SAHUN, 1998). Par contre en l'absence de stimulation antigénique, il serait possible que les anticorps disparaissent : c'est le phénomène d'anergie (L'HOSTI *et al.*, 2009).

Par ailleurs, Janitchke et Bigalke ont mis en évidence la présence d'anticorps chez un veau de moins d'un mois (FOUQUET, 2009; THOMAS, 2007), se posant alors la question d'une transmission verticale de la maladie, ou d'une transmission d'anticorps via le colostrum. Si la transmission verticale n'a jamais pu (FREUDIGER, 2008) être prouvée, le passage d'anticorps dans le colostrum a effectivement été observé, sans que l'on puisse prouver le rôle protecteur de ces anticorps (SHKAP *et al.*, 1994).

## **2.3. Symptomatologie**

La grande majorité des animaux contaminés par la besnoitiose (80 à 95%) ne développe pas de phase clinique (ALZIEU, *et al.*, 2011). Il est observé que seule une petite proportion des animaux infectés développe tout le cortège des symptômes et la clinique de la besnoitiose chez ces animaux peut être divisée en trois phases successives que sont la phase fébrile, la phase des œdèmes et la phase de sclérodermie.

### **2.3.1. Phase fébrile**

Après une incubation de 6 à 10 jours, l'animal infecté souffre brutalement d'un état fébrile marqué avec des températures rectales pouvant atteindre 41,6°C pendant quelques jours. Un abattement, une tachypnée, une tachycardie et des troubles de la rumination sont alors observés. D'autres signes plus caractéristiques surviennent également, notamment une photophobie et des écoulements oculaires et pituitaires séro-muqueux (Figure 10) (GOURREAU *et al.*, 2000).



Figure 10 : Phase fébrile : A : photophobie, epiphora et B : écoulements séreux (ALZIEU, 2011).

### 2.3.2. Phase des œdèmes

Après la phase fébrile survient la phase des œdèmes ou anasarque. Celle-ci est caractérisée par la formation d'œdèmes sous-cutanés sur la tête et dans les régions déclives telles que le scrotum, la mamelle, les ars et le fanon (Figure 11). Cette phase persiste pendant 1 à 4 semaines, avec une adénomégalie superficielle généralisée. Chez la femelle est également observée une cyanose des trayons qui deviennent violacés à leur base. Chez le mâle, l'atteinte scrotale et testiculaire induit une baisse de fertilité (GOURREAU *et al.*, 2000).

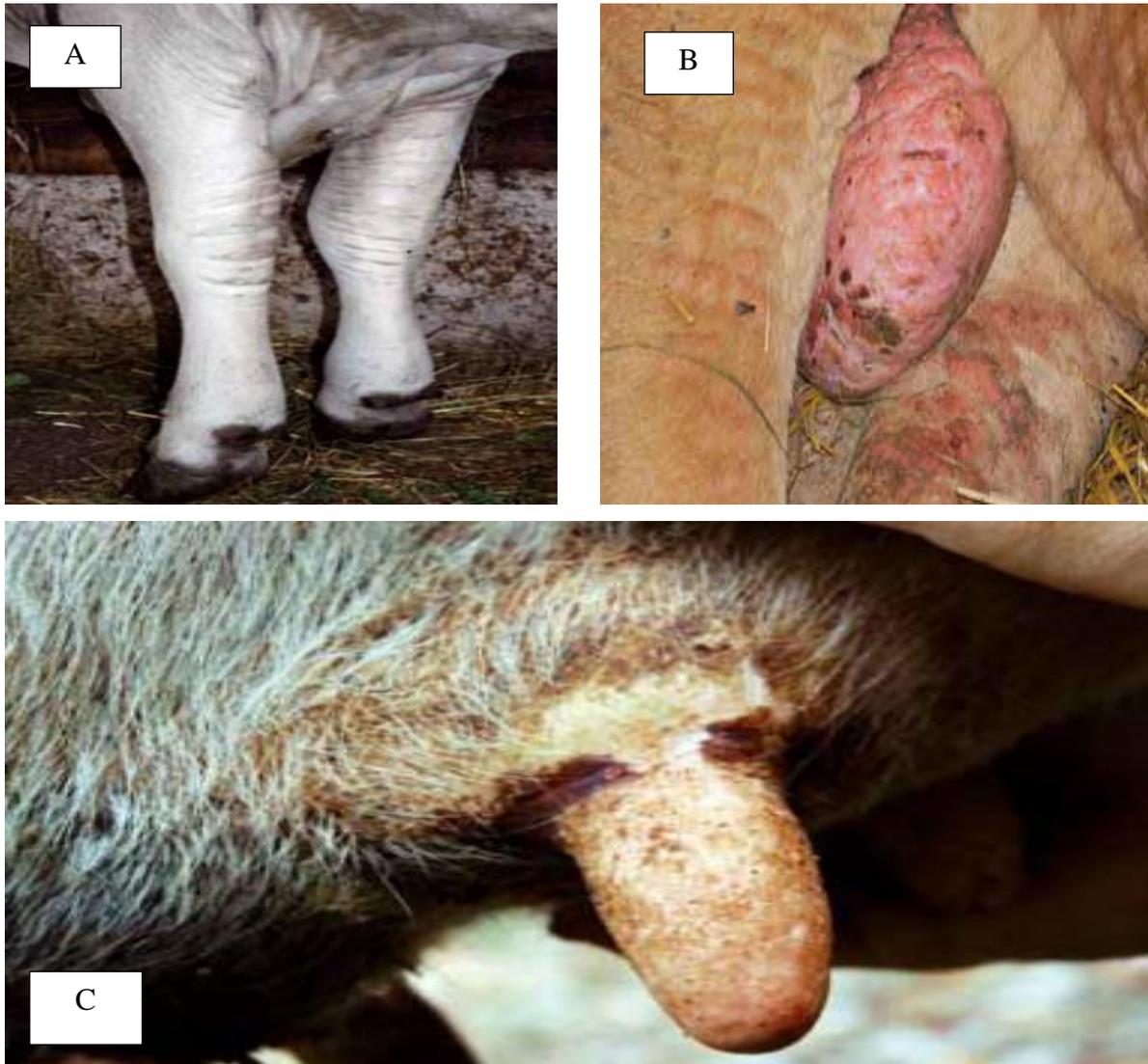


Figure 11 : Phase des œdèmes, A : œdèmes déclives sur les membres (ALZIEU, 2011) ; B : plissements et hyperkératose au niveau des bourses testiculaires (VANHOUDT *et al.*, 2015) ; C : zones violacées à la base des trayons (ALZIEU, 2011).

### 2.3.3. Phase de sclérodermie

La troisième phase, phase de sclérodermie, est caractéristique de la maladie. Elle est également appelée phase des dépilations ou éléphantiasis, et correspond à une phase terminale de la besnoitiose clinique. Les œdèmes se résorbent mais les poils tombent et la peau perd toute souplesse et s'épaissit (GOURREAU *et al.*, 2000). Des kystes tissulaires apparaissent, principalement dans le derme, la sclère conjonctivale (Figure 12-A) (CORTES *et al.*, 2005; MANUALI *et al.*, 2011; NJAGI *et al.*, 1998), l'appareil respiratoire supérieur, les fascias (MCCULLY *et al.*, 1966), les muscles (NJAGI *et al.*, 1998), la muqueuse vulvaire (Figure 12-B), la rate, le foie et le cœur (ALZIEU, 2007b, 2009; FRANC, 1996; FRANC *et al.*, 1987; JACQUIET *et al.*, 2010).

La peau apparaît alors plissée et très épaissie (de 0.2 à 2 cm (MANUALI *et al.*, 2011) voire plus de 2 cm (ROSTASHER *et al.*, 2010)), avec une hyperkératose, une lichénification (EUZEBY, 1987; GENTILE *et al.*, 2012) et donc une sclérodémie (ou éléphantiasis) (JACQUIET *et al.*, 2010) (figure). Les régions du corps les plus touchées sont le pourtour du museau, le cou, le pis, l'abdomen ventral, l'extrémité des pattes et de la queue (ALZIEU, 2007b; FERRIE, 1984; GENTILE *et al.*, 2012). Des crevasses peuvent apparaître, qui peuvent se surinfecter et se remplir d'un liquide suintant et séro-purulent (ALZIEU, 2007b; EUZEBY, 1987; FERRIE, 1984; FRANC *et al.*, 1987).

L'appareil reproducteur mâle est particulièrement atteint, avec une nécrose puis une calcification bilatérale des testicules. S'ensuit une aspermatogénèse à l'origine d'une stérilité irréversible (ALZIEU, 2007b; BIGALKE, 1981; CORTES *et al.*, 2005; KUMI-DIAKA *et al.*, 1981). Chez la vache, la mamelle est déformée, du fait d'excroissances ou d'hypertrophie des trayons, rendant la traite/tétée difficile.

Au niveau locomoteur, la démarche est de plus en plus raide, les déplacements de plus en plus difficiles. Les bovins qui arrivent jusqu'à ce stade de la maladie dépérissent petit à petit. Ils sont alors envoyés à l'abattoir ou bien euthanasiés, dans les deux cas, dans un souci de bien-être animal et parce qu'ils deviennent des non valeurs économiques. Malgré tout, certains animaux survivent dans cet état, et dans de rares cas, on peut assister à la régression partielle, voire totale des symptômes cutanés en 3-4 mois (JACQUIET *et al.*, 2010 ; ALZIEU *et al.*, 2011).

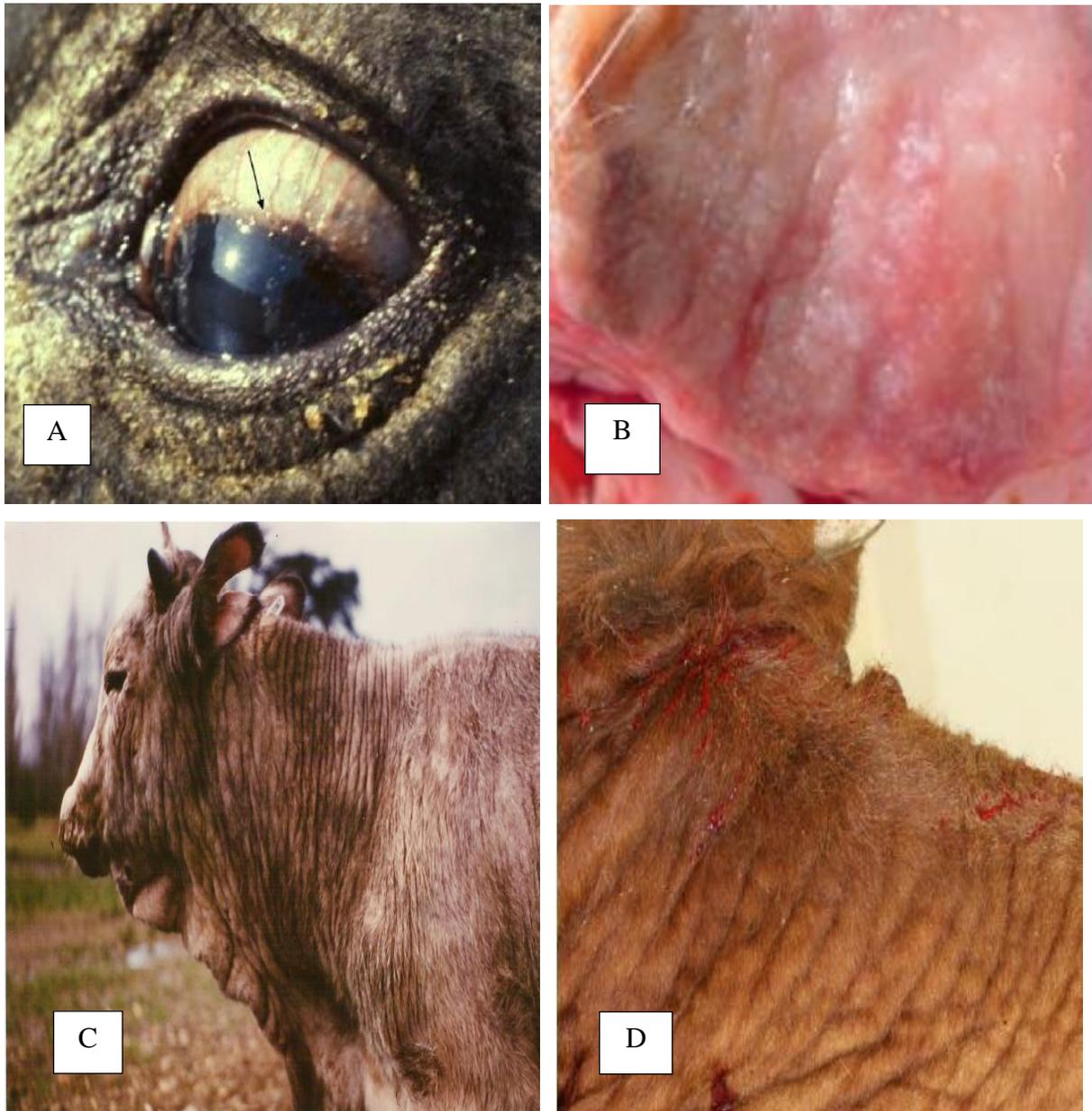


Figure 12 : Phase de sclérodémie chez des bovins atteints de besnoitiose. A : Kystes oculaires sur la sclère conjonctivale, indiqués par la flèche noire (JACQUIET *et al.*, 2010) ; B : Kystes observés lors d'une biopsie de vulve (Alvarez-Garcia *et al.*, 2010) ; C : Lichénification (Thomas, 2007) ; D : Epaissement et plissement cutané (Dr BELLY, Unité d'Anatomopathologie, ENVL).

### 3. Diagnostic

Il y a quelques années la besnoitiose n'était que très peu connue. Aujourd'hui, il est capital de savoir la diagnostiquer car toute la lutte contre cette parasitose repose sur un diagnostic précoce. Voyons donc quand la suspecter, avec quelles maladies ne pas la confondre et les différents tests de laboratoires qui permettent de la détecter.

#### 3.1. Suspicion épidémiologique-clinique

La connaissance du tableau clinique de la maladie est essentielle pour un diagnostic efficace et le plus précoce possible. Il s'agit de la connaissance des symptômes, ainsi que des lésions macroscopiques associées. L'évolution en trois phases distinctes et pathognomonique pour la dernière en fait un atout supplémentaire pour une meilleure détection clinique. Le syndrome fébrile initial n'est pas spécifique à cette maladie, ce qui en fait une phase difficile à diagnostiquer. A l'apparition des œdèmes, le diagnostic est alors sans équivoque. Lors de la dernière phase, la clinique est univoque et permet un diagnostic de quasi-certitude. En ce qui concerne les animaux infectés latents, leur dépistage est capital et repose sur la détection des kystes à bradyzoïtes présents au niveau de la sclérotique. Il s'agit d'un diagnostic clinique fiable et spécifique (FRANC *et al.*, 1987).

Malheureusement, si l'on s'appuie uniquement sur la clinique, le diagnostic est souvent tardif. L'épidémiologie de base est à connaître pour améliorer le diagnostic. Une suspicion précoce repose sur un contexte épidémiologique basé sur :

- L'âge des animaux : la tranche d'âge la plus touchée est de deux à quatre ans (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013; FOUQUET, 2009; FREUDIGER, 2008)
- Le mode d'élevage : les élevages pratiquant la mise en estive sont particulièrement à risque (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013; LEGRAND, 2003 ; FERRIE, 1984)
- La saison : les formes cliniques apparaissent surtout en été (à la période d'activité maximale des insectes) (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013; ALZIEU, 2009; FERRIE, 1984; JACQUIET *et al.*, 2010; LEGRAND, 2003). Attention toutefois aux formes non estivales voire hivernales, de plus en plus rapportées dans la littérature (ALZIEU, 2009; ALZIEU et JACQUIET, 2010; FREUDIGER, 2008; JACQUIET *et al.*, 2010; MOURIER, 2013).

## 3.2. Diagnostic différentiel

Examinons, phase par phase, les maladies qui entrent dans le diagnostic différentiel de la besnoitiose.

### 3.2.1. Pendant la phase fébrile

Durant cette phase, la besnoitiose peut être confondue avec les maladies à dominante congestivo-hémorragiques et hyperthermisantes telles que:

- Les **bronchopneumonies infectieuses enzootiques**, se manifestent, en plus du syndrome fébrile, par un jetage bilatéral, une anorexie, une arumination (ALZIEU *et al.*, 2007 ; LEGRAND, 2003 ; TARTERA, 2001). La différence se fait donc au niveau pulmonaire où l'auscultation est d'une grande importance (THOMAS, 2007).
- Un **coryza gangréneux** débutant, mais on observe alors des œdèmes cornéens absents lors de besnoitiose (ALZIEU, 2007b; FRANC et CADIERGUES, 1999).
- La **theilériose** à *Theileria annulata*, elle est fréquente en Afrique du Nord. Elle cause une hyperthermie, un intense abattement de l'animal et une polyadénite. Parfois on peut observer des lésions cutanées. Toutefois l'évolution est plus rapide et grave lors de theilériose que dans la besnoitiose (EL HADEF EL OKKI-BOUCHAIR, 1987).

### 3.2.2. Pendant la phase des œdèmes

En phase d'œdèmes, le diagnostic différentiel de la besnoitiose comprend :

- **Ehrlichiose granulocytaire** à *Anaplasma phagocytophylum* qui provoque une atteinte respiratoire couplée à un gonflement des boulets et des douleurs articulaires (ALZIEU *et al.*, 2007). Cependant l'ehrlichiose n'induit pas d'épaississement ou de douleur cutanée généralisée.
- La forme subaiguë de la **fièvre catarrhale ovine** (mais on observe alors des ulcérations buccales sans remaniements cutanés) (ALZIEU, 2007b; THOMAS, 2007).
- Des **œdèmes d'origine cardiaque** sont situés préférentiellement au niveau de l'auge (signe de la bouteille) et/ou du fanon. On peut également observer une distension des veines jugulaires et plus rarement une distension abdominale (ascite) (FOUQUET, 2009).

Il est difficile de bien distinguer la **photosensibilisation** de la besnoitiose. La photosensibilisation a plus fréquemment, tendance à provoquer la desquamation de plaques cutanées de taille importante, alors que la besnoitiose provoque, rarement, plus que des crevasses ou des excoriations au niveau des articulations durant la phase des œdèmes (Bordes, 2009). Cependant, en début de phase de sclérodermie, des plaques de tissu cutané peuvent, aussi, se détacher lors d'une besnoitiose.

### 3.2.3. Pendant la phase chronique (sclérodermie)

Le diagnostic est relativement univoque notamment pour les éleveurs en zone d'enzootie habitués à la maladie. Toutefois, dans les zones saines ou d'émergence, il faut prendre garde de ne pas confondre la besnoitiose avec :

- Les **gales**, qu'elles soient **sarcoptique**, **chorioptique** ou **psoroptique**, sont des parasitoses externes extrêmement prurigineuses et entraînant une hyperkératinisation de la peau. Par contre, elles n'entraînent ni fièvre, ni oedèmes (LENFANT, 2013).
- La **phthiriose**, mais il s'agit d'une parasitose prurigineuse, hivernale et sans dégradation de l'état général (FOUQUET, 2009; FRANC *et al.*, 1987; LEGRAND, 2003).
- Lors de **démodécie**, on observe des lésions généralisées discrètes sous forme de petits nodules dans les follicules pileux de l'encolure et du garrot. Cette affection est plutôt rare chez les bovins (FRANC *et al.*, 1987 ; LEGRAND, 2003) mais peut coexister avec la besnoitiose (FRANC *et al.*, 1987).
- La **dermatophilose** due à *Dermatophilus congolensis*, est peu contagieuse, et touche aussi bien les petits ruminants que les chevaux, de préférence lorsqu'il fait chaud et humide. Les lésions causées par cette maladie sont localisées sur la ligne dorsale, alors qu'elles sont sur les faces latérales en cas de besnoitiose. On observe de petits nodules fermes et secs sur une peau rugueuse et épaissie, avec des touffes de poils hérissés en pinceau. On notera également une parakératose, une alopecie, et une adénopathie (FRANC *et al.*, 1987 ; SAHUN, 1998).
- L'**ichtyose congénitale** se définit par la présence de lésions de type hyperkératose puis exfoliation au niveau du revêtement cutané du dos, du garrot, des faces latérales de l'encolure et du mufler. Ensuite ces zones alopeciques se fissurent puis s'ulcèrent. Par contre, on ne note ni nodule, ni hyperthermie (sauf lors de complications bactériennes) (FRANC *et al.*, 1987 ; LEGRAND, 2003 ; SAHUN, 1998).
- Les **intoxications aux légumineuses** (trèfle, vesce, lupin) se retrouvent surtout en mai-juin, et donnent une dermatite papuleuse au niveau de la tête, du cou, de la mamelle, des trayons, du scrotum, du périnée. Des symptômes affectant la face sont associés : conjonctivite, congestion et oedème des paupières, jetage, ptyalisme. Une diarrhée sévère peut dégrader l'état général de l'animal (LENFANT, 2013).
- Une **parakératose héréditaire** ou due à une carence en zinc (ALZIEU, 2007b; FRANC *et al.*, 1987; LEGRAND, 2003). Mais les plaques d'épaississement dermique sont plus localisées (ALZIEU, 2007b) et les troubles cutanés ne sont pas précédés d'une hyperthermie (FRANC *et al.*, 1987; LEGRAND, 2003). Ainsi, certains auteurs affirment que la confusion entre les deux affections est peu probable (FRANC et CADIERGUES, 1999).

- La **maladie X** des bovins, résultant d'une intoxication par des naphthalènes chlorés. On observe un épiphora, du jetage, du ptyalisme, des troubles respiratoires et une hyperkératose évoluant jusqu'à la sclérodermie (FOUQUET, 2009; FRANC *et al.*, 1987).

### **3.3. Diagnostic de laboratoire**

Le diagnostic expérimental de certitude est primordial dans les deux premières phases de la maladie, la troisième phase possédant un tableau clinique déjà très évocateur. Pour cela, plusieurs méthodes sont disponibles : celles qui permettent la mise en évidence du parasite ou de son ADN, et celles permettant la mise en évidence de la réaction immunitaire.

#### **3.3.1. Diagnostic direct**

##### **3.3.1.1. Examen histologique**

L'histologie a été le premier examen complémentaire utilisé pour mettre en évidence la besnoitiose (ALZIEU, 2007b, 2009; ALZIEU AND JACQUIET, 2010; BIGALKE, 1968; FRANC et CADIERGUES, 1999).

Plusieurs prélèvements sont possibles pour procéder à l'examen histologique : des biopsies de peau, des raclages vaginaux ou des raclages de la sclère (FREY *et al.*, 2013; ROSTAHER *et al.*, 2010; SANNUSI, 1991).

Une biopsie réalisée sous anesthésie locale sur un lambeau de peau « cartonné » permet la mise en évidence de kystes à bradyzoïtes après analyse histologique. Cependant, cet examen ne permet la détection des kystes que 5 à 6 semaines après le début de la phase fébrile.

Le simple grattage du derme ou le raclage scléral, suivi de l'écrasement du prélèvement entre lame et lamelle permet un diagnostic de certitude après révélation de la structure caractéristique des kystes à bradyzoïtes de *Besnoitia* (ALZIEU *et al.*, 2011 ; JACQUIET *et al.*, 2010). Cette technique ne demande pas de coloration, elle est rapide et peu coûteuse (FRANC *et al.*, 1987).

##### **3.3.1.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Au cours des premières semaines de l'infection, les animaux gravement touchés peuvent être difficiles à diagnostiquer car les signes cliniques ne sont pas spécifiques (KUMI-DIAKA *et al.*, 1981). Les techniques moléculaires ont été préconisées comme méthode de choix pour une identification et un diagnostic précis de la maladie (SCHARES *et al.*, 2011a).

Des techniques de PCR ont été développées (CORTES *et al.*, 2007, 2006b, SCHARES *et al.*, 2011b), qui se sont révélées plus sensibles à la détection des cas aigus et chroniques que d'autres techniques, y compris les méthodes sérologiques et histologiques (CORTES *et al.*,

2006a, 2007, SCHARES *et al.*, 2013). Bien que les tests sérologiques soient faciles à réaliser et moins coûteux par rapport à la PCR, ils peuvent causer des résultats faux positifs en raison d'une spécificité limitée (GARCIA-LUNAR *et al.*, 2015, NASIR *et al.*, 2012). Cela rend nécessaire des tests de confirmation, tels que la détection directe des parasites. De plus, les méthodes de détection directe sont importantes dans le diagnostic des bovins infectés chroniquement, car certains animaux infectés de façon persistante ne développent pas d'anticorps et ne peuvent donc pas être détectés par des techniques sérologiques (GARCIA-LUNAR *et al.*, 2013).

Des tests PCR realtime et conventionnelle ont été développés récemment, basés sur une région particulière de l'ARN ribosomal : le fragment ITS-1 (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013; ALZIEU, 2007b, 2009; CORTES *et al.*, 2007a; JACQUIET *et al.*, 2010; ROSTAHER *et al.*, 2010; SCHARES *et al.*, 2011b, 2013). Cette technique consiste à amplifier l'ADN du parasite présent dans les échantillons si l'animal est contaminé. On utilise pour cela des amorces complémentaires du fragment d'ITS-1, qui vont permettre d'initier les cycles d'amplification en présence de nucléotides et d'une ADN polymérase (la Taq polymérase). L'ADN ainsi répliqué peut ensuite être révélé par du Bromure d'Ethidium, un agent intercalent fluorescent visible au microscope à UV (CORTES *et al.*, 2007a; ROSTAHER *et al.*, 2010; SCHARES *et al.*, 2011b, 2013).

La PCR peut aujourd'hui être utilisée sur des biopsies de peau et des raclages vaginaux en phase chronique (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013; ALZIEU, 2007b, 2009; CORTES *et al.*, 2007; JACQUIET *et al.*, 2010; ROSTAHER *et al.*, 2010; SCHARES *et al.*, 2011b, 2013), mais aussi sur le sang en phase aiguë (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013; SCHARES *et al.*, 2013).

### **3.3.2. Diagnostic indirect**

Les tests indirects ne peuvent être mis en oeuvre que 35 à 42 jours après l'infection. C'est le temps nécessaire à la mise place d'une réponse immunitaire détectable. Cette réponse immunitaire, à dominante cellulaire, est mal connue mais elle perdure toute la vie de l'animal, probablement à cause de la persistance durable de kystes (ALZIEU *et al.*, 2007).

Beaucoup de tests ont été mis au point, on peut, par exemple, citer l'immuno-fluorescence indirecte (IFI) développée en Europe par Janitschke (JANITSCHKE *et al.*, 1884), les tests d'agglutination développés par Waap (WAAP, *et al.*, 2011), de nombreux tests ELISA dont les propriétés se sont améliorées avec le temps (SAHUN, 1998 ; SHKAP *et al.*, 2002 ; CORTE *et al.*, 2006 ; JACQUIET et ALZIEU, 2009 ; SCHARES *et al.*, 2013). Un autre test

sérologique, le Western Blot, permet de détecter *B.besnoiti* sans risque de faux-résultats. Ce test a été développé en premier par Cortes (CORTES *et al.*, 2006) et est depuis devenu le « gold standard » du dépistage de la besnoitiose.

#### **3.3.2.1. IFI**

Le test d'immunofluorescence indirect repose sur la formation d'un complexe antigène-anticorps primaire, qui va être mis en évidence par anticorps secondaire anti-anticorps primaire couplé à un fluorochrome.

L'IFI est considéré comme l'étalon-or pour la sérologie de la besnoitiose (SHKAP *et al.*, 2002). Lorsqu'il est réalisé avec l'expertise appropriée, il n'y a pas de réaction croisée avec les anticorps dirigés contre les pathogènes apparentés tels que *N. caninum* et *T. gondii* et vice versa.

C'est une technique de diagnostic individuel car elle est assez lourde à mettre en place et plus coûteuse que l'ELISA. Par rapport au Western Blot (WB), selon Schares (2010), l'immunofluorescence indirecte pourrait être plus sensible. Il serait intéressant de mettre en place cette technique de diagnostic afin d'arbitrer le statut d'un bovin lors de résultats discordants entre l'ELISA et le WB.

#### **3.3.2.2. Test d'agglutination directe**

Il se base sur la formation de complexes de parasites traités au formol en présence de sérum dilué contenant des anticorps IgG spécifiques. Il a été utilisé pour le diagnostic d'apicomplexes étroitement apparentés tels que *T. gondii* (FULTON et TURK, 1959) et *N. caninum* (ROMAND *et al.*, 1998). En 2011 Waap et ses collaborateurs ont développé un test d'agglutination modifié pour *B. besnoiti*. Cette méthode évite l'utilisation d'antiserums secondaires spécifiques de l'hôte et peut ainsi être utilisée pour tester différentes espèces animales qui peuvent être impliquées dans le cycle de vie et pourrait donc spécifiquement contribuer à l'élucidation de l'hôte définitif de *besnoitia besnoiti*.

#### **3.3.2.3. Test ELISA**

Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique qui permet la détection des anticorps anti-*B. besnoiti* dans un échantillon de sérum. La réaction fait appel aux anticorps spécifiques de l'antigène (ceux recherchés) et à des anticorps couplés à une enzyme, spécifiques du complexe immun formé. La réaction enzymatique produite crée une coloration quantifiable par spectrophotométrie.

Aujourd'hui, quatre kits Elisa commerciaux sont disponibles : INGEZIM BES 12.BES.K1 INGENASA, PrioCHECK *Besnoitia* Ab V2.0, ID Screen *Besnoitia* indirect IDVET et Apure-BbELISA (ALZIEU, 2009; GARCIA-LUNAR *et al.*, 2013; SCHARES *et al.*, 2011a, 2013)..

Les résultats d'une évaluation de ces tests, indépendante des laboratoires fournisseurs, montrent une sensibilité de 100% pour le test PrioCheck *Besnoitia* Ab2.0® et 97,2% pour l'ID Screen *Besnoitia* Indirect® ; la spécificité est mesurée à 98,8% pour le PrioCheck *Besnoitia* Ab2.0® et 100% pour l'ID Screen *Besnoitia* Indirect®. Ces résultats sont obtenus dans le respect des méthodes de réalisation et d'interprétation des tests préconisées par les laboratoires fournisseurs. Ces résultats, très bons, sont les deux meilleurs proposés lors de l'étude (GARCIA-LUNAR *et al.*, 2013).

Concernant le nouveau kit Apure-BbELISA qui a été élaboré par l'équipe allemande de Schares en 2013. Ce test possède une sensibilité revendiquée de 100% et une spécificité de 99,8%. Il est capable de détecter l'infection à un stade très précoce de la maladie, c'est-à-dire au même moment, légèrement avant ou 1 jour après les autres tests sérologiques de référence (IFI, WB), mais 7 ou 8 jours après le début de la fièvre. Cependant, l'infection est détectée plus tôt par RT-PCR, à partir de 1 à 3 jours après le début du stade fébrile de la maladie (SCHARES *et al.*, 2013). Cette méthode demeure à tester à grande échelle.

L'ELISA est recommandée en tant que test de dépistage de masse de la besnoitiose, par exemple pour connaître la prévalence dans un troupeau ou une région. Par contre, du fait de sa très faible valeur prédictive positive, il est important de confirmer les cas positifs par une autre technique telle que le WB (CORTES *et al.*, 2006a).

#### **3.3.2.4. Western Blot**

La méthode de Western Blot est très sensible mais surtout très spécifique. Le test se positive environ 20 jours après le début des signes cliniques (ALZIEU et JACQUIET, 2012). On n'a montré que de très faibles réactions croisées entre les antigènes de *B.bensoiti* utilisés pour le WB et les anticorps des pathogènes taxonomiquement proches, comme *N.caninum* (SHKAP *et al.*, 2002).

La méthode de WB étant une méthode lourde et coûteuse, elle ne peut être mise en place à grande échelle. On conseille donc d'utiliser cette méthode en association avec la méthode ELISA, plus propice aux études épidémiologique à grande échelle, les WB n'étant réalisés que sur les sérums donnant un ELISA douteux ou en cas de suspicion de réaction croisée (ALZIEU et JACQUIET, 2009) (GARCIA-LUNAR *et al.*, 2013).

## 4. Méthodes de contrôles

À l'heure actuelle, le contrôle de la besnoitiose bovine n'est pas une tâche facile à réaliser, étant donné qu'il n'existe actuellement aucun traitement ou vaccination efficaces, et la propagation de la maladie est liée à des pratiques de gestion favorisant sa dissémination (ALVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013). Par conséquent, le contrôle de la besnoitiose bovine repose entièrement sur des mesures de gestion couplées au diagnostic. Une approche réalisable est présentée à la figure ci-après. En gros, le contrôle de la besnoitiose devrait avoir deux objectifs principaux. Tout d'abord, éviter l'entrée de l'infection dans un troupeau devrait être une priorité. Comme de nouvelles infections surviennent principalement après l'introduction d'animaux porteurs, la meilleure approche pour maintenir un troupeau exempt de la maladie est de tester rigoureusement tous les nouveaux animaux avant leur entrée. De plus, si les troupeaux sont situés dans des zones de forte prévalence de maladies, des pratiques telles que le partage de pâturages et Les taureaux pour l'accouplement naturel posent des risques qui devraient être évités. Si cela n'est pas possible, tous les animaux doivent être examinés pour une infection par *B. besnoiti* à la fin de la période de pâturage et la saison des insectes avant d'être maintenue à l'intérieur, car de nouveaux cas sont habituellement détectés immédiatement après la période de transmission (BIGALKE, 1986). Les animaux infectés doivent être retirés du troupeau ou pêchés séparément pendant la période de pâturage suivante.

Le deuxième objectif est plus complexe et vise à éviter la propagation de la maladie en réduisant progressivement la prévalence de l'infection dans un troupeau. Une stratégie prudente à long terme qui semble être la meilleure option est de maintenir un équilibre coût-bénéfice entre l'abattage sélectif et la production, car la séroprévalence pourrait être élevée dans un troupeau infecté (BIGALKE, 1986 ; KUMI-DIAKA *et al.*, 1981). Sur une base régulière, les animaux les plus gravement touchés doivent être remplacés par des animaux séronégatifs et de les séparés de reste du troupeau. La sélection des animaux de remplacement nécessite un suivi intensif de la santé individuelle et des données de production. Par conséquent, cette approche est plus facilement suivie dans des conditions de gestion intensives plutôt que dans des conditions de gestion extensives. Les conditions de gestion intensive, où l'insémination artificielle et une surveillance étroite des paramètres de production sont effectués, et le pâturage n'est pas autorisé ou restreint aux pâturages proches, favorise la possibilité de séparer des animaux sains et testés de ceux qui doivent être remplacés dans le temps; Ainsi, la chance d'éradiquer *B. besnoiti* reste élevée. Même

l'utilisation de répulsifs à l'intérieur pour inhiber la piqûre par des insectes suceurs de sang peut aider à réduire la transmission mécanique car la séroconversion a été associée à une activité intérieure élevée de mouches d'étables (LIENARD *et al.*, 2011 ; 2012). Dans des conditions de gestion extensives sans la possibilité de tester à plusieurs reprises des individus, des groupes de séparation et d'éviter une transmission indirecte par des insectes mordants, une diminution de la prévalence de la maladie peut être réalisée, mais l'éradication peut s'avérer difficile. Cependant, l'absence de signes cliniques dans le troupeau devrait être un objectif raisonnable, qui peut être réalisé par une inspection visuelle périodique des animaux pour identifier de nouveaux cas cliniques et l'élimination subséquente des animaux affectés.

Ainsi, les outils de diagnostic sont essentiels pour la mise en œuvre et la surveillance du succès des programmes de contrôle. L'approche la plus utilisée repose sur l'inspection clinique complétée par la sérologie de l'ensemble du troupeau. Les signes cliniques typiques d'une besnoïtose chronique, c'est-à-dire les kystes tissulaires caractéristiques, peuvent être observés macroscopiquement et peuvent être confirmés par des tests directs tels que des techniques de frottis pour identifier les zoïtes (SANNUS, 1991), l'histologie (BIGALKE, 1986) ou la trichinelloscopie de Biopsies cutanées ou vulvaires [5] pour identifier les kystes tissulaires. Si aucun kyste ne peut être détecté, l'animal doit être testé sérologiquement pour la maladie pour détecter les infections subcliniques (BIGALKE, 1986 ; GARCIA *et al.*, 2010 ; FREY *et al.*, 2013 ; CORTES *et al.*, 2006). Les premiers tests d'anticorps immunofluorescents indirects (IFAT) et ELISA ont été développés en Israël et en Afrique du Sud (GOLDMAN, M. et PIPANO, 1983 ; JANITSCHKE *et al.*, 1984 ; SHKAP *et al.*, 1984). En raison de la propagation récente de la maladie, d'autres IFAT et ELISA, ainsi que des transferts de Western et un test d'agglutination modifié (MAT) (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2010 ; SCHARES *et al.*, 2010, 2011 ; CORTES *et al.*, 2006 ; WAAP *et al.*, 2011), ont également été développés. En outre, la plupart de ces tests ont été validés récemment dans un essai à large anneau (GARCIA-LUNAR *et al.*, 2013). Les recommandations dérivées de cette étude, basées sur la performance de tous les tests, incluent l'utilité d'ELISA pour effectuer des études épidémiologiques ou des projections en série. Chez les animaux de grande valeur, la confirmation d'un résultat positif d'ELISA avec un western blot a posteriori est recommandée. Cependant, les tests sérologiques ont deux principales limites. Tout d'abord, il y a eu des problèmes de spécificité décrits dans des cas particuliers (NASIR *et al.*, 2012) et, deuxièmement, la fenêtre de diagnostic, qui est le temps qui passe entre l'infection et l'apparition d'anticorps, est un problème. En effet, l'essai en anneau multicentrique a confirmé le manque de sensibilité de la sérologie dans les échantillons de sérum d'animaux infectés de

façon aveugle (GARCIA-LUNAR *et al.*, 2013). En outre, certains animaux infectés produisent des niveaux d'anticorps très bas qui sont inférieurs aux limites de détection des tests utilisés (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2010 ; SCHARES *et al.*, 2010). Les méthodes de PCR en temps réel et conventionnelles basées sur la région transcrit interne (ITS) des gènes d'ARNr ont été développées et ont une sensibilité supérieure par rapport à la sérologie chez les bovins gravement infectés (CORTES *et al.*, 2007 ; SCHARES *et al.*, 2001). Par conséquent, les animaux qui pourraient être dans la phase aiguë de l'infection devraient être testés par une sérologie complétée par une PCR réalisée sur le sang (phase aiguë suspectée) ou sur des biopsies vaginales ou cutanées (phase chronique) pour confirmer la présence ou l'absence du parasite (SCHARES *et al.*, 2001).

Malheureusement, aucune chimiothérapie n'est disponible contre cette maladie et aucun vaccin n'est autorisé en Europe. Ces options seraient les outils les plus efficaces pour prévenir l'entrée et la propagation de la maladie chez les troupeaux infectés et non infectés. Les stratégies basées sur la chimiothérapie ou la prophylaxie médicale devraient être ciblées pour lutter contre le stade tachyzoïte responsable de la phase aiguë de la maladie. Par conséquent, d'une part, tout vaccin doit être administré à tous les bovins séronégatifs. Un vaccin vivant dérivé d'une souche de gnous a été utilisé en Afrique du Sud (BASSON *et al.*, 1970) et a pu prévenir une maladie clinique chez les bovins qui ont été vaccinés (BIGALKE *et al.*, 1974). À l'heure actuelle, les taureaux importés en Israël sont également vaccinés avec une souche bovine atténuée. Toutefois, ces vaccins vivants ne sont pas autorisés en Europe. D'autre part, des chimiothérapies devraient être utilisées pour traiter les animaux infectés de façon aiguë. Les premières études utilisant divers médicaments anti-infectieux dans les systèmes *in vitro* ainsi que dans les modèles de gerbille et de lapin n'ont pas conduit à l'identification d'un médicament efficace (SHKAP *et al.*, 1985,1987). Des études *in vitro* avec des médicaments modernes tels que les thiazolides et les arylimidamides (CORTES *et al.*, 2007,2011) ont démontré une inhibition de la prolifération des tachyzoïtes, mais ces résultats n'ont pas encore été traduits en un médicament disponible contre la besnoitiose bovine. La sulfadiazine a été rapportée pour réduire la gravité de la maladie chez un taureau infecté de façon aiguë (SCHARES *et al.*, 2009). En revanche, un traitement provisoire des vaches souffrant d'une besnoitiose chronique n'a eu aucun effet bénéfique.

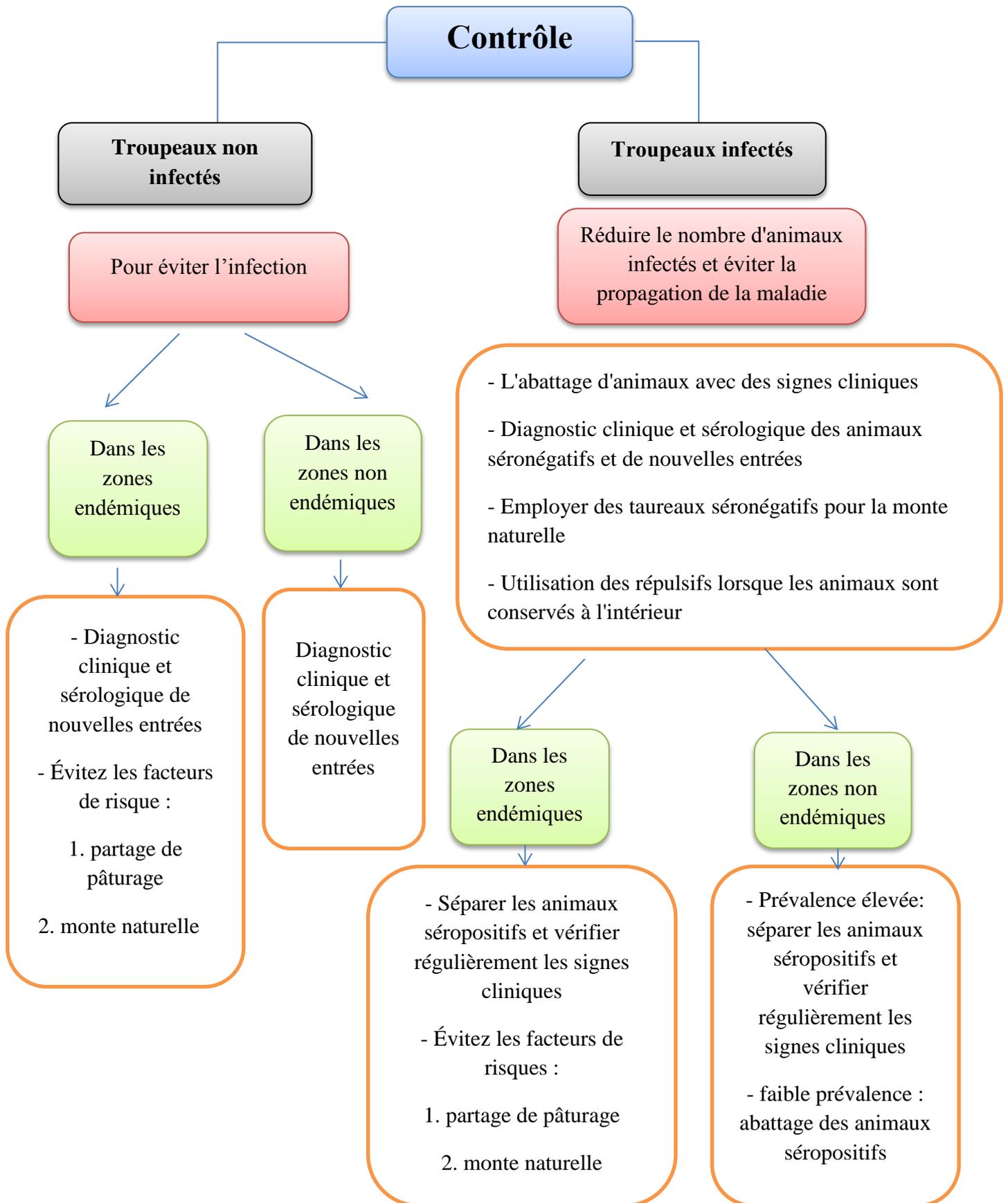


Figure 13 : Schéma de mesures de gestion couplé au diagnostic pour le contrôle de la besnoitiose bovine (ALVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013).

## II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'ANAPLASMOSE

### 1. Présentation générale

#### 1.1. Définition

Autrefois appelée la « piroplasmose blanche », l'anaplasmose bovine est une maladie infectieuse inoculable causée par *Anaplasma marginale*. La maladie est largement distribuée, dans les régions tropicales et subtropicales (DECARO *et al.*, 2008; HOWDEN *et al.*, 2010; KOCAN, *et al.*, 2010; AUBRY et GEALE, 2011) et est actuellement considérée comme une maladie animale à déclaration obligatoire (OIE, 2012).

L'infection est transmise par des vecteurs biologiques (tiques) ou mécaniques (mouches mordantes, aiguilles contaminées et instruments chirurgicaux), et moins fréquemment par voie transplacentaire (RADOSTITS *et al.*, 2007; KOCAN *et al.*, 2010; AUBRY et GEALE, 2011).

L'anaplasmose bovine se manifeste cliniquement par un syndrome fébrile, une anémie sévère et parfois un ictère (RICHAY *et al.*, 1990).

#### 1.2. Histoire et découverte

En 1910, en Afrique du Sud, Arnold Theiler visualise sur les frottis sanguins de bovins atteints de la « Gall-sickness » des corpuscules qu'il nomme « corps marginaux » situés dans les érythrocytes. Il décrit alors cet agent pathogène comme un protozoaire responsable de la maladie et l'appelle *Anaplasma marginale* en raison de sa position périphérique dans les érythrocytes (KOCAN K *et al.*, 2010 ; LEFEVRE P.C ET BLANCOU J, 2003).

Auparavant, ces corpuscules étaient confondus avec des babésies comme le montrent les travaux de Smith et Kilbornes, qui, en 1893, décrivent les mêmes « corps marginaux » mais les assimilent à une forme de *Piroplasma bigemina*. L'anaplasmose décrite par Theiler en 1911 est par la suite reconnue aux Etats Unis en 1926 lorsqu'elle est identifiée par Darlington au Kansas (KOCAN K *et al.*, 2010 ; KOCAN K *et al.*, 2003 ; LEFEVRE P.C et BLANCOU J, 2003). En 1911 Arnold Theiler découvre aussi *Anaplasma centrale* (aujourd'hui dénommée *Anaplasma marginale subsp. centrale*) qui est très proche de *Anaplasma marginale* et cause des symptômes similaires mais beaucoup plus modérés. Theiler a alors l'idée d'utiliser *Anaplasma centrale* comme un vaccin contre *Anaplasma marginale* (KOCAN K *et al.*, 2010 ; LEFEVRE P.C et BLANCOU J, 2003). *Anaplasma marginale* est par la suite rattachée à l'ordre des Rickettsiales en 1957 (DURRANI A et GOYAL S, 2012).

### **1.3. Importance**

L'importance de la maladie réside surtout au niveau médical et économique. Sur le plan médical, les bovins paient un lourd tribut car elle est responsable d'anémie et d'amaigrissement rapide et a tendance à se confondre avec une convalescence de babésiose. Au plan économique, elle se caractérise par une diminution de la production et de la productivité des animaux, et parfois on note une morbidité et une mortalité dans les cheptels bovins (BADOLO H, 2014).

### **1.4. Agent pathogène**

#### **1.4.1. Place d'*Anaplasma marginale* dans la taxonomie**

Pendant longtemps le genre *Anaplasma* a été placé parmi les protozoaires notamment par analogie avec les babésies. Depuis 1957 il a été rattaché à l'ordre des Rickettsiales du fait de ses propriétés métaboliques, morphologiques et sérologiques (DURRANI A et GOYAL S, 2012).

Ainsi *Anaplasma marginale* appartient à la sous-classe  $\alpha$  des protéobactéries et à l'ordre des Rickettsiales. Les bactéries de cet ordre sont définies comme des bactéries Gram négatif, de petite taille, se divisant par scission binaire, cultivables sur des tissus vivants et pouvant causer des infections chez les vertébrés et les invertébrés (KOCAN K *et al*, 2010 ; LEFEVRE P.C ET BLANCOU J, 2003).

Avant 1993 l'ordre des Rickettsiales était subdivisé en trois familles : celle des Rickettsiaceae, celle des Anaplasmataceae et celle des Bartonellaceae. La famille des Rickettsiaceae était divisée en trois tribus : celle des Rickettsiinae, celle des Ehrlichieae, et celle des Wolbachieae.

La classification admise est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Ancienne classification de l'ordre des Rickettsiales (GASQUET C, 2014).

Ordre	Famille	Tribus	Genre
Rickettsiale	Rickettsiaceae	Rickettsiaee	<i>Rickettsia</i>
			<i>Rochalimaea</i>
			<i>Coxiella</i>
		Ehrlichieae	<i>Ehrlichia</i>
			<i>Cowdria</i>
			<i>Neorickettsia</i>
		Wolbachieae	<i>Wolbachia</i>
			<i>Rickettsiella</i>
	Anaplasmataceae		<i>Anaplasma</i>
			<i>Aegyptianella</i>
			<i>Haemobartonella</i>
			<i>Eperythrozoon</i>
	Bartonellaceae		<i>Bartonella</i>
			<i>Grahamella</i>

Cette classification a été plusieurs fois remodifiée depuis, notamment avec l'exclusion de la famille des Bartonellaceae (BIRTLES R.J *et al.*, 1995 ; BRENNER D.J *et al.*, 1993) et des genres *Coxiella* (ROUX V *et al.*, 1997), *Eperythrozoon* et *Haemobartonella* (RIKIHISAY *et al.*, 1997 ; NEIMAR H et KOCAN K.M, 1997). Cependant il faudra attendre 2001 pour qu'une nouvelle classification soit proposée par Dumler *et al* (DUMLER *et al.*, 2001) (tableau 03).

La classification proposée par Dumler *et al.* est basée sur l'analyse des séquences de l'ARN 16S, des gènes de l'opéron GroESL, et des gènes codants pour des protéines de surface (DUMLER *et al.*, 2001 ; YU X.J *et al.*, 2001). Elle a été validé en 2004 et apparait actuellement dans le Bergey's manual of Systemic Bacteriology (BRENNER *et al.*, 2005).

Tableau 03 : Nouvelle classification proposée par Dumler et al en 2001.

Ordre	Famille	Genre	Espèce	
Rickettsiale	Rickettsiaceae	<i>Rickettsia</i>		
		<i>Oriente</i>		
	Anaplasmataceae	<i>Anaplasma</i>		<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
				<i>Anaplasma marginale</i>
				<i>Anaplasma ovis</i>
				<i>Anaplasma bovis</i>
				<i>Anaplasma platys</i>
		<i>Ehrlichia</i>		<i>Ehrlichia chaffeensis</i>
				<i>Ehrlichia ruminantium</i>
				<i>Ehrlichia ewingii</i>
				<i>Ehrlichia ovis</i>
				<i>Ehrlichia canis</i>
				<i>Ehrlichia muris</i>
		<i>Neorickettsia</i>		<i>Neorickettsia helminthoeca</i>
				<i>Neorickettsia risticii</i>
				<i>Neorickettsia sennetsu</i>
		<i>Wolbachia</i>		<i>Wolbachia pipientis</i>

La famille des Anaplasmataceae regroupe des bactéries intracellulaires obligatoires se répliquant dans des vacuoles pressentes dans le cytoplasme de cellules hôtes eucaryotes. Celle des Rickettsiaceae regroupe des bactéries intracellulaires obligatoires qui croissent directement dans le cytoplasme de cellules hôtes eucaryotes (KOCAN K *et al.*, 2005)

## 1.4.2. Cycle biologique

### 1.4.2.1. Chez l'hôte vertébré

Après l'infection initiale et une période d'incubation de 7 à 60 jours (KOCAN *et al.*, 2003), *A. marginale* envahit les érythrocytes et subit des cycles de répllication. Au cours de la primo-infection, il existe une phase d'augmentation géométrique où le nombre d'érythrocytes infectés double toutes les 24 heures (RICHEY et PALMER, 1990). Au cours de cette phase aiguë, le nombre d'érythrocytes infectés peut atteindre 109 cellules par millilitre de sang (PALMER *et al.*, 1999).

Selon la souche d'*Anaplasma* et la susceptibilité de l'hôte, 10 à 90% des érythrocytes peuvent être parasités au stade aigu de l'infection. Au moins 15% des érythrocytes doivent être parasités avant l'apparition des symptômes clinique (RADOSTITS *et al.*, 2007).

Indépendamment de l'âge de l'animale au moment de l'infection, une fois que les bovins sont infectés par *A. marginale*, ils restent porteur pendant une longue période (RICHEY, 1991).

#### **1.4.2.2. Chez la tique**

Le cycle de vie d'*A. marginale* est complexe et bien coordonné avec le cycle d'alimentation des tiques (KOCAN *et al.*, 1992) (Figure 14). Les érythrocytes infectés sont ingérés par les tiques avec un repas sanguin et les premiers sites d'infection sont les cellules tubulaires intestinales et malpighiennes. Au cours de l'alimentation subséquente, beaucoup d'autres tissus, y compris les glandes salivaires, sont infectés d'où *A. marginale* peut être transmis à l'hôte vertébré. A chaque site d'infection, deux étapes d'*A. marginale* se produisent dans une vacuole liée à la membrane dans le cytoplasme des cellules de tiques. La première forme observée dans les colonies d'*A. marginale* est la forme réticulée (végétative), qui se divise par fission binaire et entraîne la formation de grandes colonies contenant des centaines d'organismes. Les formes réticulées sont ensuite transformées en formes denses, qui sont la forme infectieuse et peuvent survivre pendant un court laps de temps en dehors des cellules. Les tiques sont capables d'acquérir une infection après avoir nourri des animaux infectés constamment avec un très faible niveau de rickettsémie. Toutes les souches d'*Anaplasma* ne sont pas également transmises par la tique. L'échec des tiques à infecter et transmettre l'infection dépend des barrières précoces (intestin) et tardives (glandes salivaires) (UETI *et al.*, 2007).

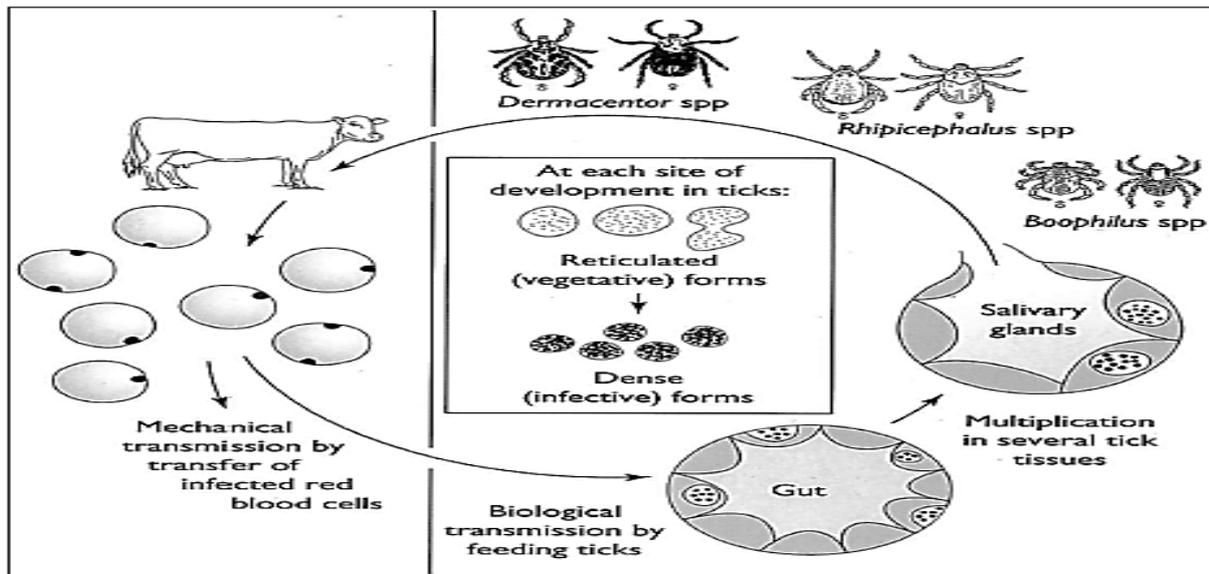


Figure 14 : Représentation schématique du cycle de vie d'*A. marginale* chez le bovin et les tiques. (KOCAN, *et al.*, 2004).

### 1.4.3. Pouvoir antigénique

Nous allons maintenant voir les antigènes principaux d'*Anaplasma marginale* et nous verrons ainsi leur rôle lors de l'infection de l'hôte et des vecteurs ainsi que le rôle immunologique et diagnostique de certains de ces antigènes.

Nous nous intéresserons plus particulièrement à une famille d'antigène très importante qui est la famille des Major surface protéin (MSP) qui regroupe les protéines MSP1, MSP2, MSP3, MSP4 et MSP5 qui ont des rôles immunologiques, infectieux et diagnostiques essentiels.

#### a. MSP1

La protéine MSP1 est composé d'un hétéro-dimère de deux polypeptides structurellement indépendants: MSP1a et MSP1b, liés par des liaisons disulfure (VIDOTTO *et al.*, 1994).

##### ➤ MSP1a

MSP1a est une protéine transmembranaire codée par le gène *msp1 α*. Cette protéine de surface a un rôle dans l'adhésion aux érythrocytes bovins et aux cellules de tiques, et un rôle dans la transmission de la bactérie aux bovins par la tique *Dermacentor spp.* (DE LA FUENTE *et al.*, 2000). Elle est également la cible d'anticorps neutralisants qui empêchent l'infection des érythrocytes *in vivo* (BLOUIN *et al.*, 2003 ; DE LA FUENTE *et al.*, 2004 ; GARCIA-GARCIA *et al.*, 2004 ; McGAREY *et al.*, 1994).

MSP1a contient des épitopes pour les lymphocytes et induit une solide réponse des lymphocytes T (DE LA FUENTE *et al.*, 2010 ; KOCAN K *et al.*, 2010).

### ➤ 5MSP1b

MSP1b est une protéine polymorphique codée par une famille de gènes nommés *mSP1β* (VISESHAKUL *et al.*, 2000). Plusieurs variants de MSP1b sont présents simultanément lors de l'infection (BOWIE *et al.*, 2002).

MSP1b est une andésine permettant l'adhésion de la bactérie aux érythrocytes bovins mais pas aux cellules de tiques contrairement à MSP1a (McCGAREY D et ALLRED D, 1994).

MSP1b possède un épitope ayant un rôle dans la fixation des anticorps neutralisant à la bactérie.

### b. MSP2

Lors d'infections chroniques, la séquence de la protéine MSP2 varie de manière cyclique avec émergence de nouveaux variants toutes les 4 à 8 semaines (ARULKANTHAN *et al.*, 1999).

MSP2 est codée par une famille de gènes polymorphiques. En fait il n'existe qu'une séquence transcrite de MSP2 sur le génome mais il existe 9 pseudogènes de MSP2, qui sont des séquences d'ADN non transcrites réparties sur le génome, et capables de se recombiner dans la séquence transcrite du gène MSP2 pour donner de nouveaux variants (BRAYTON *et al.*, 2001 ; LOHR *et al.*, 2004).

MSP2 est à l'origine d'une réponse immunitaire protectrice. Les régions conservées mais aussi la région hyper-variable de MSP2 portent en effet des T épitopes ce qui pourrait expliquer l'existence d'une rickettsiémie cyclique lors d'infections chroniques (BROWN *et al.*, 1998). Une nouvelle réponse lymphocyte T est initiée lors de l'émergence d'un nouveau variant de MSP2, permettant une augmentation de la rickettsiémie le temps que cette réponse se mette en place, et entraînant par la suite une diminution de la rickettsiémie lorsque la réponse est en place. Cependant lors d'infections chroniques la rickettsiémie reste tout de même plus faible que lors de l'infection initiale grâce à la réponse dirigée contre les épitopes conservés (BROWN *et al.*, 1998).

### c. MSP3

MSP3 est codée par une famille de gènes polymorphiques (ALLEMAN *et al.*, 1997). Elle présente le même mécanisme de variation antigénique que MSP2 (MEEUS *et al.*, 2003).

Il a été démontré que des variantes simples de MSP3 sont exprimées lors d'une infection précoce chez le bovin, et de multiples variantes antigéniques n'émergent que sous pression immunitaire sélective pendant une infection persistante (PALMER et BRAYTON, 2013).

#### d. MSP4

MSP4 est conservée dans les différentes souches d'*Anaplasma marginale* d'un point de vue structurel et génétique et elle est codée par un seul gène. Le rôle de cette protéine n'est pas connu (KOCAN *et al.*, 2003 ; OBERLE *et al.*, 1997 ; PALMER *et al.*, 1996). Le fait qu'elles restent conservées suggère qu'elles sont importantes dans le cycle de vie d'*Anaplasma*.

#### e. MSP5

MSP5 est codée par un seul gène et partage un épitope avec *Anaplasma centrale* et *ovis*. MSP5 est utilisée pour l'élaboration de tests diagnostiques car elle est très stable. De plus, elle est la cible d'immunoglobulines synthétisées lors de l'infection à *Anaplasma marginale* (BARBET *et al.*, 1999 ; KNOWLES *et al.*, 1996 ; REYNA-BELLO *et al.*, 1998 ; VISSER *et al.*, 1992).

## 1.5. Epidémiologie

### 1.5.1. Répartition géographique

#### 1.5.1.1. Répartition mondiale

Comme le montre la figure suivante, *A.marginale* est l'un des agents pathogènes les plus répandus des bovins dans les zones tropicales et subtropicales du monde (AUBRY et GEALE, 2011). Il est endémique dans le Nouveau Monde, l'Amérique centrale et du Sud, l'Australie et certaines régions d'Asie et d'Afrique (KOCAN *et al.*, 2010b). Aux États-Unis, l'anaplasmosse est enzootique dans les états du sud, mais en raison du mouvement du bétail, l'anaplasmosse a été signalée dans presque tous les états (KOCAN *et al.*, 2010a). Dans certains pays, il est considéré comme une maladie animale étrangère, par exemple Au Canada, où une épidémie d'anaplasmosse résulte de la transmission mécanique de l'organisme à partir de bovins importés (BOULANGER *et al.*, 1971). En Europe, il se trouve principalement dans les pays méditerranéens comme l'Italie (DE LA FUENTE *et al.*, 2005e; DE LA FUENTE *et al.*, 2005f; TORINA *et al.*, 2008) et l'Espagne (DE LA FUENTE *et al.*, 2005d) , Bien que peu de cas isolés aient également été signalés en Hongrie (HORNOK *et al.*, 2012) et en Autriche (BAUMGARTNER *et al.*, 1992).

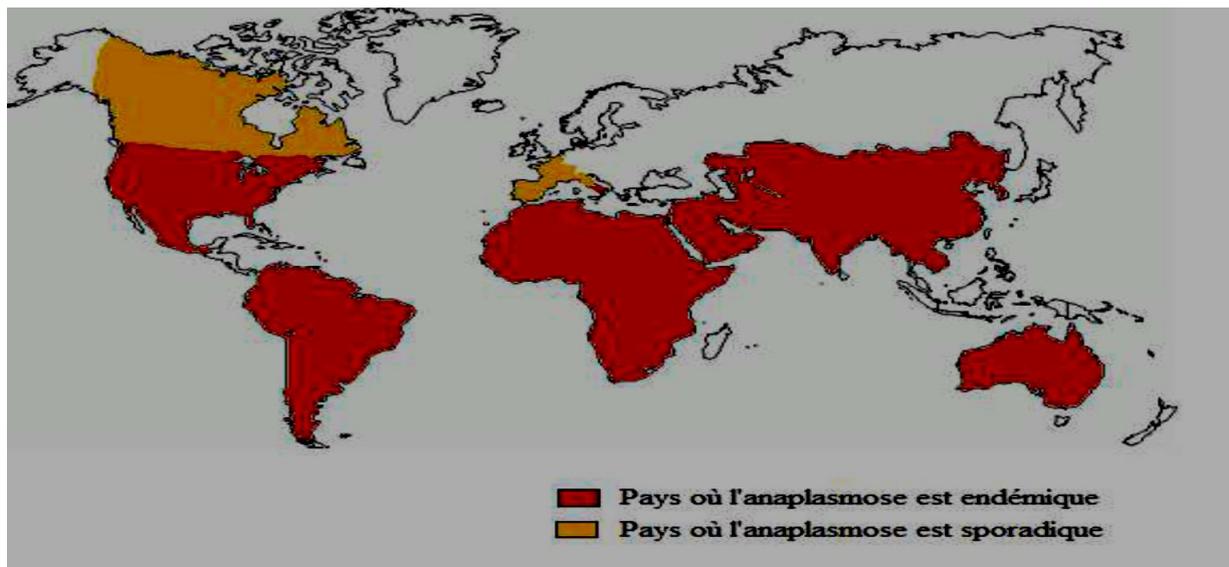


Figure 15 : Répartition mondiale de l'anaplasmosse (GASQUET, 2014).

### 1.5.1.2. En Algérie

En 2003, Ziam et ses collaborateurs ont décrit dans une enquête épidémiologique la présence d'*Anaplasma marginale* à l'Est de l'Algérie (Annaba, Al taref). Dans une autre étude la distribution de cette bactérie a été également relevée (AMANZOUAGHENE, 2014).

### 1.5.2. Transmission

Les espèces d'*Anaplasma* sont transmises mécaniquement ou biologiquement par des vecteurs arthropodes. *Anaplasma marginale* est transmise (1) biologiquement: les érythrocytes infectés sont ingérés par des tiques; *A. marginale* se réplique dans les cellules intestinaux et les glandes salivaires de la tique et est ensuite transmis via la salive de la tique chez les ruminants non infectés; (2) mécaniquement: les érythrocytes infectés sont transférés de bovins infectés aux bovins sensibles par des mouches mordantes ou par le matériel contaminés, sans amplification d' *A. marginale*; Et (3) La transmission transplacentaire a également été rapportée (GRAU *et al.*, 2013; MALDONADO *et al.*, 2012; REY VALEIRON *et al.*, 2003; ZAUGG, 1985). Les érythrocytes infectés se déplacent à travers le placenta dans l'utérus de la vache infectée jusqu'à leur progéniture, sans amplification d'*A. marginale* (AUBRY ET GEALE, 2011).

On a signalé que diverses espèces de tiques étaient des vecteurs d'*A. marginale* dans différentes régions du monde (KOCAN *et al.*, 2004). L'ADN d'*A. marginale* a été identifié dans de nombreuses espèces de tiques ou dans des tiques qui ont transmis la maladie expérimentalement. Cependant, cela n'implique pas nécessairement qu'ils sont capables de transmettre les organismes dans des conditions naturelles (SHKAP *et al.*, 2009; ZIVKOVIC

*et al.*, 2007). En outre, une analyse récente suggère que, dans certaines régions, les espèces de tiques qui n'ont pas encore été considérées comme des vecteurs peuvent également transmettre *A. marginale* (DE LA FUENTE *et al.*, 2005d; FYUMAGWA *et al.*, 2009; ZAHANG *et al.*, 2013). Cependant, *Rhipicephalus (Boophilus) spp.* Sont les vecteurs les plus répandus de l'anaplasmose dans la plupart des pays tropicaux et subtropicaux (Tableau 04).

Tableau 04 : Principaux vecteurs de tique d'*Anaplasma marginale* dans différents pays du monde

Pays	Espèce de tique	Référence
Inde, Afrique du Sud, Brésil	<i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> <i>Microplus</i>	(GUGLIELMONE, 1995; POTGIETER, 1996; GHOSH <i>et al.</i> , 2007)
Irak	<i>B. annulatus</i>	(AMEEN <i>et al.</i> 2012)
Amérique du Nord	<i>Dermacentor andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>D. albipictus</i>	(AUBRY et GEALE, 2011)
USA	<i>Dermacenter andersoni</i> , <i>Dermacenter variabilis</i> , <i>Argas persicus</i>	(DA SILVA, 2008)
Afrique du Nord	<i>Ixodes ricinus</i>	(DA SILVA, 2008).
Centre et Afrique du sud	<i>R. simus</i>	(Merck Veterinary Manual 2014).
Afrique du Sud	<i>Rhipicephalus microplus</i> , <i>R. evertsi evertsi</i> , <i>R. simus</i> , <i>R. decoloratus</i> , and <i>Hyalomma marginatum rufipes</i>	(DE WAAL, 2000)
Zambie	<i>A. variegatum</i> , <i>B. decoloratus</i> , <i>R. evertsi</i>	(MAKALA <i>et al.</i> , 2003).
Europe	<i>Ixodes ricinus</i>	(DA SILVA, 2008)
Hongrie	<i>D. reticulatus</i>	(HORNOK <i>et al.</i> 2012)
Australie	<i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> . <i>Microplus</i>	(BOCK <i>et al.</i> 2006)
Nigérie	<i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> .	(LORUSSO <i>et al.</i> , 2016)

	<i>Microplus</i>	
Cote d'Ivoire	<i>Rhipicephalus (Boophilus).</i> <i>Microplus</i>	(EHOUNOUD <i>et al.</i> , 2016)

Divers autres arthropodes mordants ont été impliqués comme vecteurs mécaniques. La transmission mécanique d'*A. marginale* par les diptères hématophages de genres *Tabanus*, *Stomoxys* et les moustiques (EWING, 1981; POTGIETER, *et al.*, 1981) ont été signalés. Cette forme de transmission mécanique est considérée comme la principale voie de diffusion d'*A. marginale* dans les régions d'Amérique centrale et du Sud et d'Afrique où les vecteurs de tiques ne se produisent pas (EWING, 1981) et où *Rhipicephalus microplus*, la tique de bétail tropicale, ne semblent être un vecteur biologique d'*A. marginale* (FIGUEROA, *et al.*, 1998). La transmission mécanique d'*A. marginale* se produit également lorsque le sang infecté est transféré à des bovins sensibles via des foyers contaminés par le sang ou des parties buccales de mouches mordantes (EWING, 1981). *Anaplasma marginale* peut également être transmise pendant la vaccination contre d'autres maladies à moins qu'une aiguille fraîche ou stérilisée ne soit utilisée pour l'injection de chaque animal. Une transmission similaire au moyen d'instruments chirurgicaux non stérilisés a été décrite (manuel terrestre de l'OIE 2008).

La transmission transovarienne de quelques pathogènes transmissibles par les tiques, par ex. *Babesia spp.* par un seul hôte *Boophilus spp.*, est bien connue (HOWELL *et al.*, 2007). Pourtant, la transmission d'*A. marginale* d'une génération de tiques à l'autre reste controversée, bien que Theiler (1912) et quelques autres auteurs aient suggéré que ce type de transmission se produit (ANTHONY et ROBY, 1962; REES et AVERY, 1939; STICH *et al.*, 1989). Il est intéressant de noter que la multiplication d'*A. marginale* dans les tissus des *R. microplus* femelles isolés a été confirmée (RIBEIRO et LIMA, 1996). De plus, dans les œufs et les larves dérivés de tiques de *R. microplus* recueillies à partir de bovins infectés, des fragments d'ADN spécifiques d'*A. marginale* ont été amplifiés. Pourtant, la transmission d'*A. marginale* par ces larves aux animaux n'a jamais été prouvée (MOURA *et al.*, 2003). Certains auteurs ont suggéré que *Ehrlichia spp.* et *Anaplasma spp.* ne sont pas transmis par voie transovarienne en raison de l'absence de aldolase/aldolase domain protein (DUNNING HOTOPP *et al.*, 2006).

### 1.5.3. Prévalence et facteurs de réceptivités

#### 1.5.3.1. Prévalence

L'anaplasmosse bovine est décrite dans différentes régions du monde et dans les 5 continents (Kocan *et al.*, 2010) (Tableau 05).

Tableau 05 : Séroprévalence de l'infection par *Anaplasma marginale* dans certains pays du monde.

Localisation		Test utilisé	Séropositivité	Référence
Afrique	Congo	i-ELISA	24.5%	(TSHILENGE <i>et al.</i> , 2015)
	Algérie (région d'Alger)	c-ELISA	43.5%	(AMANZOUAGHENE, 2014)
	Maroc	c-ELISA	20.5%	(T. RAHALI <i>et al.</i> , 2014)
	Maroc	c-ELISA	22.8%	(AIT HAMOU <i>et al.</i> , 2012)
	Zambie	i-ELISA	76.5%	(ANTONIO <i>et al.</i> , 2011)
Asie	Iraq (Wassit)	i-ELISA	13.04%	(OLA et GHYDA'A, 2015)
	Pakistan	c-ELISA	31.05%	(ATIF <i>et al.</i> , 2013)
	Egypte	c-ELISA	28%	(RAGAB M <i>et al.</i> , 2016)
	Kenya	ELISA ?	53.4%	(F. D. WESONGA <i>et al.</i> , 2016)
	Malaisie	c-ELISA	77.6%	(WAHAB <i>et al.</i> , 2012)
Europe	Turquie	c-ELISA	37.8%	(AÇICI <i>et al.</i> , 2016)
	Espagne	c-ELISA	61%	(DE LA FUENTE <i>et al.</i> , 2005b)
	Hongrie	c-ELISA	80.8%	(HORNOK <i>et al.</i> , 2008)
	Italie	c-ELISA	57%	(TORENA <i>et al.</i> , 2008b)
Amérique	Costa Rica	c-ELISA	87.5%	(SHEBISH <i>et al.</i> , 2012)
	USA	c-ELISA	15.2%	(HAIRGROVE <i>et al.</i> , 2014)

#### 1.5.3.2. Facteurs de réceptivités

##### a. Age

La plupart des auteurs s'accordent à dire que l'anaplasmosse bovine est une maladie d'animaux jeunes et la tranche d'âge la plus touchée est celle de 2 ans et plus (AL-MOSSAWY, 2012 ; CHOWDHURY *et al.*, 2006, AL-KHALEDI, 2008). Les veaux

présentent une résistance naturelle jusqu'à l'âge de 9 -10 mois, puis la sensibilité augmente progressivement avec l'âge (CAMUS et UILENBERG, 2010).

#### b. Race

Les animaux issus de races améliorées semblent plus sensibles (KOCAN *et al.*, 2003).

#### c. Sexe

Dans les zones où l'infection par *Anaplasma marginale* est plus forte, le sexe ne semble pas avoir d'influence sur la réceptivité à la maladie (TSHILENGE *et al.*, 2015 ; HUNGERFORD L et SMITH, 1997).

### **1.5.4. Stabilité endémique**

Dans les régions où les vecteurs de tiques sont abondants, la prévalence de l'infection par *A. marginale* est relativement stable dans la population bovine. Cette situation est connue sous le nom de stabilité endémique. Il se caractérise par un pourcentage élevé de bovins infectés mais avec peu d'animaux cliniquement affectés (COLEMAN *et al.*, 2001; CORONA *et al.*, 2005). Deux facteurs principaux contribuent à cette stabilité: l'immunité passive fournie par l'apport de colostrum et l'infection précoce des veaux. Comme mentionné précédemment, les jeunes veaux acquièrent généralement l'infection sans démontrer les signes cliniques. Cependant, une fois que l'immunité est établie, les bovins adultes sont infectés de façon persistante, ce qui assure une maintenance au sein de la population (CORRIER et GUZMAN, 1977; CORONA *et al.*, 2005).

## 2. Etude clinique

### 2.1. Pathogénie

*A. marginale* est connu pour infecter in vivo uniquement des érythrocytes matures et circulants des ruminants domestiques et sauvages (KOCAN, 1992) (figure 16-A). Cependant, des études in vitro et in vivo indiquent que *A. marginale* infecte également les cellules endothéliales, ce qui peut avoir des implications pour la pathogénèse et les mécanismes immunitaires (CARRENO *et al.*, 2007 ; MUNDERLOH *et al.*, 2004).

*A. marginale* entre dans les érythrocytes par endocytose et réside dans la vacuole liée à la membrane, où elle se divise par division binaire. La vacuole liée à la membrane dérive de la membrane érythrocytaire et peut contenir 4 à 8 organismes (KOCAN *et al.*, 1978) (Figure 16-B).

La maladie clinique chez les bovins est directement liée au nombre d'érythrocytes infectés. Au cours de l'infection initiale, il y a une phase d'augmentation géométrique pendant laquelle, le nombre des globules rouges infectés double presque toutes les 24 h (MILLER, 1956). Dans la phase aiguë, jusqu'à 70% des érythrocytes peuvent être infectés (KIESER *et al.*, 1990; KOCAN *et al.*, 2010a), bien que les premiers symptômes puissent se produire dès que seulement 15% des érythrocytes sont infectés. La période d'incubation est en relation directe avec le nombre d'organismes dans la dose infectieuse et qui varie de 7 à 60 jours, avec une moyenne de 28 jours (KOCAN et DE LA FUENTE, 2003).

*A. marginale* quitte la cellule hôte sans la perturber. Les cellules qui sont physiquement ou chimiquement altérées au cours de la maladie sont reconnues et phagocytées par les cellules réticulo-endothéliales bovines, ce qui entraînera le développement d'une anémie légère à sévère et d'une ictère, sans hémoglobinémie et hémoglobinurie (ŽIVKOVIC, 2010 ; KOCAN *et al.*, 2003).

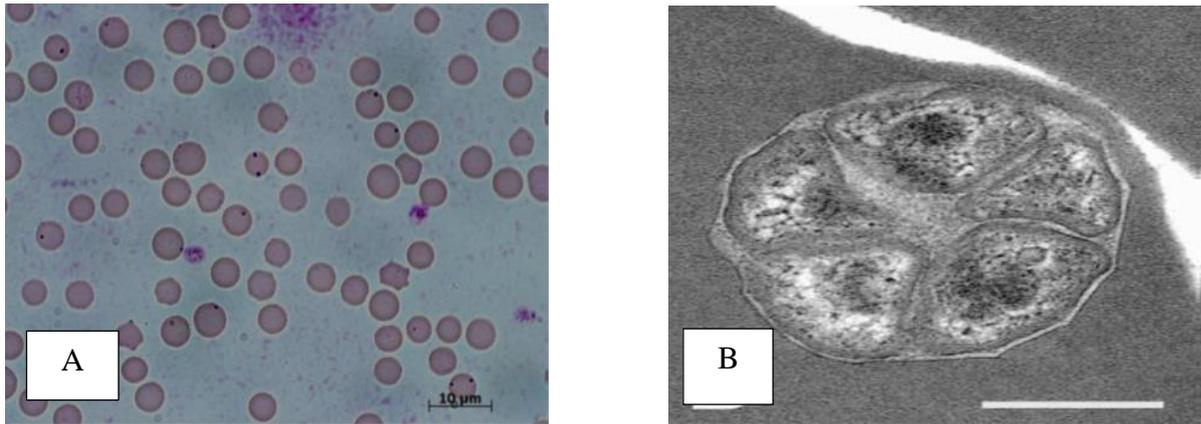


Figure 16 : Erythrocytes bovins infectés par *Anaplasma marginale*. A : Les corps d'inclusion situés à la périphérie de l'érythrocyte dans un frottis de sang coloré. B : Un érythrocyte infecté avec cinq corps d'inclusion d'*A. marginale*. Microphotographie électronique (prise par Kocan *et al.*, 2004).

## 2.2. Immunité

Plusieurs parties du système immunitaire semblent jouer un rôle dans la réponse immunitaire à *A. marginale*. La réponse en anticorps a été révélée comme une partie importante de la protection après la vaccination (examinée par PALMER *et al.*, 1999), mais le sérum immun seul n'est pas protecteur (GALE *et al.*, 1992). Les réponses à médiation cellulaire ont également montré qu'elles jouent un rôle dans la protection (BROWN *et al.*, 1998), mais la réponse des cellules T est inhibée par l'agent pathogène pour faciliter l'infection persistante (HAN *et al.*, 2010). En raison de cette complexité, il reste une tâche permanente pour clarifier quelles parties du système immunitaire peuvent ou devraient être ciblées par les vaccins.

### 2.2.1. Réponse en anticorps

La réponse humorale est entre autre dirigée contre les protéines MSP1 et MSP2 (TEBELE *et al.*, 1991).

Comme pour toutes les bactéries intra-cellulaires, la réponse humorale n'a qu'un rôle limité, car durant la majeure partie du temps les bactéries sont à l'abri de cette réponse humorale dans les érythrocytes. Cependant les anticorps peuvent avoir un rôle en empêchant la fixation des bactéries aux érythrocytes et donc leur internalisation ou en permettant l'activation de la réponse cellulaire (GASQUET, 2014).

#### a. Réponse à MSP1

Les anticorps dirigés contre le complexe MSP1, MSP1a ou MSP1b permettent l'opsonisation de la bactérie et empêchent ainsi sa fixation aux érythrocytes.

L'immunisation des bovins avec la protéine MSP1 provenant de bactéries prélevées dans les érythrocytes entraîne une protection des animaux à la fois contre les souches homologues et les souches hétérologues. Cette protection est associée au développement d'anticorps neutralisants et opsonisants (BROWN *et al.*, 2001 ; PALMER *et al.*, 1989 ; DE LA FUENTE *et al.*, 2004).

Cela montre l'importance de cette protéine dans la réponse immunitaire de l'hôte.

#### b. Réponse à MSP2

Il y a aussi une immunité humorale dirigée contre MSP2 qui est efficace. En effet, si le titre en anticorps anti-MSP2 est suffisant, cela peut permettre de bloquer l'infection par les bactéries porteuses de ce variant de MSP2 (PALMER *et al.*, 2000).

Lors d'auto stérilisation des bovins, on observe la disparition des anticorps anti-MSP2.

Cependant l'importance de l'immunité humorale dans la réponse à *Anaplasma marginale* est à moduler, car il n'y a pas de transmission passive de l'immunité lorsque l'on transfuse à des veaux non immunisés du sérum de vaches immunisées contre *Anaplasma marginale* et contenant des anticorps dirigés contre cette bactérie. De plus, on constate qu'il y a transmission d'une immunité colostrale de la mère au veau qui persiste environ deux mois mais qui n'est pas protectrice (BERRY *et al.*, 1981 ; GALE *et al.*, 1992 ; GALE *et al.*, 1997 ; HERRERO *et al.*, 1998).

Cela montre que l'immunité humorale n'est pas suffisante. En outre, on observe qu'après un traitement immunosuppresseur, la bactériémie augmente chez les porteurs chroniques. Cette augmentation est trop rapide pour être consécutive à une baisse du taux d'Immunoglobuline G2, ce qui laisse supposer l'existence d'une immunité cellulaire (BROWN *et al.*, 1998).

### 2.2.2. Réponse cellulaire

#### 2.2.2.1. Mécanismes généraux de la réponse cellulaire

Après immunisation avec des extraits de membrane externe d'*Anaplasma marginale* purifiés, on observe une protection des veaux contre des souches homologues. Cette protection est associée à une réponse des cellules mononucléées du sang spécifiques de l'antigène (lymphocytes T CD4+ et lymphocytes produisant l'interféron gamma), elle protège les animaux à la fois contre les signes cliniques et contre le portage. Ainsi l'immunité cellulaire est le mécanisme protecteur le plus important contre *Anaplasma marginale* (BROWN *et al.*, 1998).

Comme pour toutes les bactéries intra-cellulaires, la réponse à *Anaplasma marginale* est avant tout basée sur une réponse cellulaire. En effet, les bactéries ne sont accessibles aux

mécanismes de défense humoraux qu'avant leur entrée dans les érythrocytes donc durant un temps très bref.

Cette réponse immunitaire cellulaire est dirigée contre des épitopes situés sur MSP1a, MSP1b, MSP2 et MSP3 (BROWN *et al.*, 1998 ; KOCAN *et al.*, 2003).

Les effecteurs de l'immunité les plus importants dans la réponse à *Anaplasma marginale* sont les macrophages, qui appartiennent au système réticulo-endothélial.

Les lymphocytes T CD4+ de type Th1 ont, quant à eux, un rôle d'activation des macrophages. En effet, après la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes CD4+ naïfs par l'intermédiaire du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type 2, ces Lymphocytes T CD4+ se différencient en lymphocytes T CD4+ de type Th1 et sécrètent des lymphokines telles que l'interféron  $\gamma$  et le Tumor Nécrosis Factor (TNF) (BROWN *et al.*, 1998), qui ont la capacité d'activer les macrophages. On observe lors de l'immunisation des animaux contre *Anaplasma marginale*, une production d'Interféron gamma importante, ce qui peut faire penser à une réponse contre *Anaplasma marginale* majoritairement basée sur cette production d'interféron  $\gamma$  (BROWN *et al.*, 1998).

L'interféron  $\gamma$  permet : la synthèse d'Immunoglobuline G2 par les lymphocytes B, qui sont les anticorps opsonisants principaux chez les bovins, et l'activation des macrophages entraînant une augmentation de l'expression des récepteurs, de la phagocytose, de la fusion des phagosomes et des lysosomes et la libération de monoxyde d'azote (NO) (KOCAN *et al.*, 2003).

Le rôle du monoxyde d'azote (NO) produit par les macrophages contre *Anaplasma marginale* n'est pas encore bien établi. En effet, le monoxyde d'azote est un inhibiteur de nombreux pathogènes intracellulaires dont les bactéries du genre *Rickettsia*. Cependant l'action du monoxyde d'azote contre *Anaplasma marginale* n'a pas pu être démontrée. Au contraire : l'utilisation d'un inhibiteur du NO (l'aminoguanine) permet de diminuer la bactériémie, peut-être à cause de l'effet immunosuppresseur du monoxyde d'azote (GALE *et al.*, 1997).

En plus de leur rôle dans la phagocytose, les macrophages agissent dans la régulation de la réponse cellulaire à *A. marginale*. En effet, ils produisent des cytokines telles que l'interleukine 12 (IL-12) qui ont un rôle essentiel pour permettre une réponse efficace contre la bactérie.

Des études ont ainsi montré que l'utilisation de l'interleukine 12, qui est sécrétée lors d'infection par les macrophages, comme adjuvant dans un vaccin contenant MSP2, augmente la production d'interféron gamma par les cellules CD4+, accroît la multiplication des cellules dans les nœuds lymphatiques, entraîne la production d'Interleukine 2, et augmente le taux en

anticorps. Ainsi l'Interleukine 12 permet la mise en place d'une réponse mémoire à l'immunoglobuline G et une réponse des cytokines (TUO *et al.*, 2003).

Les lymphocytes T helpers ont aussi un rôle puisqu'ils permettent aux lymphocytes B de synthétiser des immunoglobulines G2 plutôt que des immunoglobulines G1. Or, les immunoglobulines G2 sont les principaux anticorps opsonisants chez les bovins (BROWN *et al.*, 1998).

Lors du premier contact de l'organisme avec *Anaplasma marginale* il y a aussi différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes T mémoires qui vont avoir un rôle essentiel car leur réponse rapide contribue au contrôle de la bactériémie durant l'infection persistante (durant laquelle la bactériémie reste cent à mille fois inférieure à celle observée durant la phase aiguë). Cette reconnaissance par les Lymphocytes T mémoire pourrait aussi accélérer la synthèse d'anticorps par les lymphocytes B (BROWN *et al.*, 2001a).

#### **2.2.2.1. Synergie entre les protéines**

Une étude a montré l'importance de la liaison entre les protéines pour la reconnaissance des épitopes et notamment de la liaison entre MSP1a et MSP1b car la réponse immunitaire contre la protéine MSP1 n'est efficace que si les animaux sont immunisés avec un dimère contenant ces deux protéines (BROWN *et al.*, 2001b ; PALMER *et al.*, 1989).

De même, aucune protéine de surface isolée ne peut induire la même protection qu'un complexe formé de protéines de la membrane externe ou d'un complexe formé de protéines de surface. Cela montre la nécessité de l'existence d'une diversité d'antigène pour induire une protection, ou de la nécessité de la reconnaissance conjointe de protéines dans des complexes associés aux membranes (NOH *et al.*, 2008).

La réponse anticorps anti-MSP1a est plus forte lorsque l'immunisation est faite avec des *Anaplasma marginale* tuées dérivées d'érythrocytes bovins, alors que lorsque *Anaplasma marginale* dérive de la culture de cellules de tique la réponse en anticorps est surtout dirigée contre MSP1b. Or on peut observer que MSP1a est moins exprimée dans les glandes salivaires et les cellules de tique en culture, que dans les érythrocytes. Cette différence est due à une différence de transcription. Ainsi il se pourrait qu'il existe une immunodominance de MSP1a sur MSP1b : si MSP1a est présente en grande quantité (comme dans les érythrocytes) moins d'anticorps contre MSP1b sont synthétisés (NOH *et al.*, 2006).

### 2.3. Symptomatologie

L'apparition des signes cliniques et leur gravité varie considérablement selon la forme clinique de la maladie. Les animaux infectés par *A. marginale* peuvent développer une forme aiguë de la maladie ou devenir porteurs chroniques asymptomatiques.

Lorsque les animaux sont atteints de la forme aiguë de la maladie, ils présentent une hyperthermie oscillante (généralement inférieure à 40,5°C) accompagnée d'un syndrome fébrile qui se manifeste par une perte de l'appétit et de poids, une chute de la production laitière et une léthargie (RADWAN *et al.*, 2013). L'anémie peut être tellement sévère qu'elle entraîne même des bruits cardiaques augmentés et une respiration difficile. A cela s'ajoutent une chute de production laitière, voire une agalactie, et un avortement en fin de gestation est possible, secondaire à une hypoxie d'origine anémique (KOCAN *et al.*, 2003 ; CORREA *et al.*, 1978 ).

L'anémie est la conséquence de l'érythrophagocytose des hématies parasitées ou non. 70 % des hématies, voire plus, peuvent être infectées. Les urines ne sont pas colorées car il n'y a pas d'hémolyse (KOCAN *et al.*, 2003). La destruction progressive des globules rouges ne s'accompagne pas d'une hématopoïèse compensatrice et donc il n'y a pas de régénération sanguine expliquant la couleur blanc porcelaine des muqueuses. La mort peut survenir en quelques jours.

Les animaux infectés restent porteurs durant toute leur vie. Ils développent une infection permanente caractérisée par une bactériémie faible non détectable sur frottis sanguin et par l'existence d'une immunité de longue durée. Ces animaux porteurs chroniques ne présentant pas de signes cliniques mais ils constituent un réservoir non négligeable pour la maladie (RADWAN *et al.*, 2013 ; KOCAN *et al.*, 2010 ; PONCET, 1987).

Rappelons que les signes cliniques chez les bovins semblent fonction de l'âge. De plus, ils sont assez rares dans les régions d'enzootie parce que l'âge moyen au moment de l'infection est généralement inférieur à 24 semaines. On a alors un pic de bactériémie pendant une à deux semaines, mais elle reste généralement faible (inférieure à 1%). Quelques veaux montrent alors des signes cliniques tels que faiblesse et apathie. Ces animaux restent ensuite porteurs durant toute leur vie mais ne présenteront plus d'épisodes cliniques (Collectif 2011). Lorsque l'organisme infecte des bovins plus âgés (animaux de plus d'un an), les signes cliniques de la maladie sont courants (KOCAN *et al.*, 2010).

### 3. Diagnostic

Le diagnostic clinique est souvent difficile car l'anaplasmosse peut faire suite à une babésiose (hémoglobinurie, diarrhée...), une anaplasmosse granulocytaire bovine (AGB) (pas d'anémie) ou une autre maladie générale. Les signes d'appels sont un bovin hypertherme, anémié, sans hémoglobinurie, en pâture à la belle saison.

De la même manière que pour l'AGB, on peut faire appel au diagnostic de laboratoire avec différentes techniques (OIE, 2008).

#### 3.1. Diagnostic bactériologique

L'examen microscopique d'étalements de sang ou d'organes, coloré avec le colorant de Giemsa est la méthode la plus utilisée pour identifier *Anaplasma* chez des animaux cliniquement affectés (OIE, 2008a). Ce diagnostic est aisé sur étalement de sang dans la forme aigue, où 70% ou plus des hématies sont parasitées (CHARTIER *et al.*, 2000). Dans ces étalements, *A. marginale* apparaît sous forme d'inclusions rondes, denses, entourés d'un petit halo clair, pourpres foncées de 0,3 à 1 micron de diamètre aux contours légèrement irréguliers (ce qui les différencie des corps de Joly qui sont parfaitement ronds) accolées à la membrane des érythrocytes (à l'intérieur).

Cette méthode ne peut donner de réponse positive qu'au stade aigue avec une sensibilité dépendante de l'opérateur, et une très bonne spécificité. Elle a cependant l'avantage d'être rapide et peu onéreuse.

L'examen des frottis sanguins n'a aucune fiabilité pour la détection d'animaux pré-symptomatiques ou porteurs. Dans ces cas, l'infection est généralement diagnostiquée par une démonstration sérologique d'anticorps avec confirmation par des méthodes de détection moléculaire.

#### 3.2. Diagnostic sérologique

Plusieurs tests sérologiques ont été largement utilisés pour les études épidémiologiques: test de fixation du complément (FC), test d'agglutination sur carte (CAT), test d'immunofluorescence indirecte (IFI), ainsi que divers tests immuno-enzymatique tels que test ELISA compétitif (c-ELISA), ELISA indirect et le dot ELISA. Les deux tests sérologiques actuellement préférés pour l'identification des animaux infectés sont le c-ELISA et le CAT (OIE, 2008; KOCAN, *et al.*, 1992a, b, DE LA FUENTE, *et al.*, 2005a, b).

### **3.2.1. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)**

Le test sérologique le plus précis actuellement disponible pour identifier les bovins infectés par *Anaplasma* est un c-ELISA qui utilise un anticorps monoclonal spécifique au MSP5, car ce test détecte spécifiquement la présence d'anticorps sériques qui visent une protéine de surface, MSP5 d'*Anaplasma* spp. (KNOWLES, *et al.*, 1996; TORIONI, *et al.*, 1998; STRIK, *et al.*, 2007). Cependant, le test ne peut pas différencier entre *A. marginale* et certaines des autres espèces d'*Anaplasma*, car ils expriment tous l'antigène MSP5 (VISSER, *et al.*, 1992). Ce test a la capacité de détecter très tôt les porteurs parfois avant même l'apparition des signes cliniques à partir de neuf jours après l'infection (COETZEE *et al.*, 2007 ; KNOWLES *et al.*, 1996 ; TORIONI DE ECHAIDE *et al.*, 1998). Il présente une spécificité de 95 à 100% selon les études (KNOWLES *et al.*, 1996 ; ARAJO *et al.*, 2005 ; MADRUGA *et al.*, 2000). Ce test permet aussi de détecter les porteurs jusqu'à six ans après l'infection. La sensibilité du test est de 100% durant le pic de bactériémie et après, lorsque l'infection devient chronique (COETZEE *et al.*, 2007). Ce test permet donc de détecter les porteurs chroniques ce qui est très intéressant dans la lutte contre l'anaplasmose car cela permet d'éviter d'introduire dans un troupeau des animaux porteurs.

### **3.2.2. Test de fixation du complément**

La réaction de fixation du complément (FC) n'est plus considérée comme un test fiable pour la certification de la maladie chez les porteurs chroniques en raison d'une sensibilité faible (BRADWAY *et al.*, 2001 ; DURRANI et GOYAL, 2012 ; NIELSEN *et al.*, 1996). Des réactions croisées entre les *Anaplasma* spp peuvent compliquer l'interprétation des résultats sérologiques. Ainsi cette méthode est progressivement abandonnée au profit de la méthode d'ELISA compétitif.

### **3.2.3. Agglutination sur carte**

Il s'agit d'une méthode simple, pratique, rapide et sensible (98%). Ce test est le test de référence aux Etats Unis. Cependant il ne permet pas de détecter les porteurs chroniques (DURRANI et GOYAL, 2012).

### **3.2.4. Immunofluorescence indirecte**

Cette méthode est aussi sensible et spécifique que la méthode ELISA compétitif mais est plus compliquée à mettre en œuvre et donc peu utilisée (EKICI *et* SEVINC, 2011).

Le tableau suivant récapitule les principales caractéristiques des tests sérologiques les plus utilisés.

Tableau 06 : Comparaison des différents tests de diagnostic sérologique (GASQUET, 2014).

Test	Sensibilité	Spécificité	Détection de porteurs chroniques	Existence de réactions croisées
ELISA compétitif	100%	95-100%	Oui	avec <i>A. ovis</i> et <i>A. centrale</i>
Fixation du complément	66.70%	96.2-99.9%	Non	avec autres espèces d' <i>Anaplasma</i>
Agglutination sur carte	98%	98.6%	Non	avec <i>A. centrale</i>
Immunofluorescence indirecte	88.95%	100%	Oui	avec <i>A. centrale</i> (parfois avec <i>A. phagocytophilum</i> )

### 3.3. Diagnostic moléculaire (Réaction de Polymérase en Chaîne)

Cette méthode est aujourd'hui très utilisée et tend à remplacer les méthodes sérologiques détaillées précédemment.

Des tests à base d'acide nucléique ont été développés qui sont capables de détecter la présence d'une infection de bas niveau chez les bovins porteurs et les vecteurs de tiques. Ceux-ci comprennent la réaction en chaîne par polymérase classique (PCR), les essais d'hybridation à base de PCR et les tests de PCR en temps réel. Les tests de PCR ciblés sur les gènes d'*Anaplasma* MSP4 et / ou MSP1a ont été utilisés pour différencier les isolats d'*A. marginale*, ce qui est utile pour suivre l'origine d'une épidémie et pour différencier différentes espèces d'*Anaplasma* comme *A. marginale* et *A. Centrale* (DE LA FUENTE, *et al.*, 2001, LEW, *et al.*, 2002).

Récemment, la PCR quantitative en temps réel (qPCR) a été appliquée avec succès à la détection et à la quantification de l'ADN d'*A. marginale* (gène *msp1b*) dans le sang de bovins naturellement infectés (CARELLI, *et al.*, 2007). Le test s'est révélé très spécifique car il n'y avait pas de réactions croisées avec d'autres hémoparasites de ruminants (*A. centrale*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum*, *B. bigemina*, *Theileria buffeli*). Par la suite, la qPCR *A. marginale* a été modifiée en ajoutant un ensemble amorce / sonde spécifique pour *A. centrale*, obtenant ainsi un test duplex pour la détection simultanée des deux *Anaplasma spp.* Dans la même réaction (DECARO *et al.*, 2008).

En 2010 une étude de Noaman et Shayan a démontré l'intérêt de l'utilisation de l'enzyme de restriction Bst 1107 I sur le produit de PCR d'un fragment de l'ARN 16S qui coupe uniquement le fragment d'*Anaplasma marginale* (NOAMAN V et SHAYAN P, 2010).

En 2012, Torino a mis au point une technique de PCR utilisant des amorces différentes pour *Anaplasma marginale* et *Anaplasma ovis* permettant de les différencier en effectuant uniquement une PCR (TORINA *et al.*, 2012).

## 4. Méthodes de contrôles

Les méthodes de contrôle actuellement utilisées pour lutter contre l'anaplasmose comprennent : (i) la chimioprophylaxie, (ii) le contrôle des arthropodes, (iii) la vaccination, (iv) et la maintenance de troupeaux sans anaplasmose en contrôlant les importations et le mouvement des animaux et en éliminant les bovins porteurs. Les mesures de contrôle mises en œuvre varient selon la localisation géographique et dépendent de la disponibilité, du coût et de la faisabilité de l'application (KOCAN *et al.*, 2000).

### 4.1. Chimiothérapie

Trois types d'antibiotiques sont utilisés pour le traitement de l'anaplasmose: les tétracyclines, les fluoroquinolones et le dipropionate d'imidocarbe (AUBRY et GEALE, 2011). La chimiothérapie est destinée à la prévention de l'anaplasmose clinique et n'empêche pas les bovins d'être infectés de façon persistante. (COETZEE *et al.*, 2005; REINBOLD *et al.*, 2010; WALLACE *et al.*, 2007). La thérapie antimicrobienne est surtout utilisée chez les animaux sains comme contrôle d'infections actives pour limiter les effets cliniques de l'infection (POTGIETER et STOLTSZ, 2004). Néanmoins, le traitement des animaux cliniquement affectés coûte cher. En outre, il devient moins acceptable, car la résistance aux antibiotiques augmente chez les agents pathogènes. En outre, certains pays ont restreint l'utilisation de l'imidocarb en raison de sa rétention prolongée dans les viandes des animaux destinés à l'abattage (KOCAN *et al.*, 2010b).

### 4.2. Contrôle des arthropodes

Le traitement des animaux avec des acaricides réduit le nombre de tiques, ce qui diminue indirectement la transmission de l'anaplasmose. Cependant, l'utilisation d'acaricides pour la lutte antivectorielle devient une préoccupation en raison de l'augmentation de la résistance aux acaricides chez les populations de tiques (AUBRY et GEALE, 2011 ; GEORGE *et al.*, 2004), de la pollution de l'environnement et de la contamination du lait et des produits à base de viande (GRAF *et al.* 2004).

L'approche moderne pour le contrôle des arthropodes est basée sur l'utilisation de vaccins contre la tique, qui ont les avantages d'être rentables, de réduire la contamination de l'environnement et de prévenir le développement de tique résistant aux acaricides. Deux vaccins, Gavac (VARGAS *et al.*, 2010) et TickGARD (ODONGO *et al.*, 2007) contenant des antigènes intestinaux recombinants (Bm86 et Bm95) de *R. (B.) microplus* sont actuellement utilisés.

### 4.3. Vaccination

Le développement de l'immunité à long terme par la vaccination a été largement utilisé pour le contrôle de l'anaplasmose dans la plus grande partie du monde et représente la mesure de contrôle la plus efficace (évaluée par PALMER *et al.*, 1989).. Les programmes de vaccination en masse peuvent réduire considérablement l'utilisation d'acaricides et d'antibiotiques, empêchant ainsi une émergence de tiques ou d'agents pathogènes résistants. A l'heure actuelle, deux types de vaccins sont utilisés et sont les vaccins de choix: vaccins vivants et vaccins inactivés. Ils induisent une protection contre les symptômes cliniques sévères, mais ne pas prévenir l'infection, de sorte que les bovins après l'infection peuvent rester porteurs *de A. marginale* (KOCAN *et al.*, 2003).

#### 4.3.1. Vaccins vivants

L'utilisation de vaccins vivants pour le contrôle de l'anaplasmose a commencé au début des années 1900, avec l'isolement d'*A. centrale* (THEILER, 1911). La réponse immunitaire induite par ces vaccins est similaire à une infection naturelle et les animaux développent des infections persistantes avec la souche vaccinale. Cependant, la pré-immunisation avec une souche a été démontrée pour ne pas fournir de protection croisée dans des zones géographiques largement séparées (KENNEIL *et al.*, 2013, KUTTLER *et al.*, 1984). Les vaccins vivants sont constitués de sang infecté, pris à partir de veaux en quarantaine splénectomisés inoculés avec la souche vaccinée sélectionnée. Ces vaccins comportent le risque de transmettre d'autres agents pathogènes «silencieux» et malgré l'impact global de l'anaplasmose, leur utilisation est interdite aux États-Unis (ROGERS *et al.*, 1988).

L'immunisation des bovins avec des sous-espèces moins pathogènes, c'est-à-dire *A. centrale* est en usage de routine dans plusieurs pays: Afrique du Sud, Zimbabwe, Malawi, Australie, Israël, Uruguay et Argentine (SHKAP *et al.*, 2009).

Il est à noter que certains isolats africains et latino-américains d'*A. marginale* peuvent surmonter une immunité induite par *A. centrale* (BOCK *et al.*, 2003; BRIZUELA *et al.*, 1998).

Le deuxième type de vaccin vivant se compose de souches atténuées *A. marginale*. Ces vaccins ont été utilisés en Amérique du Sud et en Californie, bien que des réactions sévères aient été observées chez les bovins adultes après la vaccination (HENRY *et al.*, 1983). Chez les veaux, cependant, ces vaccins produisent des infections légères et entraînent une immunité contre l'anaplasmose clinique dans des zones géographiques très séparées (KOCAN *et al.*, 2003). L'atténuation d'*A. marginale* peut être réalisée par deux méthodes. La première

concerne l'irradiation et les passages multiples subséquents à travers les cerfs et les moutons (RISTIC et CARSON, 1977). La seconde par la réalisation de nombreux passages à travers des veaux splénectomisés suivis de passages à travers des moutons splénectomisés (JORGENSEN *et al.*, 1993). Pourtant, il a été rapporté que les vaccins à *A. marginale* atténués sont retournés à la virulence après des passages successifs à travers des bovins ou des tiques (KOCAN *et al.*, 2000).

#### **4.3.2. Vaccins inactivés**

Un vaccin inactivé composé d'*A. marginale* non vivant a été développé aux États-Unis et a été utilisé efficacement jusqu'à son retrait du marché en 1999 (KOCAN *et al.*, 2003). Bien que des vaccins inactivés soient également produits chez les animaux splénectomisés, il est moins probable que tout autre agent pathogène contaminant le vaccin reste viable et infectieux après le processus d'inactivation. Cependant, une purification extensive est nécessaire pour éliminer le stroma des cellules bovines car seule la purification partielle a entraîné le développement d'isoanticorps érythrocytaires chez des bovins vaccinés. Les vaccins inactivés ont réduit la maladie clinique et la mortalité, mais n'ont pas toujours fourni de protection croisée (KUTTLER et WINWARD, 1984). Pour cette raison, les vaccins inactivés sont plus susceptibles d'être utiles lorsqu'ils sont produits à partir de souches isolées localement.

#### **4.4. Maintenance de troupeaux sans anaplasnose**

En l'absence d'une politique nationale d'éradication, comme c'est le cas pour de nombreux pays, le maintien des troupeaux sans anaplasnose est possible au niveau du troupeau, en particulier dans les zones où la prévalence de l'infection est faible (AUBRY et GEALE, 2011). Dans les zones où l'anaplasnose n'est pas endémique, le contrôle de l'anaplasnose a été effectué par la maintenance de troupeaux exempts d'*A. marginale* pour éviter l'importation de supports d'anaplasnose qui pourraient servir de source d'infection (Kocan *et al.*, 2000). Cette méthode de contrôle dépend cependant de la disponibilité de techniques de diagnostic spécifiques et très sensibles capables de détecter de manière fiable une infection à faible niveau chez les bovins porteurs.

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

## 1. Objectif de l'étude

La besnoitiose et l'anaplasmosose sont parmi les causes les plus importantes qui entravent le développement du secteur de l'élevage bovin en Afrique et dans d'autres régions de globe. Ces maladies ont été très peu étudiées en Algérie. En effet, les données relatives à la séroprévalence de ces deux maladies sont particulièrement rares voir absentes.

L'objectif de la présente étude est de déterminer la séroprévalence de l'anaplasmosose et de la besnoitiose bovine et d'identifier les principaux facteurs de risque liés à ces infections dans deux communes de la Wilaya de Mila. Il est important de noter que cette région a bénéficiée de nouvelles installations d'irrigation, ceci constitue un biotope favorable à la présence de plusieurs espèces de tiques vectrices et de petits mammifères et rongeurs, potentiellement impliqués comme hôtes intermédiaires et réservoirs dans le cycle biologique d'*Anaplasma marginale* et de *Besnoitia besnoiti*.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Région d'étude

La wilaya de Mila est représentée par 13 daïra et 32 communes, elle est située dans le Nord-Est de l'Algérie (Kabylie orientale), délimitée par les wilayas de Jijel et de Skikda au nord, les wilayas de Batna et d'Oum el Bouaghi au sud, la wilaya de Sétif à l'ouest et enfin par la wilaya de Constantine à l'est. Elle se caractérise par un relief varié et présente deux grandes zones distinctes :

- ✓ au nord : des montagnes et des collines
- ✓ au sud : les plaines et les hauts plateaux.

Le climat de la wilaya est de type humide au Nord, subhumide à semi-aride au centre et semi-aride au Sud. La pluviométrie varie entre 600 et 900 mm au nord de la wilaya (920 mm sur le mont de Msid Aïcha) entre 400 et 600 au centre de la wilaya et moins de 400 mm au sud.

La wilaya abrite le plus grand barrage d'eau au niveau national (barrage Beni-Haroun) qui alimente une grande partie de l'est algérien avec de l'eau potable et de l'eau d'irrigation. Les principaux cours d'eau sont Oued Rhumel et Oued El-Kebir.

La présente étude a été réalisée dans deux régions d'élevage de la wilaya de Mila :

**La commune de Terrai Bannane** : est localisée dans l'extrême nord de la wilaya, limitrophe de la wilaya de Jijel. Elle se trouve à flanc de montagne bordée au sud par le barrage de Beni Haroun. Elle est dominée au nord par le djebel Anz El Arbi à 1 162 mètres, faisant partie de la chaîne montagneuse du Zouagha. Le nord de la commune abrite trois grandes forêts de chêne-liège.

**La commune de Tiberguent** : est localisée au centre de la wilaya de Mila à 4 km de Rouached et 25 km à l'ouest de Mila par la RN79. Elle se trouve sur des terres fertiles dans une vallée de l'Oued Melah qui la borde au nord

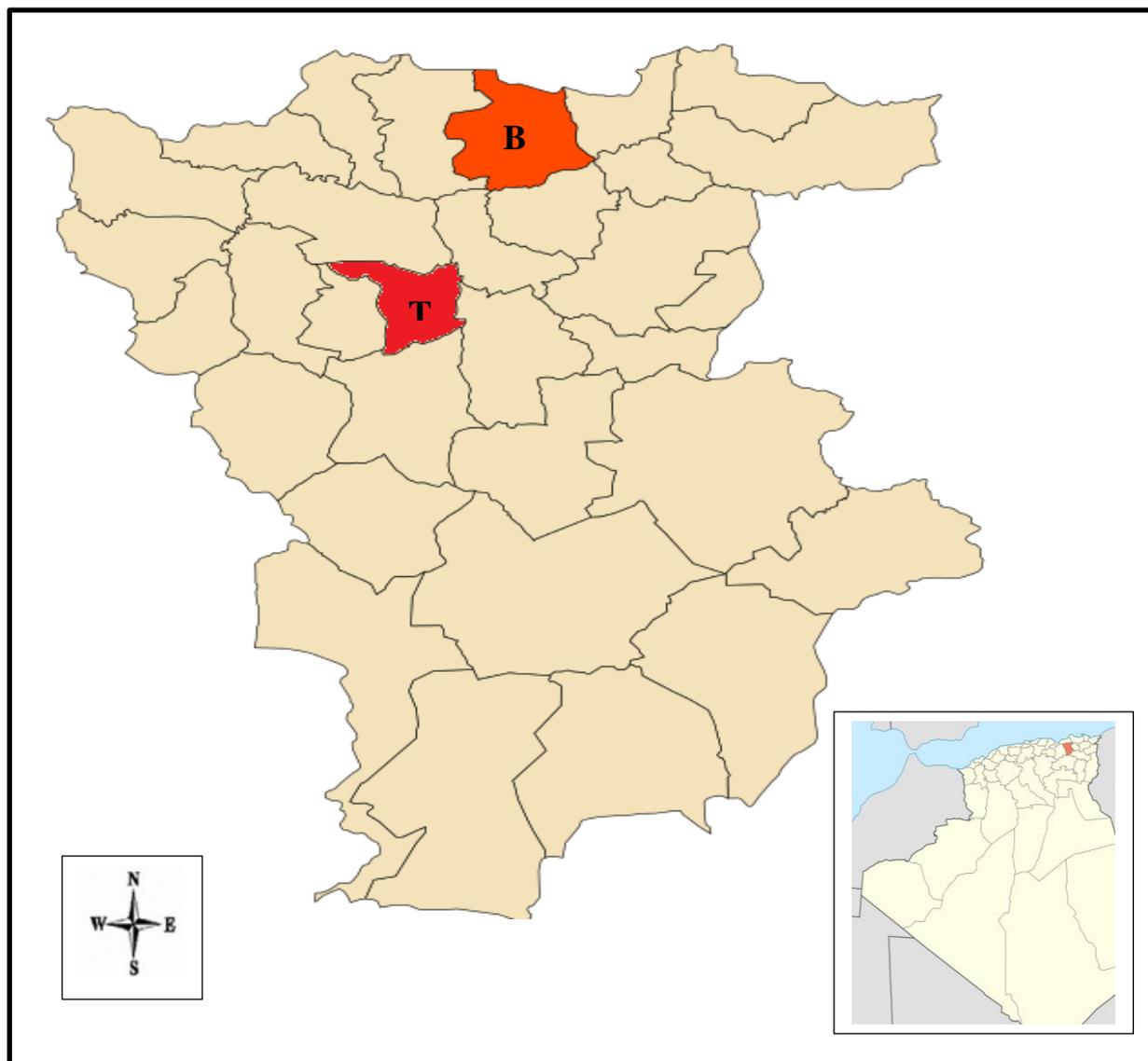


Figure 17: Situation géographique des régions concernées par l'étude. B : Bainnane ; T : Tiberguent.

## 2.2. Récolte des échantillons

Les prélèvements sanguins ont été effectués pendant le mois de mars 2017 dans 5 localités situées dans les deux régions d'étude : les localités de Dar Elhamra et Mechra dans la commune de Bainnane et celles de Tiberguent centre, Draa Ben kheda et Boumaaref dans la commune de Tiberguent. Un total de 182 échantillons sanguins a été prélevé chez les bovins de différents âges et sexe.

Si on se réfère au chiffre de la Direction des services agricoles de la wilaya en 2016, le taux d'échantillonnage réalisé a été d'environ 12.48% (182/1458) pour le cheptel bovins (n=1458) dans les deux communes, soit 7.29% pour la commune de Bainnane et 15.03% pour la commune de Tiberguent.

Le nombre de bovins à prélever dans chaque ferme a été défini en fonction du nombre total de bovins présents dans celle-ci: soit la ferme comprenait moins de 10 bovins et, dans ce cas tous les bovins étaient prélevés, soit la ferme contenait plus de 10 bovins et, dans ce cas, au moins 10 individus étaient prélevés. L'objectif était d'avoir un échantillon représentant au moins 10% de l'ensemble des individus présents dans les fermes visitées (GHALMI *et al.*, 2012).

Les informations relatives au sexe, à l'âge, à la race de l'animal et au type de l'élevage (intensif ou semi-intensif) ont été collectées à l'aide d'une fiche de renseignement.

### 2.3. Description du cheptel prélevé

Les élevages prélevés ont été constitués de bovins de races croisées (80.22%) et de races locales (19.78%). L'échantillon comprenait 145 femelles et 37 mâles. Les animaux ont été répartis en 3 classe d'âge : < 1 an (21.42%), de 1an-2ans (26.93%) et > 2an (51.65%). Selon le type de l'élevage : intensif (57.14%) et semi-intensif (42.86%).

Nos prélèvements ont concerné 5 localités réparties dans les deux zones d'études de la wilaya (Tableau 07).

Tableaux 07 : Nombres de fermes et de bovins prélevés par commune et par localité

Commune	Localité	Nombre de fermes prélevées	Nombre de bovins prélevés
<b>Bainnane</b>	Dar elhamra	3	10
	Mechra	7	25
	<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>35</b>
<b>Tiberguent</b>	Centre	14	66
	Boumaaref	10	60
	Draa ben khelfa	4	21
	<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>147</b>

### 2.4. Préparation des prélèvements

Les échantillons ont été prélevés au niveau de la veine jugulaire et mis dans des tubes secs sur lesquels ont été mentionnés l'âge, la race, le sexe, le type et la localisation de l'élevage. Après coagulation à température ambiante pendant 6 heures et centrifugation (1 500 g, 10-15 minutes, température ambiante), les sérums ont été récupérés et transvasés dans des tubes eppendorf puis stockés à -20°C. Les échantillons ont été transportés et acheminés vers le laboratoire de microbiologie de l'ENSV dans une glacière.

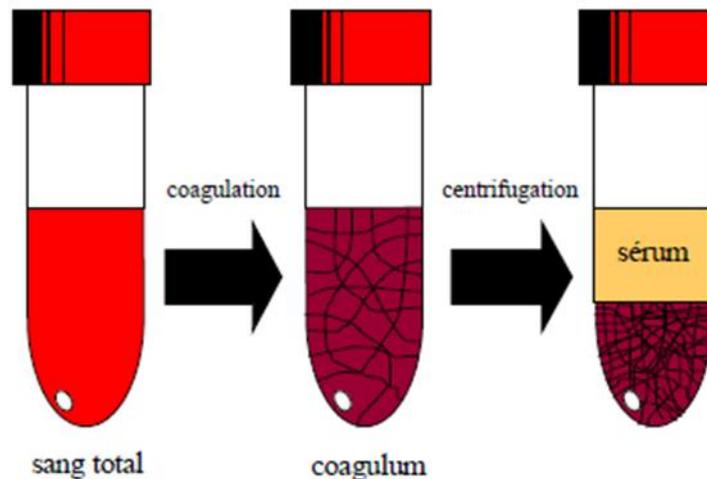


Figure 18 : Procédure de Préparation du sérum

## 2.5. Analyses sérologiques

Les analyses sérologiques ont été effectuées au laboratoire de microbiologie de l'ENSV.

Après décongélation des sérums à température ambiante, nous avons procédé aux analyses sérologiques des 182 sérums en utilisant des kits commerciaux pour la détection des anticorps spécifiques d'*A. marginale* et de *B. besnoiti*.

### 2.5.1. Pour la recherche des anticorps anti-*Anaplasma marginale*

Les analyses ont été effectuées au moyen d'un test ELISA compétitif pour la détection des anticorps dirigés contre *Anaplasma marginale* (*Anaplasma*, cELISA, Veterinary Medical Research and Development, Pullman University, WA, Etats-Unis) et nous avons procédé selon les recommandations du fabricant de la manière suivante :

- i) Ajouter 70  $\mu$ l du sérum non dilué à la plaque fixée pour l'absorption/transfert et incuber à température ambiante pendant 30 min ;
- ii) Transférer 50  $\mu$ l par puits de sérum absorbé à la plaque fixée avec l'antigène rMSP5 et incuber à température ambiante pendant 60 min ;
- iii) Eliminer le sérum et laver la plaque 2 fois avec la solution de lavage diluée ;
- iv) Ajouter 50  $\mu$ l/puits de l'anticorps monoclonal dilué et conjugué à la peroxydase à la plaque à laquelle a été fixée le rMSP5. Incuber à température ambiante pendant 20 min ;
- v) Eliminer l'anticorps monoclonal dilué et conjugué à la peroxydase et laver la plaque 4 fois avec la solution de lavage diluée ;
- vi) Ajouter 50  $\mu$ l/puits de la solution substrat, couvrir la plaque avec une feuille et incuber 20 min à température ambiante ;

vii) Ajouter 50 µl/puits de solution stop à la solution substrat déjà dans les puits et tapoter le bord de la plaque pour mélanger doucement le mélange ;

La mesure de la densité optique (OD) du sérum de contrôles et de chaque échantillon a été lue au moyen d'un spectromètre (lecteur ELISA) à 630 nm après 20 minutes. Les densités optiques (DO) obtenues ont été converties en pourcentages d'inhibition (PI), calculés selon une formule indiquée par le fabricant. Le seuil de positivité (*cut off*) est déterminé, également par le fabricant, à 30%, ainsi les échantillons dont le pourcentage est inférieur à 30% sont négatifs et ceux dont le pourcentage est supérieur à 30% sont positifs.

La validité du test a été calculée lorsque la moyenne de la densité optique (DO) du témoin négatif doit varier de 0,40 à 2,1 et le pourcentage d'inhibition du témoin positif doit être supérieur ou égal à 30 %.

### **2.5.2. Pour la recherche des anticorps anti-*Besnoitia besnoiti***

Pour révéler les anticorps dirigés contre *B. besnoiti*, un test ELISA indirect commercialisé par la firme ID Screen® a été effectué selon les instructions du fabricant qui a aussi fourni les contrôles positifs et négatifs. Il s'agit d'un test bicupule, chaque échantillon et contrôle doit être déposé en double (colonnes paires et impaires). Sachant que les cupules paires sont sensibilisées avec de l'extrait antigénique purifié de *Besnoitia besnoiti*.

Nous avons procédé comme suit :

1. Distribuer 90 µl de Tampon de dilution 13 dans chaque puits ;
2. Distribuer :
  - 10 µl de contrôle négatif dans les cupules A1, A2, B1 et B2
  - 10 µl de contrôle positif dans les cupules C1, C2, D1 et D2
  - 10 µl de chaque échantillon à tester dans les cupules restantes ;
3. Incuber 45 min à 21°C ;
4. Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages ;
5. Préparer le conjugué 1X en diluant le conjugué 10X au 1/10<sup>ème</sup> en Tampon de dilution 3 ;
6. Distribuer 100 µl de conjugué 1X dans chaque cupule ;
7. Incuber 30 minute à 21°C ;
8. Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de solution de lavage ;
9. Distribuer 100 µl de révélation dans chaque cupule ;
10. Incuber 15 min à 21°C à l'obscurité ;
11. Distribuer 100 µl de solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction ;

12. Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

Tous les calculs de validation et d'interprétation se font sur la valeur de la DO nette de chaque échantillon, obtenue comme suit :

Validation :

DO nette = DO colonne paire –DO colonne impaire

Le test est validé si :

- La valeur moyenne de densité optique nette des contrôles positifs est supérieure à 0.350.
- Le rapport entre la moyenne des contrôles positifs et la moyenne des contrôles négatifs est supérieur à 3. Pour ce calcul utiliser la valeur absolue de la DO nette du CN

Interprétation :

Pour chaque échantillon, calculer le pourcentage S/P :

$S/P\% = DO \text{ nette échantillon} / DO \text{ nette CP} \times 100$

Les échantillons présentant un S/P% :

- Inférieur ou égale à 25% sont considérés comme négatifs ;
- Compris entre 25% et 30% sont considérés comme douteux ;
- Supérieur ou égale à 30% considérés comme positifs.

## **2.6. Saisie des données et analyses statistiques**

Les données ont été enregistrées dans un fichier Excel ensuite exportées dans le logiciel SpSS version 20. Le test de Chi-carré de tendance a été utilisé pour déterminer la corrélation entre certains facteurs liés aux bovins (âge, sexe, race, type d'élevage et climat) et la séropositivité des échantillons. Les différences observées ont été considérées comme significatives quand la valeur de *P* était inférieure à 0.05.

### 3. Résultats

Les séroprévalences de *B. besnoiti* et d'*A. marginale* ainsi que les facteurs de risque potentiellement associés sont successivement étudiés dans cette partie.

#### 3.1. *Besnoitia besnoiti*

Les analyses sérologiques effectuées chez le bovin pour déterminer la séroprévalence de *Besnoitia besnoiti* ont révélé 0% de taux de prévalence pour les deux régions d'études.

#### 3.2. *Anaplasma marginale*

##### 3.2.1. Etude de séroprévalence

##### 3.2.1.1. Séroprévalence globale

Sur les 182 sérums bovins testés en cELISA, 45 étaient positifs vis-à-vis d'*A. marginale*, ce qui correspond à une séroprévalence globale de 24.72% (IC à 95% : 18.5% - 31%) dans les deux régions d'études dont : 9.89 % (IC à 95% : 5.6-14.2%) dans la commune de Bainnane et 14.83% (IC à 95% : 9.7-20%) dans la commune de Tiberguent (Tableau 08).

Tableau 08 : Séroprévalence globale de l'infection par *Anaplasma marginale*.

Commune	Localité	Nombre des positifs	Séroprévalence
Bainnane	Dar elhamra	4	2.20 %
	Mechra	14	7.69 %
	Sous total	18	9.89 %
Tiberguent	Tiberguent centre	11	6.05 %
	Draa ben kheda	6	3.29 %
	Boumaaref	10	5.49 %
	Sous total	27	14.83 %
	Total	45	24.72%

##### 3.2.1.2. Séroprévalence par commune

La séroprévalence brute de l'anaplasmosose par région d'élevage est de 51.4 % (18/35) dans la région de Bainnane et de 18.37 % (27/147) dans la région de Tiberguent. L'analyse statistique montre qu'il y a une différence très significative entre les deux régions ( $p = 0.000 < 0.05$ ) (Figure 19).

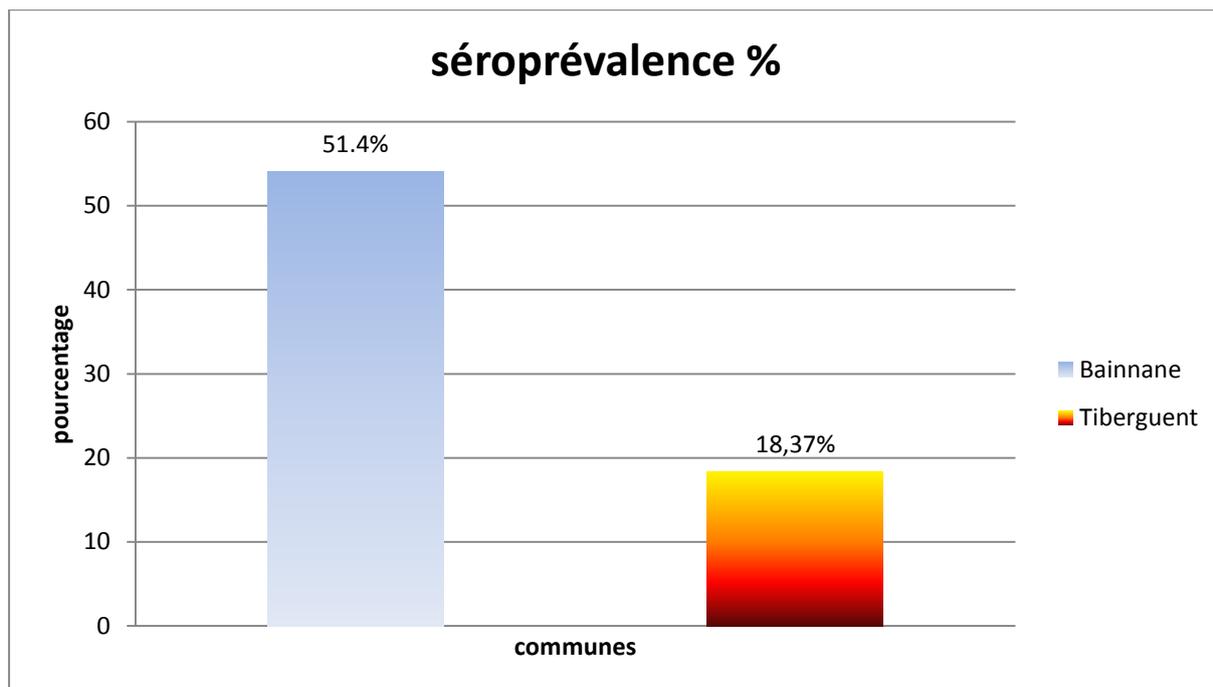


Figure 19 : Détection des IgG contre *Anaplasma marginale* par communes.

### 3.2.1.3. Séroprévalence en fonction des titres en anticorps

Les résultats ont été regroupés en 3 classes en fonction du pourcentage d'inhibition : en sérums faiblement positifs (30-50%) (IC à 95 % : 8.1% et 17.9%), moyennement positifs (50-80%) (IC à 95 % : 9% et 19%), fortement positifs (> 80%) (IC à 95 % : 12.4% et 23.6%) (Tableau 09).

Tableau 09 : Répartition des bovins séropositifs en fonction de leurs titres en Anticorps.

% d'inhibition	Nombre des Positifs	Séroprévalence %	IC (95%)
30-50 %	13	7.14 %	3.4% - 10.9%
50-80 %	14	7.69 %	3.8% - 11.6%
>80 %	18	9.89 %	5.6% - 14.2%

### 3.2.2. Etude des facteurs de risques

Le tableau et les schémas font ressortir ce qui suit :

En terme de tranche d'âge, la séroprévalence est de 10.3 % (4/39) ( IC à 95% : 5.9%-14.7%) chez les bovins moins d'un an, de 20.4 % ( 10/49 ) (IC à 95% : 14.5%-26.3%) chez les bovins de 1-2 ans et de 33 % (31 /94 ) (IC à 95% : 26.2%-39.8%) chez les bovins plus de 2 ans d'âge

( figure 30 ). En plus l'analyse statistique montre que la séroprévalence se diffère significativement avec l'âge ( $p < 0.05$ ) (Figure 20).

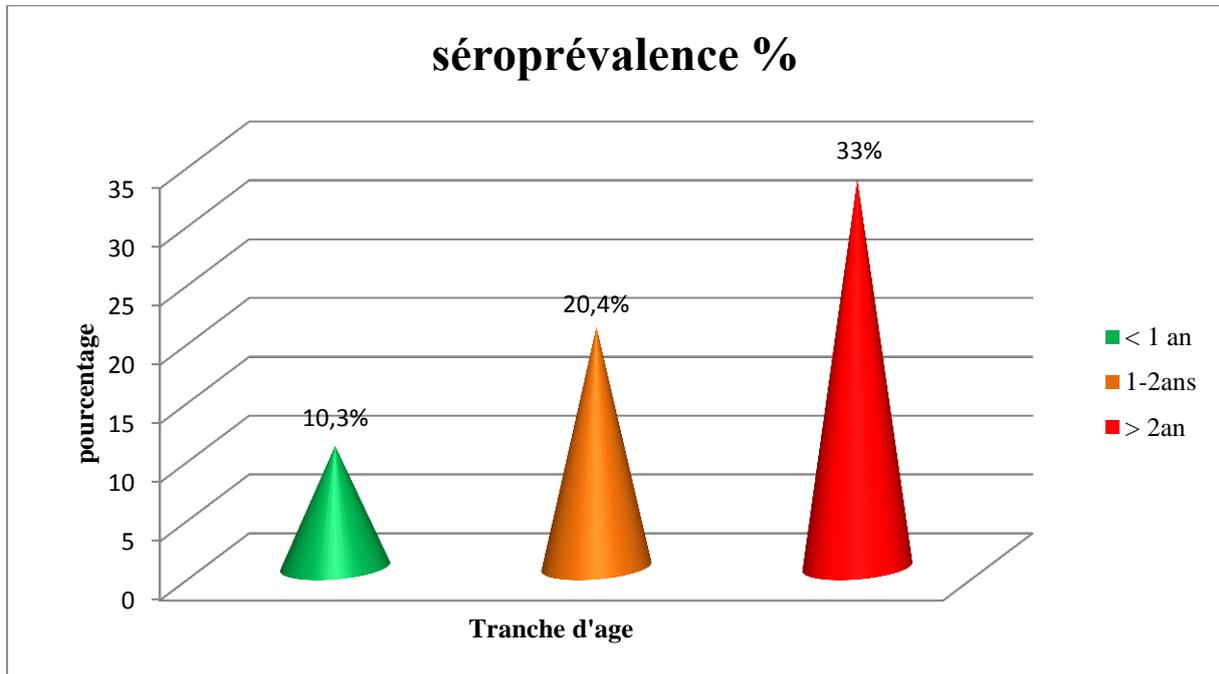


Figure 20 : Variation de la séroprévalence d'*A. Marginale* en fonction de l'âge.

La séroprévalence d'*Anaplasma* par sexe est de 27.77 % (10/36) (IC à 95% : 21.3%-34.3%) chez les mâles et de 23.97% (35/146) (IC à 95% : 17.8%-30.2%) chez les femelles avec une valeur de  $P > 0.05$ , on peut dire que les deux sexes semblent être infectés de façon identique.

La séroprévalence ne varie pas en fonction des races considérées ( $p > 0,05$ ). Les résultats montrent une prévalence de 24.7 % (9/36) (IC à 95% : 18.4%-31%) pour les races locales et de 25 % (36/146) (IC à 95% : 18.7%-31.3%) pour les races croisées.

En ce qui concerne le facteur climat, cette étude a montré une séroprévalence significativement plus élevée ( $p < 0.05$ ), avec un taux de prévalence de 51.4 % (18/35) (IC à 95% : 44.2%-58.7%) dans la commune de Bainnane (climat chaude et humide) et de 18.37 % (27/147) (IC à 95% : 12.7%-24%) dans la commune de Tiberguent (climat subhumide à semi-aride) (Figure 21).

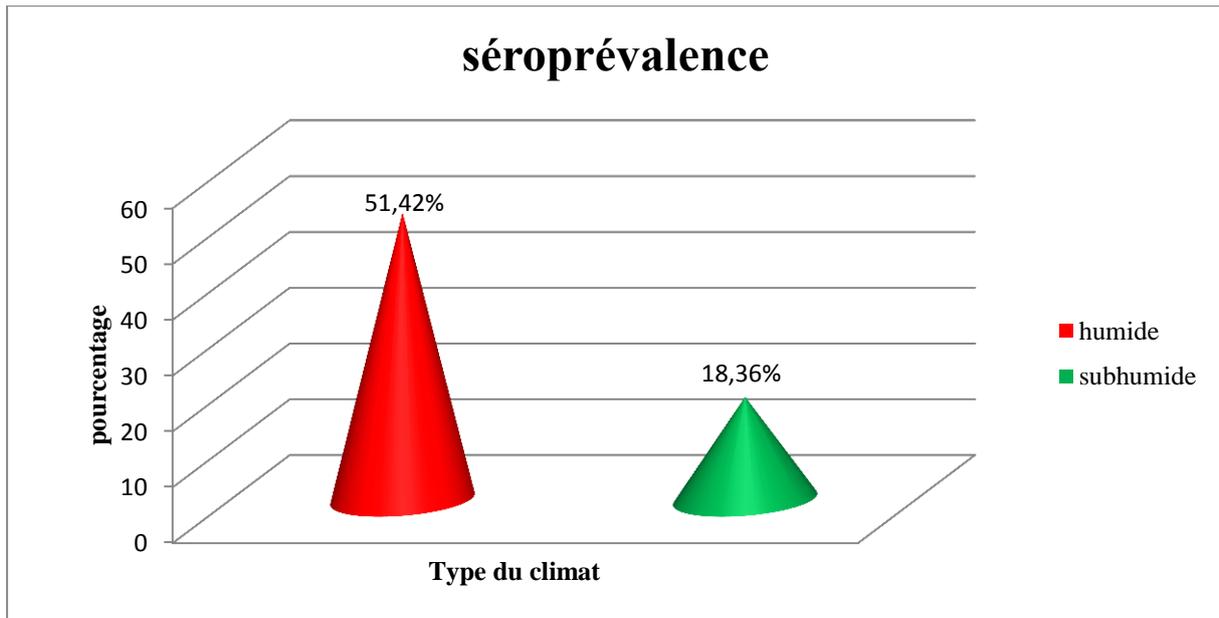


Figure 21 : Variation de la séroprévalence d'*A. Marginale* en fonction de type du climat.

Il s'avère aussi que le type d'élevage influence significativement la séroprévalence d'*Anaplasma* ( $P < 0.05$ ). La comparaison entre les 2 types d'élevage montre des taux de séroprévalence qui sont 35.9 % (28/78) (IC à 95% : 28.9%-42.9%) pour le type semi-intensif et 16.3 % (17/104) (10.9%-21.7%) pour le type intensif (Figure 22).

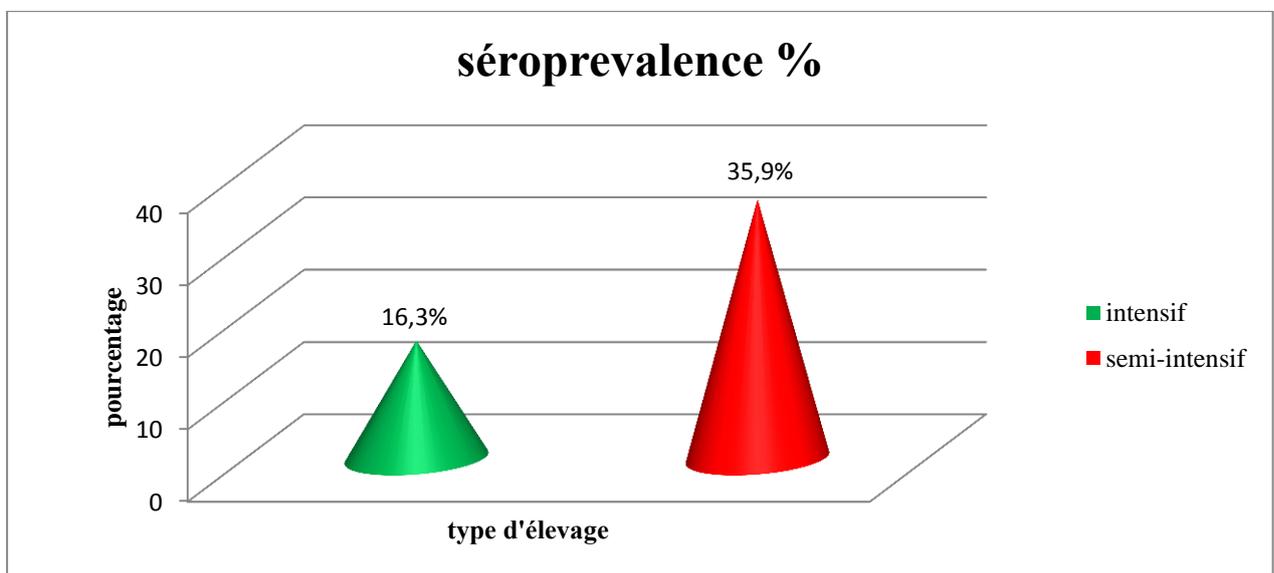


Figure 22 : Variation de la séroprévalence d'*A. Marginale* en fonction de type d'élevage

Enfin, il y a une différence significative ( $P < 0.05$ ) entre les différentes localités étudiées : Dar elhamra (40 %) (4/10) (IC à 95% : 23.9%-47.1%), Mechra (56 %) (14/25) (IC à 95% : 48.8%-63.2), Boumaaref (16.7 %) (10/60) (IC à 95% : 11.3%-22.1%), Tiberguent centre (16.7 %) (11/66) (IC à 95% : 11.3%-22.1%) et Draa ben khelfa (28.6 %) (6/21) (IC à 95% : 22%-35.2%) (Figure 23).

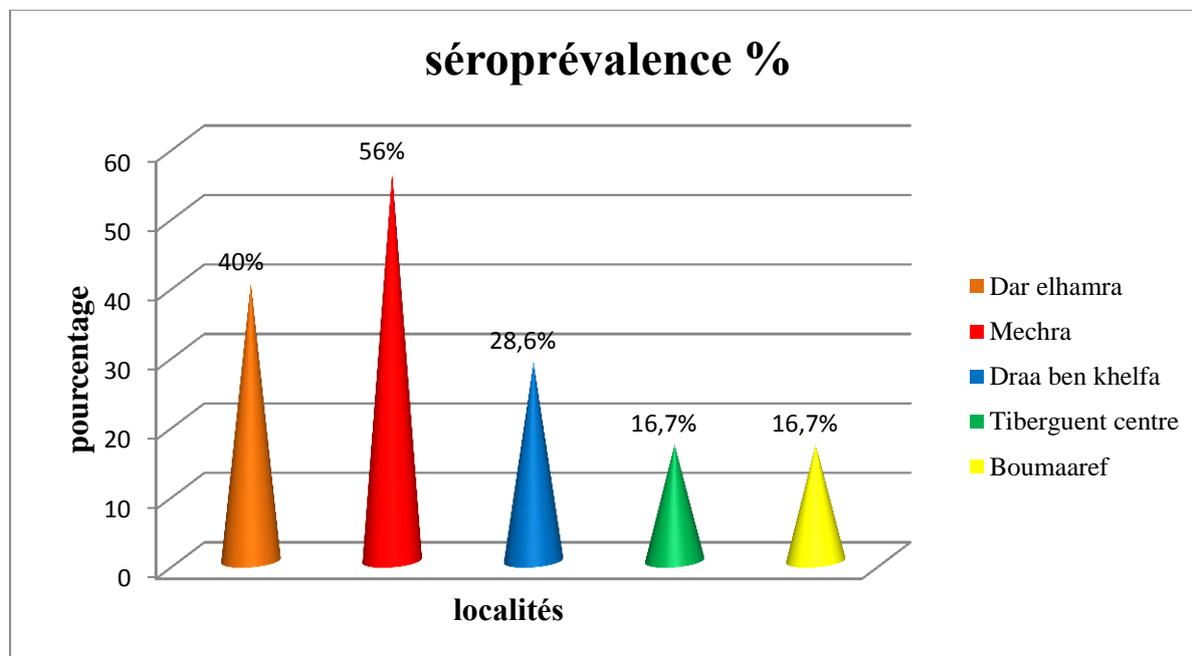


Figure 23 : Variation de la séroprévalence d'*A. Marginale* en fonction de localité d'élevage.

Tableau 10 : Analyse de certains facteurs de risque potentiels susceptibles d'influencer la séroprévalence d'*A. marginale*

Variable	effectif	Echantillon positifs	% de positivité	p
Tranche d'âge				P = 0.01 (S)
< 1 an	39	4	10.3 %	
1-2 ans	49	10	20.4 %	
> 2 ans	94	31	33.00 %	
sexe				P = 0.62 (NS)
Male	36	10	27.77 %	
Femelle	146	35	23.97 %	
Race				P = 0.96 (NS)

locale	36	9	25 %	
croisée	146	36	24.7 %	
<b>Climat</b>				<b>P = 0.00004 (HS)</b>
humide	35	18	51.42 %	
Subhumide	147	27	18.36 %	
<b>Type d'élevage</b>				<b>P = 0.002 (TS)</b>
intensif	104	17	16.3 %	
Semi intensif	78	28	35.9 %	
<b>Localité d'élevage</b>				<b>P = 0.001 (TS)</b>
Dar elhamra	10	4	40 %	
Mechra	25	14	56 %	
Draa ben khelfa	21	6	28.6 %	
Tiberguent centre	66	11	16.7 %	
boumaaref	60	10	16.7 %	

NS : non significatif ( $p > 0.05$ ), S : significatif ( $p < 0.05$ ), TS : très significatif ( $p < 0.01$ ), HS : hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

## 4. Discussion

Dans notre pays, les informations portant sur l'anaplasmosse bovine à *Anaplasma marginale* demeurent encore lacunaires pour de nombreux sites. En effet malgré des travaux conduits par certains auteurs (AMANZOUAGHENE, 2014 ; ZIAM et BENAOUF, 2004 ; ZIAM *et al.*, 2003), les données disponibles sur cette pathologie sont insuffisantes et nécessitent d'être actualisées au regard de la distribution, la prévalence et l'importance économique de la maladie dans notre pays. Il a été rapporté que la connaissance du taux de la séroprévalence est un outil important pour évaluer le niveau de la stabilité enzootique d'une maladie dans un pays, laquelle pourra servir de base pour un contrôle effectif de la maladie (PERRY *et al.*, 1985). C'est pour cela, nous avons fait dans l'est Algérien (Wilaya de Mila), une étude sérologique sur l'anaplasmosse bovine et on a aussi identifié les principaux facteurs de risques liés à cette infection.

En ce qui concerne la besnoitiose à *Besnoitia besnoiti*, il s'agit d'une maladie des pays chauds. Elle est en réalité rapportée depuis longtemps (probablement depuis l'antiquité, (ALZIEU, 2007a), notamment en Asie, en Afrique du sud et dans le Sud-Ouest de l'Europe. Mais ce n'est qu'en 2010 qu'elle a été déclarée maladie émergente en Europe par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments. Aujourd'hui, la maladie se répand de plus en plus dans les régions et les pays voisins, du fait (ÁLVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013) :

- Du développement du commerce et notamment des importations de charolais et de limousins asymptomatiques.
- De certaines pratiques d'élevage, telles que la transhumance (où l'on observe un regroupement d'animaux de différents cheptels à la période d'activité maximale du vecteur), le partage de pâtures, la monte naturelle, l'élevage en bâtiments ouverts...
- De changements climatiques favorisant le développement des populations d'arthropodes vecteurs ainsi que l'augmentation de la durée et de l'intensité de la transmission vectorielle
- Du peu de connaissances sur l'hôte définitif et sur le cycle du parasite, donc de l'impossibilité de mettre en place des moyens de lutte efficaces.

Malgré ces facteurs qui influencent la propagation de la maladie au niveau national et international, jusqu'à présent, il n'existe pas à notre connaissance d'études antérieures sur la séroprévalence de cette parasitose dans notre pays. Pour cette raison, la présente étude a été menée afin d'étudier, pour la première fois en Algérie et même en Afrique du nord, la séroprévalence de *Besnoitia besnoiti* chez des bovins dans deux différentes régions de la wilaya de Mila par la technique ELISA indirect.

## 4.1. Méthode d'échantillonnage

L'étude réalisée est de type transversal et concerne un effectif de 182 bovins prélevés dans deux régions regroupant environ 1458 bovins (DSA, 2016), ce qui correspond à un taux d'échantillonnage de 12.48%.

Même si les élevages ont pu être sélectionnés de manière aléatoire (tirage au sort), il nous fallait l'accord des éleveurs pour prélever leurs bovins. Par conséquent, ceci a créé un certain biais de sélection. D'autre part, pour le choix des bovins à prélever au sein de chaque ferme, nous pensons que dans une étable donnée, il serait relativement aisé de prélever au hasard n'importe quel bovin afin d'avoir au final une représentation homogène de l'effectif. Nous nous sommes rapidement rendu compte que certains taureaux d'engraissement étaient inapprochables d'où l'impossibilité de les prélever. Ceci explique pourquoi dans notre étude le sexe ratio était en faveur des femelles (146 femelles prélevées contre 36 mâles). Enfin, hormis ces quelques imperfections, inévitables pour toute enquête transversale, nous devons admettre que l'échantillon prélevé lors de cette étude est considéré comme représentatif de la population bovine des deux régions étudiées de la wilaya de Mila.

La collecte des prélèvements sanguin s'est effectuée dans le respect des règles d'hygiène et de conservation de la chaîne du froid, tout au long de l'enquête, depuis la récolte jusqu'à l'acheminement au laboratoire.

## 4.2. Durée d'échantillonnage

L'étude n'a été réalisée que pendant un mois, ce qui donne une image ponctuelle. Il faudrait prolonger l'étude sur au moins une année entière pour avoir une idée vraiment précise de la situation épidémiologique des deux maladies dans les régions étudiées.

## 4.3. Méthodes de diagnostic employées

### 4.3.1. Pour *besnoitia besnoiti*

Pour le diagnostic sérologique, nous avons utilisé le test ELISA indirect pour faire révéler les anticorps dirigés contre *besnoitia besnoitia*. Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique qui permet la détection des anticorps anti-*B. besnoiti* dans un échantillon de sérum. La réaction fait appel aux anticorps spécifiques de l'antigène (ceux recherchés) et à des anticorps couplés à une enzyme, spécifiques du complexe immun formé. La réaction enzymatique produite crée une coloration quantifiable par spectrophotométrie. La technique décrite par CORTES (2006a) a été adaptée de celle mise au point par GOTTSTEIN (1999) pour la Néosporose à *N. caninum*. Elle possède une bonne sensibilité (87%), quelque soit le stade

clinique de l'animal testé, et une très bonne spécificité (97,5%). Malgré tout, la sensibilité n'est pas aussi bonne que pour l'IFI ou le WB. Aucune réaction croisée n'a été observé avec *N. caninum* et peu avec *T. gondii* (CORTES *et al.*, 2006a). Elle a les avantages de ne demander que peu de réactifs, d'être peu coûteuse, et de pouvoir tester des centaines de sérums en une journée (JANITSCHKE *et al.*, 1984). L'ELISA est recommandée en tant que test de dépistage de masse de la besnoitiose, par exemple pour connaître la prévalence dans un troupeau ou une région. Par contre, du fait de sa très faible valeur prédictive positive, il est important de confirmer les cas positifs par une autre technique telle que le WB (CORTES *et al.*, 2006a).

Plusieurs tests ELISA sont actuellement commercialisés en Europe (PrioCheck® Besnoitia Ab. V2.0, ID Screen® Besnoitia indirect, INGEZIM BES 12.BES.K1 INGENASA).

D'après GARCIA-LUNAR et ses collaborateurs (2012), les deux meilleurs tests ELISA actuellement commercialisés en Europe sont les tests ID Screen Besnoitia indirect IDVET et PrioCHECK Besnoitia Ab V2.0, avec respectivement 97,2% et 100% de sensibilité, 100% et 98,8% de spécificité. Le test INGEZIM BES 12.BES.K1 INGENASA a montré de moins bons résultats avec 97,2% de sensibilité et 93% de spécificité. Cependant, tous ces tests sont assez performants pour les utiliser lors de dépistage de masse.

#### **4.3.2. Pour *Anaplasma marginale***

Concernant le diagnostic sérologique de l'infection par *A. marginale*, le test cELISA est la méthode recommandée par l'OIE (2008) et a été utilisé dans cette étude. Ce test possède une grande spécificité de 98% et une sensibilité élevée de 95% (AUBRY et GEALE, 2011). De plus, il permet d'analyser un grand nombre de sérums en peu de temps et de fournir un titrage d'emblée des anticorps. Par contre, son inconvénient majeur réside, comme pour l'IFAT, dans la possibilité de réactions sérologiques croisées avec d'autres espèces d'*Anaplasma* (DREHER *et al.*, 2005 ; AUBRY et GEALE, 2011).

D'autre part, aussi bien pour l'IFAT et cELISA, il est probable que nous soyons passés à côté de bovins faux négatifs, c'est-à-dire des animaux en incubation ou en phase aigüe de la maladie, exprimant ou pas des signes cliniques, mais n'ayant pas encore produits suffisamment d'anticorps. Ainsi, en utilisant de telles méthodes sérologiques, nous avons probablement sous-estimé les séroprévalences des infections étudiées.

Quoi qu'il en soit, il est clairement admis dans la littérature, que ces méthodes sérologiques employées dans la présente étude constituent le bon moyen pour un dépistage lors de la réalisation d'études épidémiologiques sur de grands effectifs. Elles nous ont permis de définir

des facteurs de risque cohérents avec l'épidémiologie des maladies étudiées. Pour compléter ces données sérologiques, nous envisagerons ultérieurement d'effectuer le dépistage de l'infection par des méthodes moléculaires d'amplification génique (PCR) qui sont beaucoup plus sensibles et spécifiques, ceci permettra non seulement une distinction entre les différentes espèces de *Besnoitia* et d'*Anaplasma*, mais également une caractérisation des souches. Cependant, notre étude étant une étude de séroprévalence et non de diagnostic, la sérologie, même seule, est par conséquent la méthode la plus adaptée.

#### **4.4. Comparaison des résultats avec la littérature et interprétations**

De nombreuses études sur les séroprévalences vis-à-vis de *Besnoitia besnoiti* et d'*Anaplasma marginale* ont été réalisées chez les bovins dans différentes régions du globe. La présente étude a été menée d'une part, afin d'étudier pour la première fois en Algérie, la séroprévalence de *Besnoitia besnoiti* et d'autre part pour déterminer le taux de séroprévalence d'*Anaplasma marginale* dans l'est Algérien. L'étude a porté essentiellement sur la Wilaya de Mila.

##### **4.4.1. Séroprévalence vis-à-vis d'*Anaplasma marginale***

###### **4.4.1.1. Séroprévalence globale**

Cette étude confirme effectivement l'existence de l'anaplasmose dans les deux communes étudiées de la wilaya de Mila et les résultats obtenus sont en accord avec la répartition mondiale de l'anaplasmose chez les bovins. Nous avons trouvé une séroprévalence de 24.72 % d'infection due à *Anaplasma marginale* dans l'ensemble de 182 bovins. Notre résultat est bas par rapport au résultat de l'étude qui a été menée en 2014 dans la région d'Alger et qui a révélé une séroprévalence de 43.5% (AMANZOUGHENE, 2014). Cette différence de résultats est probablement due aux changements des conditions météorologiques et à la répartition géographique du vecteur de tiques entre les différentes régions de notre pays.

Si on compare nos résultats à ceux réalisés dans d'autres pays, la séroprévalence obtenue est largement inférieure à la valeur obtenue au Costa Rica avec 87.5% (SHEBISH *et al.*, 2012), en Malaisie avec 77.6 % d'*Anaplasma marginale* (WAHAB *et al.*, 2012), en Zambie avec 76.5% d'anticorps dirigés contre *Anaplasma marginale* détecté chez les bovins (ANTONIO *et al.*, 2011), dans trois régions de l'Ouganda avec 61.9 % de la séroprévalence (SENYONGA *et al.*, 1991), au Kenya avec 53.4% (WESONGA *et al.*, 2016), en Turquie avec 37.8% (AÇICI *et al.*, 2016), à 31.05 % dans le district du Nord du Punjab au Pakistan (ATIF *et al.*, 2013) et en Egypte avec 28% de séroprévalence (RAGAB *et al.*, 2016).

Par contre, le taux obtenu dans les deux régions de la wilaya est supérieur à la valeur de 1.4 % dans la contrée de Grisons, région proche d'Italie (ACTIVETO. 2003), 15.0 % dans la région semi-aride de Paraíba au Brésil et dans les régions du Nord Est du Brésil (COSTA *et al.*, . 2013 ; VALERIA *et al.*, 2013), 15.2 % aux USA (HAIRGROVE *et al.*, 2014), 19.3% chez les bovins de Kancheepuram et dans les environs du district de Chennai de Tamil Nadu en Inde (ARUNKUMAR et NAGARAJAN, 2013), 20 % dans la région de Tanga en Tanzanie (SWAI *et al.*, 2005) et 20.5% au Maroc (RAHALI *et al.*, 2014).

Toutefois la séroprévalence obtenue dans notre région d'étude est proche de celle décrite au Kenya 26 % d'*Anaplasma marginale* par KUTTLER (1965), et à la République Démocratique de Congo 24.5 % (TSHILENGE *et al.*, 2015).

#### **4.4.1.2. Séroprévalence par régions d'élevage**

La prévalence d'*Anaplasma marginale* varie selon la région d'étude. Nous avons constaté des séroprévalences respectivement de 54.1 % et de 18.4 % dans les communes de Bainnane et de Tiberguent. Ceci peut se justifier par l'abondance et la présence des vecteurs, tels que les tabanidés et les tiques dans la région de Bainnane et ce qui est étroitement lié aux conditions climatiques (chaudes et humides) qui y prévaut. De même, il a été confirmé qu'en Europe du Sud, l'infection due à *A. marginale* est persistante chez le bétail et le cerf en raison des morsures de tiques et des tabanidés (NARANJO *et al.*, 2006).

#### **4.4.1.3. Étude des facteurs de risque associés**

La connaissance des facteurs de risques susceptibles d'influencer positivement ou négativement la prévalence d'une maladie est nécessaire pour une bonne compréhension de son épidémiologie ainsi que leurs implications en termes de stratégies de contrôle adaptées aux conditions locales.

Plusieurs auteurs à travers le monde ont étudié les facteurs de risques associés aux maladies transmises par les tiques chez le bovin, en particulier celles du genre *Anaplasma*. À titre d'exemple, Au Maroc, EL HAJ et ses collaborateurs (2002), ont rapporté que les prévalences de ces affections sont fortement associées aux caractéristiques individuelles des animaux (âge, sexe, race, origine). Les mêmes observations ont été signalées en Tunisie (M'GHIRBI et BOUATTOUR, 2009).

L'analyse statistique a montré que parmi les facteurs influençant l'infection par *Anaplsama marginale*, le type d'élevage (P = 0,002) et le climat (P = 0.00004) ont eu une grande

influence, tandis que l'âge (0.01) a eu une influence moindre. La race ( $P = 0.93$ ) et le sexe ( $P = 0.62$ ) n'ont eu aucune influence significative (Tableau 11).

#### a. Age

L'analyse statistique montre qu'il y a une différence significative de séroprévalence entre les différentes tranches d'âge et le taux de réceptivité vis-à-vis l'infection par *Anaplasma marginale* augmente avec l'âge ( $P < 0.05$ ). Le taux de positivité le plus élevé a été observé chez les bovins de plus de 2ans (33%), tandis que le taux le plus bas était chez les sujets de moins d'un an (10.3%). Ces résultats sont en accord avec ceux de POTGIETER et STOLTSZ, (2004) qui affirment que la sévérité de la maladie est relative à l'âge.

La prévalence plus basse de l'anaplasmose chez les bovins de moins d'un an peut être due à la protection immunitaire temporaire des veaux par le colostrum de leurs mères, ce qui peut prévenir l'infection par *Anaplasma*. Mais cette protection dure environ 3 mois et dans la plupart des cas jusqu'au l'âge de 9 à 12 mois puis la résistance diminue graduellement après un an d'âge et ces animaux deviennent de plus en plus sensibles à la maladie (KOCAN *et al.*, 2000 ; TASSI *et al.*, 2002).

#### b. Type d'élevage

Concernant l'influence de type d'élevage sur l'infection des bovins par l'anaplasmose. Le nombre de bovins infectés a été plus important dans les élevages semi-intensifs (35.9%) que dans les élevages de type intensifs (16.3%). Ceci pourrait s'expliquer par Les pratique du pâturage (élevage semi-intensif) qui favorisent généralement le contact entre les animaux et les tiques vectrices vivant dans les champs, en particulier celles du genre *Rh. (Boophilus)* qui transmettent les *Anaplasma* (SAHIBI et RHALEM, 2007).

#### c. Climat

Le facteur climat a également eu une influence très significative sur l'infection des bovins par *Anaplasma marginale* ( $P = 0.00004$ ). Cette étude montre une séroprévalence très élevé dans la région où le climat est humide ( 51.42 %) par rapport à l'autre région avec un climat subhumide à semi-aride (18.36 %), La seule explication plausible serait, à notre avis, la commune de Bainnane héberge un grand nombre de bovins et dispose d'un climat humide, d'un couvert végétal abondant, favorable à la survie et la prolifération des tiques, mais aussi des rongeurs et autres petits mammifères qui constituent les hôtes des stades immatures de certaines espèces de tiques.

#### d. Sexe

Le sexe n'a eu aucune influence sur l'infection des bovins par *Anaplasma marginale*, les analyses statistiques montrent une séroprévalence de 27.77 % chez les mâles et de 23.97 % chez les femelles. Ceci est compatible avec ce qui a été rapporté ailleurs sur les infections transmises par les tiques (FAROUGOU et al., 2007; M'GHIRBI et BOUATTOUR, 2009; SALIH et al., 2009 ; AIT HAMOU et al., 2012). En réalité, l'influence du sexe vis à vis de la réceptivité des infections transmises par les tiques, n'est pas prédominante.

#### e. Race

Concernant la race, cette étude a montrée des séroprévalences non significatives ( $p = 0.96$ ) vis-à-vis du pathogène *Anaplasma marginale* et les deux types de races semble être infectés de la même façon, avec une séroprévalence de 25% pour la race locale et de 24.7% pour la race croisée. Nos résultats semblent indiquer que la race n'est pas un facteur de risque influant. En revanche, au Soudan, Salih et ses collaborateurs (2012) ont rapportés une exposition à *Anaplsama marginale* significativement plus élevée chez les races autochtones comparées aux races croisées, ce qui est contradictoire avec nos observations.

#### f. En fonction de la localité

Lors de cette étude, on a enregistré une grande hétérogénéité des séroprévalences ( $p = 0.01$ ) en fonction des localités au niveau des régions prospectées. Ces différences peuvent s'expliquer notamment par les différences de susceptibilité à l'infection liée aux races présentes dans chaque ferme, à la nature des mesures de protection dont bénéficient les animaux contre diverses infestations et à la variation de la dynamique de transmission du parasite dans le temps et dans l'espace.

#### **4.4.2. Séroprévalence vis-à-vis de *Besnoitia besnoiti***

Dans la présente étude, nous avons décrit pour la première fois l'absence d'anticorps spécifiques à *Besnoitia besnoiti* chez les bovins en Algérie, plus précisément dans deux communes de la wilaya de Mila.

Malgré les facteurs qui influencent et favorisent l'apparition et même l'émergence de la besnoitiose dans notre pays, tels que les changements climatiques, la présence des vecteurs comme les tabanidés et les stomoxes, qualifiés comme un moyen efficace pour transmettre le parasite d'un bovin à un autre, et l'importation des bovins de pays où la besnoitiose est endémique comme la France, on a constaté une séroprévalence de 0% d'infection par cette parasitose. Ceci pourrait s'expliquer par les hypothèses suivantes :

- L'incapacité et/ou l'incompétence des vecteurs à transmettre le parasite d'une manière efficace entre les bovins dans notre pays.
- L'absence d'hôte définitif dans la wilaya de Mila et qui peut jouer un rôle important dans la transmission et le cycle biologique du parasite.
- Les bovins importés dans notre pays dans le but de l'amélioration génétique sont indemnes de la besnoitiose.
- La possibilité d'aucune circulation de ce parasite au sein de la population bovine dans les régions étudiées et même en Algérie.

## Conclusion

Les maladies à vecteurs d'une manière générale constituent un problème réel pour les élevages. Le résultat obtenu dans la présente étude a été restreint à seulement 2 régions de la Wilaya de Mila et quelques élevages ont été sélectionnés dans chacune de ces régions. Les résultats de notre travail nous ont permis de mettre en évidence par des tests sérologiques l'absence de la besnoitiose à *Besnoitia besnoiti* et la circulation de l'anaplasmose à *Anaplasma marginale* dans le cheptel bovin des deux communes de la Wilaya de Mila. Par conséquent, les résultats obtenus ne reflètent pas la situation réelle de ces deux maladies et son impact au niveau national.

Au regard de nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

Concernant l'anaplasmosse bovine :

- Des études plus approfondies devront être conduites pour déterminer leur distribution sur l'ensemble du pays afin d'avoir une meilleure compréhension de la dynamique, de la transmission et son importance économique.
- Une enquête annuelle sur la prévalence de la maladie devrait être effectuée dans toutes les fermes autour de la nation pour saisir totalement leur importance médicale et économique et aider à fournir suffisamment d'informations importantes concernant l'anaplasmose bovine qui pourrait être utile aux agriculteurs et les vétérinaires dans le pays
- Le contrôle et la surveillance de ce groupe de pathogènes négligés, aux conséquences économiques lourdes, devrait recevoir une attention particulière de la part des pouvoirs publics et des professionnels de l'élevage des bovins en Algérie, en prenant en considération l'impact des changements climatiques sur leurs vecteurs et donc sur leur distribution.

Concernant la besnoitiose bovine :

- Des études de séroprévalence devront être effectuées sur tout le territoire national pour confirmer l'absence ou la présence de cette parasitose.
- De nombreux aspects épidémiologiques et biologiques liés au cycle de vie du parasite, les voies de transmission de la maladie et les facteurs de risque associés demeurent peu clairs. Pour cette raison, dans les études futures, il faut examiner s'il existe plusieurs souches de *B. besnoiti* adaptées individuellement suivant la localisation géographique.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- A. ESTEBAN-GIL , P. JACQUIET , S. FLORENTIN , A. DECAUDIN , X. BERTHELOT , P. RONSIN , C. GRISEZ , F. PREVOT , J.P. ALZIEU , M. MAROIS , N. CORBOZ , M. PEGLION , C. VILARDELL , E. LIENARD , E. BOUHSIRA B, J.A. CASTILLO , M. FRANC , N. PICARD-HAGEN, (2016). Does bovine besnoitiosis affect the sexual function of chronically infected bulls? *Theriogenology* xxx 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.074>.
- ABDELSALAM Q, TALAFHA1, AHMAD M. AL-MAJALI , MOHAMMAD M. ABABNEH, SAMEEH M. ABUTARBUSH, (2015). Epidemiologic study on *Besnoitia besnoiti* infection in dairy herds in Jordan. *Parasitol Res*, DOI 10.1007/s00436-015-4448-5.
- ACTIVETO, (2003). Ruminants-colloque –24, n51 :4.
- AGOSTI, M., BELLONI, A., MORINI, M. et VACIRCA, G., (1994). Segnalazione di unfocolaio di Besnoitiosi in bovini da carne importati. In : *Praxis Vet.* Vol. 15, p. 5-6.
- AIT HAMOU S., RAHALI T., SAHIBI H., BELGHYTI D., LOSSON B., RHALEM A., (2012). Séroprévalences des hémoparasitoses bovines dans deux régions irriguées du Maroc. *Rev. Méd. Vét.*, 163 : 480-485.
- AIT HAMOU. S , T. RAHALI, H. SAHIBI, D. BELGHYTI, B. LOSSON, A. RHALEM, (2012). Séroprévalences des hémoparasitoses bovines dans deux régions irriguées du Maroc. *Revue Méd. Vét.*, 163, 10, 480-485.
- AL GAZZONIS, G ALVAREZ GARCIA, A MAGGIONI, S AURELIO ZANZANI, E OLIVIERI, R COMPIANI, G SIRONI, LM ORTEGA MORA, MT MANFREDI, (2017). Serological dynamics and risk factors of *Besnoitia besnoiti* infection in breeding bulls from an endemically infected purebred beef herd. *Parasitol Res*,116:1383–1393. DOI 10.1007/s00436-017-5418-x.
- AL-KHALEDI MJ, (2008) Epidemiological study of (Theileriosis, Babesiosis and Anaplasmosis) in cattle of Al-Qadisiya province .M.S. thesis. Vet. Med. College Baghdad Uni. In Arabic.
- ALLEMAN A.R., PALMER G.H., MCGUIRE T.C., MCELWAIN T.F., PERRYMAN L.E., BARBET A.F, (1997), *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 3 Is Encoded by a Polymorphic Multigene Family, *Infection and Immunity* ; 65 ; 156-163.
- AL-MOSSAWY HS, (2012), A Serological Investigation of Bovine Anaplasmosis in Al-Diwanyia City. Diploma thesis of Veterinary Medicine/Internal and Preventive Veterinary Medicine.
- ÁLVAREZ-GARCIA G., FERNANDEZ-GARCIA A., GUTIERREZ-EXPOSITO D., QUITERIA J.A.R.-S., AGUADO-MARTINEZ A., ET ORTEGA-MORA L.M. (2014). Seroprevalence of *Besnoitia besnoiti* infection and associated risk factors in cattle from an endemic region in Europe. *Vet. J.* 200, 328–331.
- ÁLVAREZ-GARCIA G., FREY C.F., MORA L.M.O., ET SCHARES G, (2013). A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends Parasitol.* 29, 407–415.
- ALZIEU J.-P. (2007). L’extension de la besnoitiose bovine en France. *Point Vét.* 38, 37–43.
- ALZIEU J.P. ET JACQUIET P. (2010). La besnoitiose bovine : une émergence avérée en France et en Europe : moyens de diagnostic et de contrôle. In : SNGTV (eds). *Proceeding des 20èmes rencontres GTV Rhône Alpes*, 25 septembre 2010, Vetagro-sup Marcy l’Etoile
- ALZIEU J.P. ET JACQUIET P. (2010). La besnoitiose bovine : une émergence avérée en France et en Europe : moyens de diagnostic et de contrôle. In : SNGTV (eds). *Proceeding des 20èmes rencontres GTV Rhône Alpes*, 25 septembre 2010, Vetagro-sup Marcy l’Etoile.
- ALZIEU JP, JACQUIET P, LIENARD E, GRISEZ C, PREVOT F, MALAVIEILLE R, DESCLAUX X, NUSSBAUM S, BERGEAUD JP, FRANC M, SCHELCHER F, CORBOZ N, BASTIEN F, GUERRIER-CHATELET MC, GAVET L, SCHNEIDER V, BOULON C, (2011). Réémergence de la besnoitiose bovine : démarche diagnostique et possibilités de contrôle. *Bull GTV*, 58 : 71-86.

- ALZIEU J-P. (2009). Actualités sur la transmission et le diagnostic de la besnoitiose bovine. *Point Vét.* 40, 16–19.
- ALZIEU, J. et JACQUIET, P., (2012). La besnoitiose bovine : du constat de son émergence à la nécessité de son contrôle. *Le Point Vétérinaire Numéro spécial parasitologie interne des ruminants*, 43, pp. 106-112.
- ALZIEU, J.P ; DORCHIES, P. ; SCHELCHER, F. ; GOTTSTEIN, B. (2007). L'extension de la besnoitiose bovine en France. *Point vétérinaire*, 38, 37-43.
- ALZIEU, J.P. (1991). La besnoitiose bovine ou anasarque des bovins. *Bulletin des GTV*, 6, 157-161.
- AMANZOUAGHENE, N, (2014). Étude épidémiologique sur les infections et co-infections par *Babesia* spp et *Anaplasma* spp chez le bovin dans la région d'Alger - Identification des tiques Ixodina. En vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Sciences Vétérinaires. École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger. 184p.
- AMEEN KAH, ABDULLAH BA, ABDUL RAZAQ RA, (2012). Seroprevalence of *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in domestic animals in Erbil, Iraq. *Iraqi J Vet Sci* 26:109–114.
- ANTHONY, D.W., ROBY, T.O. (1962). Anaplasmosis studies with *Dermacentor variabilis* (Say) and *Dermacentor andersoni* Stiles (= *D. venustus* Marx) as experimental vectors. *Proceedings of the 4th national anaplasmosis conference*. In: *Proceedings of the 4th national anaplasmosis conference*, p. 78-81.
- ARAJO F.R., MELO V., RAMOS C., MADRUGA C., SOARES C., KESSLER R., ALMEIDA N., ARAJO G., ALVES L., TORRES R., FRAGOSO S., ARAUCO P., BACANELLI G., OLIVEIRA M., SANTOS L., (2005) Development of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale* The *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 765-769.
- ARULKANTHAN A, BROWN W.C., MCGUIRE T.C., KNOWLES D.P., (1999), Biased Immunoglobulin G1 Isotype Responses Induced in Cattle with DNA Expressing *msp1a* of *Anaplasma marginale*, *Infection and immunity*, 1999, 3481–3487.
- ARUNKUMAR S and. NAGARAJAN K. (2013). A study on prevalence status of *Anaplasma marginale* infection among cattle population of kancheepuram and in and around chennai districts of Tamil Nadu, *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences* 3 (1) : 155-157.
- AUBRY, P. and GEALE, D.W. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Crown in the right of Canada. Transboundary and Emerging Diseases*, 58: 1–30.
- BADOLO, (2014). Contribution à l'étude épidémiologique des anaplasmoses et des babésioses suite à l'introduction récente de la tique *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) dans le Sud-Ouest du Burkina Faso. Thèse de master en productions et industries animales, UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO DIOULASSO. P19.
- BARBET A.F., BLENTLINGER R; JOOYOUNG YI, LUNDGREN A.M., BLOUIN E.F., KOCAN K.M., (1999), Comparison of Surface Proteins of *Anaplasma marginale* Grown in Tick Cell Culture, Tick Salivary Glands, and Cattle, *Infection and immunity*, 67, 102–107.
- BASSO, W., LESSER, M., GRIMM, F., HILBE, M., SYDLER, T., TRÖSCH, L., OCHS, H., BRAUN, U. & DEPLAZES, P. (2013) Bovine besnoitiosis in Switzerland: Imported cases and local transmission. *Veterinary Parasitology* 198, 265–273.
- BASSON P.A., MCCULLY R.M., ET BIGAKJE R.D, (1970). Observations on the pathogenesis of bovine and antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) infection in cattle and rabbits. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 37, 105–126.
- BAUMGARTNER, W., SCHLERKA, G., FUMICZ, M., STOGER, J., AWAD-MASALMEH, M., SCHULLER, W., WEBER, P., (1992). Seroprevalence survey for *Anaplasma marginale*-infection of Austrian cattle. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe*

- B. Journal of veterinary medicine. Series B 39, 97-104.
- BERRY S, IBATA G., EDWARDS S., (1981), Antibody formation to *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in calves in Bolivia, Tropical Animal Health and Production, 13, 240-241.
- BESNOIT, CH; ROBIN, V., (1912). Sarcosporidiose cutanée chez une vache. In : Revue Vétérinaire. Vol. 37, n° 649, p. 63.
- BEUGNET F., et BOURDOISEAU G. (2005). Coccidiose toxoplasmique du chat et toxoplasmose. EMC - Vét. 2, 63-73.
- BIGALKE R.D. (1981). Besnoitiosis and Globidiosis. In Diseases of Cattle in the Tropics, M. Ristic, and I. McIntyre, eds. (Springer Netherlands), 429-442.
- BIGALKE R.D., SCHOEMAN J.H., ET MCCULLY R.M. (1974). Immunization against bovine besnoitiosis with a live vaccine prepared from a blue wildebeest strain of *Besnoitia besnoiti* grown in cell cultures. 1. Studies on rabbits. Onderstepoort J. Vet. Res. 41, 1-5.
- BIGALKE RD, (1968). New Concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. Onderstepoort J Vet Res, 35 : 133-137.
- BIRTLES R. J., HARRISON. G., SAUNDERS N. A., MOLYNEUX D. H., (1995), Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp., International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 1-8.
- BLOUIN E.F., SALIKI J.T., DE LA FUENTE J., GARCIA-GARCIA J.C., KOCAN K.M., (2003), Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells, Veterinary Parasitology, 111, 247-260.
- BOCK RE, DE VOS AJ, MOLLOY JB, (2006). Tick-borne diseases of Cattle. Australian and New Zealand standard diagnostic procedures. www.scahls.org.au/Procedures/Documents/.../tick\_borne\_diseases.pdf. Accessed 03 February 2015.
- BOCK, R.E., DEVOS, A.J., KINGSTON, T.G., CARTER, P.D., (2003). Assessment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity, immunogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. Veterinary parasitology 118, 121-131.
- BORDES, F., (2009). Etude de cas. Besnoitiose bovine sur un troupeau de bovins. Nouveau Praticien Vétérinaire, élevages et santé. Vol 2 (11), pp. 65-69.
- BOULANGER, P., RUCKERBAUER, G.M., BANNISTER, G.L., MACKAY, R.R., PETER, N.H., (1971). Anaplasmosis: control of the first outbreak in Canada by serological identification and slaughter. Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de medecine comparee 35, 249-257.
- BOWIE M.V., DE LA FUENTE J., KOCAN K.M., BLOUIN E.F., BARBET A.F., (2002), Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle, Gene, 282, 95-102
- BRADWAY D., TORIONI DE ECHAIDE S., KNOWLES D., HENNAGER S., MCELWAIN , (2001), Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with *Anaplasma marginale*, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 13, 79-81.
- BRAM R.A. (1983) Tick-borne livestock diseases and their vectors: The global problem. In: Ticks and tick-borne diseases. FAO Anim. Prod. Health., , 36, 7-11.
- BRAYTON K.A., KNOWLES D.P., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., (2001), Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 4130-4125.
- BRENNER D. J., O'CONNORS. P., WINKLER H. STEIGERWALT A. G., (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 Bacteriology*, 43, 776-786.

BRENNER D., KRIEG N., STALEY J-T., GARRITY G., BERGEY D., (2005), *Bergey's manual of Systemic Bacteriology*, Volume 2 part. C, The alpha-, beta-, delta-, and epsilon proteobacteria, Springer.

BRIZUELA, C.M., ORTELLADO, C.A., SANABRIA, E., TORRES, O., ORTIGOSA, D., (1998). The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. *Veterinary parasitology* 76, 27-41.

BROWN W, SHKAP V., ZHU D., MCGUIRE T, TUO W, MCELWAIN T, PALMER G., (1998), CD4(+) T-Lymphocyte and Immunoglobulin G2 Responses in Calves Immunized with *Anaplasma marginale* Outer Membranes and Protected against Homologous Challenge, *Infection and Immunology*, 66, 5406-5413.

BROWN W.C., MCGUIRE T.C., ZHU D., LEWIN H.A., SOSNOW J., PALMER G.H., (2001)a, Highly Conserved Regions of the Immunodominant Major Surface Protein 2 of the Genogroup II Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale* Are Rich in Naturally Derived CD41 T Lymphocyte Epitopes that Elicit Strong Recall Responses, *Journal of Immunology*, 166,1114-1124.

BROWN W.C., PALMER G.H, LEWIN H.A., MCGUIRE T.C., (2001), CD4\_ T Lymphocytes from Calves Immunized with *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1 (MSP1), a Heteromeric Complex of MSP1a and MSP1b, Preferentially Recognize the MSP1a Carboxyl Terminus That Is Conserved among Strains, *Infection and immunity*, 69, 6853-6862.

BROWN W.C., ZHU D., SHKAP V., MCGUIRE T.C., BLOUIN E.F., KOCAN K.M, PALMER G.H., (1998), The Repertoire of *Anaplasma marginale* Antigens Recognized by CD41 T Lymphocyte Clones from Protectively Immunized Cattle Is Diverse and Includes

Major Surface Protein 2 (MSP-2) and MSP-3, *Infection and Immunity*, 66, 5414-5422

BROWN WC, SHKAP V, ZHU D, MCGUIRE TC, TUO W, MCELWAIN TF, PALMER GH (1998). CD4(+) T lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect. Immun.* 66: 5406-5413.

CAMUS E., UILENBERG G. Anaplasmosis. In: Lefevre P-C., Blancou J., Chermette R., Uilenberg G. (Eds),( 2010), *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. Second edition. Lavoisier: Italie, 1247-1263.

CARELLI, G., DECARO, N., LORUSSO, A., ELIA, G., LORUSSO, E., MARI, V., CECI, L. and BUONAVOGLIA, C. (2007). Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR, *Veterinary Microbiology*, 124: 107-114.

CARRENO AD, ALLEMAN AR, BARBET AF, PALMER GH, NOH SM, JOHNSON CM, (2007), In vivo endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. *Vet Pathol* , 44(1):116-118.

CHARTIER, C., HARD, J., MOREL, P.-C. ET TRONEY, P.-M., (2000). Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Paris :Tee & DOe / EMINTER.

CHOWDHURY S, HOSSAIN MA, BARUA SR, ISLAM S, (2006), Occurrence of common blood parasites of cattle in Sirajgoni Sadar of Bangladesh. *Bangl. J. Vet. Med.* . 4 (2): 143-145.

COETZEE J.F., SCHMIDT P.L., APLEY M.D., REINBOLD J.B., KOCAN K.M., (2007). Comparison of the complement fixation test and competitive ELISA for serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infection in experimentally infected steers, *American Journal of Veterinary Research*, 68, 872-878.

COETZEE, J.F., APLEY, M.D., KOCAN, K.M., RURANGIRWA, F.R., VAN DONKERSGOED, J., (2005). Comparison of three oxytetracycline regimes for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. *Veterinary parasitology* 127, 61-73.

- COLEMAN, P.G., PERRY, B.D., WOOLHOUSE, M.E., (2001). Endemic stability--a veterinary idea applied to human public health. *Lancet* 357, 1284-1286.
- CORONA, B., RODRIGUEZ, M., MARTINEZ, S., (2005). Anaplasmosis bovina. *Revista Electronica de Veterinaria REDVET*. Available at: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040405.html>, 4, 1-27.
- CORREA W.M., CORREA C.N.M., GOTTSCHALK A.F., (1978), Bovine Abortion Associated with *Anaplasma marginale*, *Canadian journal of comparative medicine*, 42 , 227-228.
- CORRIER, D.E., GUZMAN, S., (1977). The effect of natural exposure to *Anaplasma* and *Babesia* infections on native calves in an endemic area of Colombia. *Trop. Anim. Health Prod.* 9, 47-51.
- CORTES H., FERREIRA M.L., VIDAL R., SERRA P., ET CAEIRO V. (2003). Contribuição para o estudo da besnoitiose bovina em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 98 (545), 43–46.
- CORTES H.C.E., MULLER N., BOYKIN D., STEPHENS C.E., ET HEMPHILL A. (2011) In vitro effects of arylimidamides against infection in Vero cells. *Parasitology* 138, 583–592.
- CORTES H.C.E., NUNES S., REIS Y., STAUBLI D., VIDAL R., SAGER H., LEITÃO A., ET GOTTSCHALK B. (2006). Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and western blot. *Vet. Parasitol.* 141, 216–225.
- CORTES H.C.E., REIS Y., GOTTSCHALK B., HEMPHILL A., LEITÃO A., et MÜLLER N. (2007). Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Vet. Parasitol.* 146, 352–356.
- CORTES, H., LEITAO, A., VIDAL, R., VILAVICOSA, M.J., FERREIRA, M.L., CAEIRO, V. et HJERPE, C.A., (2005). Besnoitiosis in bulls in Portugal. In : *The Veterinary Record*. Vol. 157, n° 9, p. 262-264.
- CORTES, H.C., REIS, Y., GOTTSCHALK, B., HEMPHILL, A., LEITAO, A., MÜLLER, N., (2007). Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Vet. Parasitol.* 146, 352–356.
- CORTES, H.C., REIS, Y., WAAP, H., VIDAL, R., SOARES, H., MARQUES, I., PEREIRA DA FONSECA, I., FAZENDEIRO, I., FERREIRA, M.L., CAEIRO, V., SHKAP, V., HEMPHILL, A., LEITAO, A., (2006). Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Vet. Parasitol.* 141, 226–233.
- COSTA V.M., RIBEIRO M.F., DUARTE A.L., MANGUEIRA J.M., PESSOA A.F., AZEVEDO S.S., BARROS A.T., RIET-CORREA F., LABRUNA M.B. (2013). Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region. *Rev Bras Parasitol Vet.* Apr-Jun; 22(2) :207-13.
- DA SILVA .VNRB ,(2008). Surveillance of vector-borne diseases in cattle with special emphasis on bluetongue disease in Switzerland. Ph.D dissertation. Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel.
- DE CASTRO J.J., (1997), Sustainable tick and tick-borne diseases control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitol.* , 71, 77-97.
- DE LA FUENTE J., GARCIA-GARCIA J.C., BARBET A.F., BLOUIN E.F., KOCAN K.M., (2004), Adhesion of outer membrane proteins containing tandem repeats of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) to tick cells *Veterinary Microbiology*, 98, 313–322.
- DE LA FUENTE J., GARCIA-GARCIA J.C., BLOUIN E.F., KOCAN K.M., (2000), Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells, *International Journal for Parasitology*, 31, 145-153.
- DE LA FUENTE J., KOCAN K.M., BLOUIN E.F., ZIVKOVIC Z., NARANJO V., ALMAZAN C., ESTEVES E., JONGEJAN F., DAFFRE S., MANGOLD A.J., (2010), Functional genomics and evolution of tick–*Anaplasma* interactions and vaccine

- development, *Veterinary Parasitology*, 167, 175–186.
- DE LA FUENTE J., LEW, A., LUTZ, H., MELI, M.L., HOFMANN-LEHMANN, R., SHKAP, V., MOLAD, T., MANGOLD, A.J., ALMAZAN, C., NARANJO, V., GORTAZAR, C., TORINA, A., CARACAPPA, S., GARCIAPEREZ, A.L., BARRAL, M., OPORTO, B., CECI, L., CARELLI, G., BLOUIN, E.F. and KOCAN, K.M. (2005a). Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Animal Health Research Reviews*, 6: 75–89.
- DE LA FUENTE J., VICENTE J., HOFLE U., RUIZ-FONS F., FERNANDEZ DE MERA I.G., VAN DEN BUSSCHE R., KOCAN K.M., GORTAZAR C., (2004), *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain *Veterinary Microbiology*, 100, 163–173.
- DE LA FUENTE, J., BUSSCHE, R.D., and KOCAN, K.M. (2001). Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Veterinary Parasitology*, 97: 65–76.
- DE LA FUENTE, J., MASSUNG, R.F., WONG, S.J., CHU, F.K., LUTZ, H., MELI, M., VON LOEWENICH, F.D., GRZESZCZUK, A., TORINA, A., CARACAPPA, S., MANGOLD, A.J., NARANJO, V., STUEN, S. and KOCAN, K.M. 2005b. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1309-1317.
- DE LA FUENTE, J., NARANJO, V., RUIZ-FONS, F., HOFLE, U., FERNANDEZ DE MERA, I.G., VILLANUA, D., ALMAZAN, C., TORINA, A., CARACAPPA, S., KOCAN, K.M., GORTAZAR, C., (2005)d. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, N.Y.) 5, 390-401.
- DE LA FUENTE, J., NARANJO, V., RUIZ-FONS, F., HÖFLE, U., FERNÁNDEZ DE MERA, I.G., VILLANÚA, D., ALMAZÁN, C., TORINA, A., CARACAPPA, S., KOCAN, K.M., GORTÁZAR, C., (2005)b. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 5 (4): 390-401.
- DE LA FUENTE, J., TORINA, A., CARACAPPA, S., TUMINO, G., FURLA, R., ALMAZAN, C., KOCAN, K.M., (2005)e. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. *Veterinary parasitology* 133, 357-362.
- DE LA FUENTE, J., TORINA, A., NARANJO, V., CARACAPPA, S., VICENTE, J., MANGOLD, A.J., VICARI, D., ALONGI, A., SCIMECA, S., KOCAN, K.M., (2005)f. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from cattle farms in the province of Palermo, Sicily. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 52, 226-229.
- DE LA FUENTE, J., VAN DEN BUSSCHE, R.A., KOCAN, K.M., (2001)c. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Veterinary parasitology* 97, 65-76.
- DE WAAL D T, (2000). Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa. *Ann NYAcad Sci* 916:474–483
- DECARO, N., CARELLI, G., LORUSSO, E., LUCENTE, M.S., GRECO, G., LORUSSO, A., RADOGNA, A., CECI, L. and BUONAVOGLIA, C. (2008). Duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20: 606–611.
- DUBEY J.P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1019–1024.
- DUBEY JP, SREEKUMAR C, ROSENTHAL BM, VIANNA MC, NYLUND M,

- NIKANDER S, OKSANEN A, (2004). Redescription of *Besnoitia tarandi* (Protozoa: Apicomplexa) from the reindeer (*Rangifer tarandus*). *Int J Parasitol*, 34 : 1273-1287.
- DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P.J., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y., RURANGIRWA F.R., (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 *Eorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and HE agent's as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila, *Journal of Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 51, 2145–2165.
- DUNNING HOTOPP, J.C., LIN, M., MADUPU, R., CRABTREE, J., ANGIUOLI, S.V., EISEN, J.A., SESHADRI, R., REN, Q., WU, M., UTTERBACK, T.R., SMITH, S., LEWIS, M., KHOURI, H., ZHANG, C., NIU, H., LIN, Q., OHASHI, N., ZHI, N., NELSON, W., BRINKAC, L.M., DODSON, R.J., ROSOVITZ, M.J., SUNDARAM, J., DAUGHERTY, S.C., DAVIDSEN, T., DURKIN, A.S., GWINN, M., HAFT, D.H., SELENGUT, J.D., SULLIVAN, S.A., ZAFAR, N., ZHOU, L., BENAHMED, F., FORBERGER, H., HALPIN, R., MULLIGAN, S., ROBINSON, J., WHITE, O., RIKIHISA, Y., TETTELIN, H., 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS genetics* 2, e21.
- DURRANI A., GOYAL S., (2012), A retrospective study of Anaplasma in Minnesota cattle Turk. *Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 36, 131-136.
- EFSA, (2010). Bovine besnoitiosis: An emerging disease in Europe. Parma, Italy. Scientific statement on Bovine besnoitiosis.
- EHOUNOUD, C., YAO, K., DAHMANI, M., ACHI, Y., AMANZOUAGHENE, N., N'DOUBA, A.K., N'GUESSAN, J., RAOULT, D., FENOLLAR, F., MEDIANNIKOV, O., (2016). Multiple Pathogens Including Potential New Species in Tick Vectors in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, 1–18. doi:10.1371/journal.pntd.0004367.
- EKICI O., SEVINC F., (2011), Comparison of cELISA and IFA tests in the diagnosis of anaplasmosis in cattle, *African journal of microbiologie research*, 5, 1188-1191.
- EL HADEF EL OKKI-BOUCHAIR, G. (1987). Contribution à l'étude de *Besnoitia besnoiti*. Développement chez les animaux de laboratoire. Essai d'application au diagnostic de la besnoitiose bovine par réaction d'immunofluorescence indirecte. Mémoire de Maîtrise Es Sciences Vétérinaires (Alfort), 117p.
- EL HAJ N., KACHANI M., BOUSLIKHANE M., OUHELLI H., AHAMI A.T., KATENDE J., MORZARIA S.P. (2002). Séroépidémiologie de la theilériose et de la babésiose au Maroc. *Rev. Méd. Vét.*, 153, 809-814.
- ELLIS J.T., HOLMDAHL O.J.M., RYCE C., NJENGA J.M., HARPER P.A.W., ET MORRISON D.A. (2000). Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest and goats. *Protist* 151, 329–336.
- ERIKS IS, STILLER D, PALMER GH (1993): Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J Clin Microbiol* , 31(8):2091-2096.
- ESQUERRE E, (2015). La besnoitiose : synthèse méthodique épidémiologique et étude de l'évolution épidémiologique en région paca. Présentée à l'université Claude-Bernard - Lyon I (Médecine - Pharmacie) , pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. 40p.
- ESQUERRE ELIA, (2015). La besnoitiose : synthèse méthodique épidémiologique et étude de l'évolution épidémiologique en région paca. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. L'université Claude Bernard - Lyon I. 20p.
- ESTEBAN-GIL A, C. CALVETE, I. CASAS'US, A. SANZ, J. FERRER, M.P. PERIS, J.M. MARC'EN-SERAL, J.A. CASTILLO, (2016). Epidemiological patterns of bovine besnoitiosis in an endemic beef cattle herd reared under extensive conditions. *Veterinary Parasitology*, S0304-

4017(16)30530-1.

<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.vetpar.2016.12.018>.

ESTEBAN-GIL, A., GRISEZ, C., PREVOT, F., FLORENTIN, S., DECAUDIN, A., PICARD-HAGEN, N., BERTHELOT, X., RONSIN, P., ALZIEU, J. P., MAROIS, M., CORBOZ, N., PEGLION, M., VILARDELL, C., LIÉNARD, E., BOUHSIRA, E., CASTILLO, J. A., FRANC, M. & JACQUIET, P. (2014) No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of chronically infected bulls. *Parasitology Research* 113, 2355–2362.

EUZEBY J, (1987). Protozoologie médicale compare. Les protozooses des animaux et leurs relations avec les protozooses de l'Homme (avec études des arthropodes hématophages vecteurs de protozoaires). Volume II. Myxozoa – Microspora – Acetospora – Apicomplexa 1. Coccidioses (sensu lato). Fondation Marcel Mérieux.

EWING, S.A. (1981). Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In HIDALGO, R.J and JONES, E.W. (ed.), *Proceedings of the 7th National Anaplasmosis Conference*. Mississippi State University, Mississippi State, 395–423.

F. D. WESONGA ; J. M. GACHOHI ; P. M. KITALA ; J. M. GATHUMA ; T M. J. NJENGA., (2016). Seroprevalence of *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections and associated risk factors in Machakos County, Kenya. *Trop Anim Health Prod*, DOI 10.1007/s11250-016-1187-2.

FAROUGOU S., TASSOU A.W., TCHABODÉ D.M., KPODÉKON M., BOKO C., YOUSAO A.K.I. (2007). Tiques et hémoparasites du bétail dans le nord-Bénin. *Rev. Méd. Vét.*, 158, 463-467.

FERNANDEZ-GARCIA A, ALVAREZ-GARCIA G, RISCO-CASTILLO V, AGUADO-MARTINEZ A, MARCEN JM, ROJO-MONTEJO S, CASTILLO JA, ORTEGA-MORA LM, (2010). Development and use of an indirect ELISA in an outbreak of bovine besnoitiosis in Spain. *Vet Rec* 166:818–822.

FERNANDEZ-GARCIA, A., RISCO-CASTILLO, V., PEDRAZA-DIAZ, S., AGUADO-MARTINEZ, A., ALVAREZ-GARCIA, G., GOMEZ-BAUTISTA, M., COLLANTES-FERNANDEZ, E. et ORTEGA-MORA, L.M., (2009). First Isolation of *Besnoitia besnoiti* from a Chronically Infected Cow in Spain. In : *Journal of Parasitology*. Vol. 95, n° 2, p. 474-476.

FERRIE J.J. (1984). La besnoitiose bovine. *Revue bibliographique. Observations personnelles*. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Université Paul Sabatier, 288p.

FIGUEROA, J.V., ALVAREZ, J.A., RAMOS, J.A., ROJAS, E.E., SANTIAGO, C., MOSQUEDA, J.J., VEGA, C.A. and BUENING, G.M. (1998). Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. *Annual New York Academy of Science*. 849: 1–10.

FLORENTIN S. (2016). La semence de taureaux infectés par *Besnoitia besnoiti* : moindre qualité et source de contamination. Thèse pour obtenir le grade de DOCTEUR VÉTÉRINAIRE. Toulouse. 20p.

FOUQUET C. (2009). La besnoitiose bovine : suivi épidémiologique de l'épizootie de la région PACA. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon : Université Claude Bernard, 105.

FRANC M. (1996). *La besnoitiose bovine*. In : Collection Fondation Marcel Mérieux (eds), *Proceeding du colloque Protozooses bovines - Actualités*, pp. 47–55.

FRANC M., ET CADIERGUES M.C. (1999). La besnoitiose bovine: attitude diagnostique et thérapeutique. *Bull GTV* 2, 45–50.

FRANC M., GOURREAU J.M., ET FERRIE J. (1987). La besnoitiose bovine. *Point Vét.* 19, 445–454.

FRANCO, E.E. et BORGES, I., (1915). Nota sobre a sarcosporidiose bovina. In : *Revista de Medicina Veterinaria*. 1915. Vol. 165, p. 255–299.

FRENKEL JK ,(1977). *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. *J Parasitol*, 63 : 611-628.

- FREUDIGER I, (2008). La besnoitiose bovine : étude épidémiologique de l'épizootie des Alpes-de-Haute-Provence et des Hautes-Alpes. Université Claude-Bernard - Lyon I (Médecine - Pharmacie). These pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. 52p.
- FREUDIGER I. (2008). La besnoitiose bovine : étude épidémiologique de l'épizootie des Alpes-de-Haute-Provence et des Hautes-Alpes. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon : Université Claude Bernard, 85p.
- FREY C.F., GUTIERREZ-EXPOSITO D., ORTEGA-MORA L.M., BENAVIDES J., MARCEN J.M., CASTILLO J.A., CASASUS I., SANZ A., GARCIA-LUNAR P., ESTEBAN-GIL A., (2013). Chronic bovine besnoitiosis: Intra-organ parasite distribution, parasite loads and parasite-associated lesions in subclinical cases. *Vet. Parasitol.* 197, 95–103.
- FULTON JD et TURK JL. (1959). Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet*, 1068-1069.
- FYUMAGWA, R.D., SIMMLER, P., MELI, M.L., HOARE, R., HOFMANN-LEHMANN, R., LUTZ, H., (2009). Prevalence of *Anaplasma marginale* in different tick species from Ngorongoro Crater, Tanzania. *Veterinary parasitology* 161, 154-157.
- GALE K.R., LEATCH G., DIMMOCK C.M., WOOD P.R., (1997), *Anaplasma marginale* : effect of the treatment of cattle with an interferon- $\gamma$  neutralizing monoclonal antibody or the nitric oxide synthetase inhibitor aminoguanidine on the course of infection, *Parasite immunology*, 19, 411-417.
- GALE KR, LEATCH G, GARTSIDE M, DIMMOCK CM (1992). *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. *Parasitol Res.* 78: 410-415.
- GARCÍA LUNAR P., ORTEGA-MORA L.M., SCHARES G., GOLLNICK N.S., JACQUIET P., GRISEZ C., PREVOT F., FREY C.F., GOTTSTEIN B., ET ÁLVAREZ GARCÍA G, (2013). An inter-laboratory comparative study of serological tools employed in the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection in bovines. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 59–68.
- GARCIA-GARCIA J., DE LA FUENTE J., BELL-EUNICE G., BLOUIN E., KOCAN K., (2004), Glycosylation of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a and Its Putative Role in Adhesion to Tick Cells, *Infection and immunity*, 72, 3022–3030.
- GARCIA-LUNAR, P., MORE, G., CAMPERO, L., ORTEGA-MORA, L.M., ALVAREZ-GARCIA, G., (2015). Anti-*Neospora caninum* and anti-*Sarcocystis spp.* specific antibodies cross-react with *Besnoitia besnoiti* and influence the serological diagnosis of bovine besnoitiosis. *Vet. Parasitol.* 214, 49–54.
- GARCIA-LUNAR, P., ORTEGA-MORA, L.M., SCHARES, G., GOLLNICK, N.S., JACQUIET, P., GRISEZ, C., PREVOT, F., FREY, C.F., GOTTSTEIN, B., ALVAREZ-GARCIA, G., (2013). An inter-laboratory comparative study of serological tools employed in the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection in bovines. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 59–68.
- GASQUET C, (2014). Etude d'un foyer d'anaplasmose bovine dans le Département de la Loire. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I. P19-34
- GENTILE A, MILITERNO G, SCHARES G, NANNI A, TESTONI S, BASSI P, GOLLNICK NS, (2012). Evidence for bovine besnoitiosis being endemic in Italy—first in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from cattle born in Italy. *Vet Parasitol* 184:108–115.
- GEORGE, J.E., POUND, J.M., DAVEY, R.B., (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129 Suppl, S353-366.
- GHOSH S, AZHAHIANAMBIA P, YADAV MP, (2007). Upcoming and future strategies of tick control: a review. *J Vector Borne Dis* 44:79–89.
- GOLDMAN M., ET PIPANO E. (1983). Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel. *Trop. Anim. Health Prod.* 15, 32–38.
- GOLLNICK NS, GENTILE A, SCHARES G, (2010). Diagnosis of bovine besnoitiosis in a bull born in Italy. *Vet Rec* 166:599–599.

- GOURREAU, J.M., FRANC, M. et POLACK, B., (2000). La besnoitiose. In : Maladies des bovins. 3e édition. Paris : France Agricole.
- GRAF, J.F., GOGOLEWSKI, R., LEACH-BING, N., SABATINI, G.A., MOLENTO, M.B., BORDIN, E.L., ARANTES, G.J., (2004). Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129 Suppl, S427-442.
- GRAU, H.E., FILHO, C.N., PAPPEN, F.G., FARIAS, N.A., (2013). Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria* 22, 189-193.
- GUBLER D.J., (1988), Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg. Insect. Dis.*, 4, 442-450.
- GUGLIELMONE AA (1995) Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol* 57:109–119.
- GUTIERREZ-EXPOSITO D, ESTEBAN-GIL A, ORTEGA-MORA LM, GARCIA-LUNAR P, CASTILLO JA, MARCEN JM, ALVAREZ-GARCIA G, (2014). Prevalence of *Besnoitia besnoiti* infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees. *Vet J* 200:468–470.
- GUTIERREZ-EXPOSITO D, ORTEGA-MORA LM, GAJADHAR AA, GARCIA-LUNAR P, DUBEY JP, ALVAREZ-GARCIA G, (2012). Serological evidence of *Besnoitia spp.* infection in Canadian wild ruminants and strong cross-reaction between *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia tarandi*. *Vet Parasitol* 190:19–28.
- GUTIERREZ-EXPOSITO D, MARIA. C ARNALB, DAVID MARTINEZ-DURANB, JAVIER REGIDOR-CERRILLOA, MIGUEL REVILLA B, DANIEL L FERNANDEZ DE LUCOB, ALEJANDRO JIMENEZ-MELENDEZA, RAFAEL CALERO-BERNALC, MIGUEL ANGEL HABELAC, IGNACIO GARCIA-BOCANEGRAD, ANTONIO ARENAS-MONTESD, LUIS. M ORTEGA-MORAA, GEMA ALVAREZ-GARCIAA, (2016). The role of wild ruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Veterinary Parasitology* 223, 7–13.
- HAIRGROVE, T.B., CRAIG, T.M., BUDKE, C.M., RODGERS, S.J., GILL, R.J., (2014). Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in Texas Cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 116: 188-192.
- HAN S, NORIMINE J, BRAYTON KA, PALMER GH, SCOLES GA, BROWN WC (2010). *Anaplasma marginale* infection with persistent high-load bacteremia induces a dysfunctional memory CD4+ T lymphocyte response but sustained high IgG titers. *Clin. Vaccine Immunol.* 17: 1881-1890.
- HENRY, E.T., NORMAN, B.B., FLY, D.E., WICHMANN, R.W., YORK, S.M., (1983). Effects and use of a modified live *Anaplasma marginale* vaccine in beef heifers in California. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183, 66-69.
- HERRERO M.V., PEREZ E., GOFF W.L., TORIONI DE ECHAIDE S., KNOWLES D.P., MCELWAIN T.F., ALVAREZ V., BUENING G.M., (1998), Prospective study for the detection of *A. marginale* theiler 1911 in costa rica, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 849, 226–233.
- HORNOK S, FEDÁK A, BASKA F, BASSO W, DENCŐ L, TÓTH G, SZEREDI L, ABONYI T, DÉNES B (2015). Vector-borne transmission of *Besnoitia besnoiti* by blood-sucking and *secretophagous flies*: epidemiological and clinicopathological implications. *Parasitol Vector* 8:450. doi: 10.1186/s13071-015-1058-0.
- HORNOK, S., ESTOK, P., KOVATS, D., FLAISZ, B., TAKACS, N., SZOKE, K., KRAWCZYK, A., KONTSCHAN, J., GYURANECZ, M., FEDAK, A., FARKAS, R., HAARSMA, A.-J. & SPRONG, H. (2015a). Screening of bat faeces for arthropod-borne apicomplexan protozoa: *Babesia canis* and *Besnoitia besnoiti*-like sequences from Chiroptera. *Parasites & Vectors* 8, 441.
- HORNOK, S., FÖLDVARI, G., ELEK, V., NARANJO, V., FARKAS, R., DE LA FUENTE, J., (2008). Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial

- endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 154: 354-359.
- HORNOK, S., MICSUTKA, A., FERNANDEZ DE MERA, I.G., MELI, M.L., GONCZI, E., TANCZOS, B., MANGOLD, A.J., FARKAS, R., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R., DE LA FUENTE, J., (2012). Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Research in veterinary science* 92, 30-35.
- HOWDEN, K.J., GEALE, D.W., (2010). An update on bovine anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) in Canada. *Can. Vet. J.* 51,837-840.
- HOWELL, J.M., UETI, M.W., PALMER, G.H., SCOLES, G.A., KNOWLES, D.P., (2007). Persistently infected calves as reservoirs for acquisition and transovarial transmission of *Babesia bovis* by *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Journal of clinical microbiology* 45, 3155-3159.
- HUNGERFORD L.L., SMITH R.D., (1997), Variations in seroprevalence and host factors for bovine anaplasmosis in Illinois, *Veterinary Research Communications*, 21, 9-18.
- JACQUIET P, LIENARD E, AND FRANC M (2010). Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Vet Parasitol*, 174 : 30-36.
- JACQUIET, P. et ALZIEU, J., (2009). A quand la besnoitiose au nord de la Loire ?. *Point vétérinaire* 40 (301), p. 11.
- JANITSCHKE K., DE VOS A., ET BIGALKE R. (1984). Serodiagnosis of bovine besnoitiosis by ELISA and immunofluorescence tests. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 51, 239–243.
- JEULAND S, (2010). Séroprévalence de la besnoitiose bovine dans deux foyers du Maine et Loire. Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes, 129p.
- JORGENSEN, W.K., BOCK, R.E., DE VOS, A.J., SHIELS, I.A., (1993). Sheep-adapted *Anaplasma marginale* maintains virulence for cattle. *Australian veterinary journal* 70, 192-193.
- K I ASHMAWY et S.S. ABU-AKKADA., (2014). Evidence for bovine besnoitiosis in Egypt—first serosurvey of *Besnoitia besnoiti* in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Trop Anim Health Prod* (2014) 46:519–522. DOI 10.1007/s11250-013-0522-0.
- KENNEIL, R., SHKAP, V., LEIBOVICH, B., ZWEYGARTH, E., PFISTER, K., RIBEIRO, M.F., PASSOS, L.M., (2013). Cross-Protection Between Geographically Distinct *Anaplasma marginale* Isolates Appears to be Constrained by Limited Antibody Responses. *Transboundary and emerging diseases* 60 Suppl 2, 97-104.
- KIESER, S.T., ERIKS, I.S., PALMER, G.H., (1990). Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infection and immunity* 58, 1117-1119.
- KNOWLES D., TORIONI DE ECHAIDE S, PALMER G., MCGUIRE T., STILLER D., MCELWAIN T, (1996), Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 Epitope Common to Tick and Erythrocyte Stages Identifies Persistently Infected Cattle, *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 2225-2230.
- KOCAN K M, BLOUIN E F, BARBET A F, (2000). Anaplasmosis control: Past, present, and future. *Ann. New York Acad. Sci.*; 916: 501-509.
- KOCAN K., DE LA FUENTE J., BLOUIN E., COETZEE J., EWING S.A., (2010), The natural history of *Anaplasma marginale*, *Veterinary Parasitology*, 167, 95–107
- KOCAN K., DE LA FUENTE J., GUGLIEMONE A., MELENDEZ R., (2003), Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle, *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 698–712.
- KOCAN KM, (1992), Recent advances in the biology of *Anaplasma spp.* in *Dermacentor andersoni* ticks. *Ann N Y Acad Sci* , 653:26-32.
- KOCAN KM, STILLER D, GOFF WL, CLAYPOOL PL, EDWARDS W, EWING SA, MCGUIRE TC, HAIR JA, BARRON SJ (1992) : Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am J Vet Res* , 53(4):499-507.
- KOCAN KM, VENABLE JH, HSU KC, BROCK WE, (1978), Ultrastructural

- localization of anaplasma antigens (Pawhuska isolate) with ferritin-conjugated antibody. *Am J Vet Res*, 39(7):1131-1135.
- KOCAN, K., DE LA FUENTE, J., STEP, D.L., BLOUIN, E., COETZEE, J.F., SIMPSON, K.M., GENOVA, S.G., J., B.M., (2010)a. Current Challenges of the Management and Epidemiology of Bovine Anaplasmosis. *The Bovine practitioner*. 44, 93-102.
- KOCAN, K.M., BLOUIN, E.F., BARBET, A.F., (2000). Anaplasmosis control. Past, present, and future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916, 501-509.
- KOCAN, K.M., DE LA FUENTE, J., (2003). Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. *Veterinary parasitology* 112, 295-305.
- KOCAN, K.M., DE LA FUENTE, J., BLOUIN, E.F and GARCIA-GARCIA, J.C.(2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, 129: S285-S300.
- KOCAN, K.M., GOFF, W.L., STILLER, D., CLAYPOOL, P.L., EDWARDS, W.S., EWING, A., HAIR, J.A and BARRON, S.J. (1992a). Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. *Journal of Medical Entomology*, 29: 657-668.
- KOCAN, K.M., HAIR, J.A., EWING, S.A., STRATTON, L.G., (1981). Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by *Dermacentor andersoni* Stiles and *Dermacentor variabilis* (Say). *American journal of veterinary research* 42, 15-18.
- KOCAN, K.M., STILLER, D., GOFF, W.L., CLAYPOOL, P.L., EDWARDS, W., EWING, S.A., McGUIRE, T.C., HAIR, J.A., and BARRON, S.J. (1992b). Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 53: 499-507.
- KORABECNA M. (2007). The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): its biological meaning and application in medical mycology. in *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, ed. Méndez-Vilas A., editor. (Badajoz: Formatex), 783-787.
- KUMI-DIAKA, J., WILSON, S., SANUSI, A., NJOKU, C.E. et OSORI, D.I., (1981). Bovine besnoitiosis and its effect on the male reproductive system. In : *Theriogenology*. 1981. Vol. 16, n° 5, p. 523-530.
- KUTTLER K.L. (1965). Serological survey of anaplasmosis incidence in East Africa, using the complement-fixation test. *Bulletin of Epizootiological Diseases in Africa*, 13 :257-262.
- KUTTLER, K.L., WINWARD, L.D., (1984). Serologic comparisons of 4 *Anaplasma* isolates as measured by the complement-fixation test. *Veterinary microbiology* 9, 181-186.
- KUTTLER, K.L., ZAUGG, J.L., JOHNSON, L.W., (1984). Serologic and clinical responses of preimmunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *American journal of veterinary research* 45, 2223-2226.
- L'HOSTIS, M. ; BASTIAN, S. ; CHAUVIN, A. (2009). Besnoitiose bovine en pays de la Loire, séroprévalence et hypothèses de diffusion entre élevages. *Proceeding des Journées Nationales des GTV Nantes*, 1205-1212.
- LEFEVRE P.C., BLANCOU J., (2003), Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail Europe et région chaude Vol 2 maladies bactériennes mycoses et maladies parasitaires, TEC & DOC EDITION.
- LEGRAND P, (2003). La besnoitiose bovine en Ariège. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 87p.
- LEGRAND P. (2003). La besnoitiose bovine en Ariège. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Université Paul Sabatier, 88.
- LENFANT F, (2013). Mise au point d'une technique de diagnostic par

immunofluorescence indirecte de la besnoitiose bovine a *Besnoitia besnoiti*. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse. 71p.

LENFANT, (2013). Mise au point d'une technique de diagnostic par immunofluorescence indirecte de la besnoitiose bovine a *Besnoitia besnoiti*. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Thèse : 2013 – TOU 3 – 4060. P50.

LESSER, M., BRAUN, U., DEPLAZES, P., GOTTSTEIN, B., HILBE, M. et BASSO, W., (2012). [First cases of besnoitiosis in cattle in Switzerland]. In: Schweizer Archiv Für Tierheilkunde. Vol. 154, n° 11, p. 469-474.

LEW, A.E., BOCK, R.E., MINCHIN, C.M. and MASAKA, S. (2002). A msp1  $\alpha$  polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. Veterinary Microbiology, 86: 325-335.

LIENARD E, SALEM A, GRISEZ C, PREVOT F, BERGEAUD JP, FRANC M, GOTTSTEIN B, ALZIEU JP, LAGALISSE Y, JACQUIET P, (2011). A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France. Vet Parasitol 177:20–27.

LIENARD E, SALEM A, JACQUIET P, GRISEZ C, PREVOT F, BLANCHARD B, BOUHSIRA E, ET FRANC M (2012). Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (LINNAEUS, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (HENRY, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). Parasitol Res, 112 : 479-486.

LOHR C.V., BRAYTON K.A., BARBET A.F., PALMER G.H., (2004), Characterization of the *Anaplasma marginale* msp2 locus and its synteny with the omp1/p30 loci of Ehrlichia chaffeensis and E. canis, Gene, 325, 115–121.

LORUSSO, V., WIJNVELD, M., MAJEKODUNMI, A.O., DONGKUM, C., FAJINMI, A., DOGO, A.G., THRUSFIELD, M., MUGENYI, A., VAUMOURIN, E., IGWEH, A.C., JONGEJAN, F., WELBURN, S.C., PICOZZI, K., (2016). Tick-borne pathogens of zoonotic and veterinary

importance in Nigerian cattle. Parasit. Vectors 9, 1–13. doi:10.1186/s13071-016-1504-7.

M'GHIRBI Y., BOUATTOUR A. (2009). Séroprévalences de *Babesia bovis* et de *Babesia bigemina* chez les bovins en Tunisie. Rev. Méd. Vét., 2009, 4, 209-214.

MADRUGA C., MARQUES A.P., LEALS C.R., CARVALHO C., ARAJO F., KESSLER R., (2000) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*, Pesquisa Veterinaria Brasileira, 20, 109-112.

MAKALA LH, MANGANI P, FUJISAKI K, NAGASAWA H, (2003). The current status of major tick borne diseases in Zambia. Vet Res 34:27–45.

MALDONADO, J., CORONADO, A., KOWALSKI, A., MEDINA, J., (2012). Evidencia molecular de transmisión transplacentaria d'*Anaplasma marginale* en becerros neonatos cebú de Venezuela. Zootecnia Tropical 30, 109-114.

MANUALI E., LEPRI E., SALAMIDA S., D'AVINO N., MANGILI P., VITELLOZZI G., GRELLONI V., ET FILIPPINI G. (2011). An outbreak of bovine besnoitiosis in beef cattle born in central Italy. Transbound. Emerg. Dis. 58, 464–467.

McCGAREY D., ALLRED D., (1994), Characterization of Hemagglutinating Components on the *Anaplasma marginale* Initial Body Surface and Identification of Possible Adhesins, Infection and Immunity, 62, 4587-4593.

MCCULLY R.M., BASSON P.A., VAN NIEKERK J.W., ET BIGALKE R.D. (1966). Observations on *Besnoitia* cysts in the cardiovascular system of some wild antelopes and domestic cattle. Onderstepoort J Vet Res 33, 245–276.

McGAREY D.J., BARBET A.F., PALMER G.H., McGUIRE T.C., ALLRED D.R., (1994), Putative Adhesins of *Anaplasma marginale*: Major Surface Polypeptides Ia and Ib, Infection and Immunity, 62, 4594-4601,

MEEUS P.F.M., BRAYTON K.A., PALMER G.H., BARBET A.F., (2003), Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly

- related paralogues of *Anaplasma marginale*, Molecular Microbiology, 47, 633–643.
- MEHLHORN, H., KLIMPEL, S., SCHEIN, E., HEYDORN, A.O., AL-QURAI SHY, S. et SELMAIR, J., (2009). Another African disease in Central Europa: Besnoitiosis of cattle. I. Light and electron microscopical study. In : Parasitology Research. Vol. 104, n° 4, p. 861-868.
- MILLER, J.G., (1956). The prevention and treatment of anaplasmosis. Annals of the New York Academy of Sciences 64, 49-55.
- MINJAUW B., MC LEOD A., (2003). Tick-borne diseases and poverty: the impact of ticks and tick-borne diseases on the livelihood of small scale and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. Research report, DFID Animal Health Programme. Edinburg: Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh,UK, 116 pages.
- MOURA, A.B., VIDOTTO, O., YAMAMURA, M.H., VIDOTTO, M.C., LUZ PEREIRA, A.B., (2003). Studies on the *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 infection in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) using 'nested' PCR. Brazil. J. Vet. Parasitol. 12, 27-32.
- MOURIER D. (2013). Étude rétrospective d'un foyer de Besnoitiose bovine dans le département de l'Ardèche : aspects épidémiologiques et cliniques. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon : Université Claude Bernard, 117.
- MUNDERLOH UG, LYNCH MJ, HERRON MJ, PALMER AT, KURTTI TJ, NELSON RD, GOODMAN JL, (2004), Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet Microbiol*, 101(1):53-64.
- MUSTAFA AÇICI, CENK SONER BÖLÜKBAŞ, GÖKMEN ZAFER PEKMEZCİ, ALI TÜMAY GÜRLER, ŞINASI UMUR, KADRI ZAFER KARAER, AYŞE ÇAKMAK, AYŞE SERPİL NALBANTOĞLU, CEVAT NİSBET, (2016). Seroepidemiological survey of bovine tick-borne infections in the Black Sea Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 40: 170-174. doi:10.3906/vet-1506-3.
- NARANJO V., RUIZ-FONZ F., HOFLE U., FERNANDEZ DE MERA I.G., VILLANUA D., ALMAZAN C., TORINA A., CARACAPPA S., KOCAN K.M., GORTAZAR C. & DE LA FUENTE J. (2006). Molecular epidemiology of human and bovine anaplasmosis in Southern Europe. *Annals of New York Academy of Sciences* 1078 : 95–99.
- NASIR A, LANYON SR, SCHARES G, ANDERSONML, REICHELMP, (2012). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* in South Australian beef and dairy cattle. *Vet Parasitol* 186:480–485.
- NEIMAR H., KOCAN K.M., (1997), The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a Mycoplasma. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, . 156, 287-291.
- NIELSEN K., SMITH P., GALL D., DE ESHAIDE S.T., WADNER G., DAJER A., (1996), Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera, *Veterinary Parasitology*, 67, 133-142.
- NJAGI O.N., NDARATHI C.M., NYAGA P.N., ET MUNGA L.K. (1998). An epidemic of besnoitiosis in cattle in Kenya. *Onderstepoort J Vet Res* 65, 133-136.
- NOAMAN V., SHAYAN P., (2010), A new PCR-RFLP method for detection of *Anaplasma marginale* based on 16S rRNA, *Veterinary Research Communication*, 34, 43–50.
- NOH S.M., BRAYTON K.A., BROWN W.C., NORIMINE J., MUNSKE G.R., DAVITT C.M., PALMER G.H., (2008), Composition of the Surface Proteome of *Anaplasma marginale* and Its Role in Protective Immunity Induced by Outer Membrane Immunization Infection and immunity, 76, 2219–2226.
- NOH S.M., BRAYTON K.A., KNOWLES D.P., AGNES J.T., DARK M.J., BROWN W.C., BASZLER T.V., PALMER G.H., (2006), Differential Expression and Sequence Conservation of the *Anaplasma marginale* msp2 Gene Superfamily Outer Membrane

Proteins, Infection and immunity, 74, 3471–3479.

NORVAL R.A.I., PERRY B.D., YOUNG A.S., (1992). The epidemiology of theileriosis in Africa. (eds), Academic Press, London., , pp.: 343-377.

OBERLE S.M., PALMER G.H., BARBET A.F., (1993), Expression and Immune Recognition of the Conserved MSP4 Outer Membrane Protein of *Anaplasma marginale* Infection and immunity, 61, 5245-5251.

ODONGO, D., KAMAU, L., SKILTON, R., MWAURA, S., NITSCH, C., MUSOKE, A., TARACHA, E., DAUBENBERGER, C., BISHOP, R., (2007). Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. Vaccine 25, 1287-1296.

OIE, (2008). Organisation mondiale de la santé animale. Manuel terrestre. Section 2.4. *Bovidae*. Chapitre 2.4.1. Anaplasmosse bovine. p 655 à p 666.

OIE, 2012: Bovine Anaplasmosis. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th Edition. Office International des Epizooties, Paris, Chapter 2.4.1.

OLA ABD-EL HUSSAIN et AGAAR GHYDA' A ABBAS JASSEM, (2015). Some molecular and sero – prevalence study of *Anaplasma marginale* in cattle in Wassit province. AL-Qadisiya Journal of Vet. Med. Sci. Vol. 14 No. 1.

OLIAS P., SCHADE B., ET MEHLHORN H. (2011). Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae). Infect. Genet. Evol. 11, 1564–1576.

PALMER G., BROWN W., RURANGIRWA F., (2000), Antigenic variation in the persistence and transmission of the *ehrlichia Anaplasma marginale*, Microbes and Infection, 2, 167–176

PALMER G.H., BARBET A.F., CANTOR G.H., McGUIRE T.C., (1989), Immunization of Cattle with the MSP-1 Surface Protein Complex Induces Protection against a

Structurally Variant *Anaplasma marginale* Isolate, Infection and immunity, 57, 3666-3669.

PALMER G.H., GAMAL EID G., BARBET A.F., McGUIRE T.C., McELWAIN T.F., (1996), The Immunoprotective *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Is Encoded by a Polymorphic Multigene Family, Infection and immunity, 62, 3808-3816.

PALMER GH, RURANGIRWA FR, KOCAN KM, BROWN WC (1999). Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. Parasitol. Today 15: 253-300.

PALMER, G.H., BRAYTON, K.A., (2013). Antigenic variation and transmission 1 fitness as drivers of bacterial strain structure1.

PALMER, G.H., OBERLE, S.M., BARBET, A.F., DAVIS, W.C., GOFF, W.L. and T. L. McGUIRE, T.L, (1989). Immunization with a 36-kilodalton surface protein induced protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. Infection and Immunity, 56: 1526–1531.

PAPADOPOULOS, E., ARSENOUS, G., PTOCHOS, S., KATSOULOS, P., OIKONOMOUS, G., KARATZIA, M.A., KARATZIA, H., (2014). First report of *Besnoitia besnoiti* seropositive cattle in Greece. J Hellenic Vet. Med. Soc; 65(2): 115-120.

PATZ J.A., GRACZYK T.K., GELLER N., VITTOR A.Y., (2000). Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. Int. J. Parasitol, 30, 1395-1405.

PONCET A.L. , (1987), Contribution a l'étude clinique de l'anaplasmosse bovine. Diagnostic différentiel avec les autres anémies des bovins. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard Lyon, 98p.

POTGIETER FT, (1996) Epidemiology of ticks and tick-borne diseases in eastern, central and southern Africa. In: Epidemiology of ticks and tick-borne diseases in South Africa: future research needs and priorities. Proceedings of a workshop held in Harare, 12–13 March, 1996. [http://www.ilri.org/infoserv/Webpub/fulldocs/Google\\_Inputs/9291460168.pdf](http://www.ilri.org/infoserv/Webpub/fulldocs/Google_Inputs/9291460168.pdf). Accessed 22 April 2015.

- POTGIETER, F.T. (1981). Tick transmission of anaplasmosis in South Africa. *In Proceedings of the International Conference on Tick Biology and Control*, 27–29 January 1981, Grahamstown, South Africa. 53–56.
- POTGIETER, F.T. et STOLTSZ, W.H. (2000). Bovine anaplasmosis, in *Infectious diseases of livestock*, 2<sup>nd</sup> ed., edited by J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin. Cape Town: Oxford University Press.
- RADOSTITS, O. M., C. C. GAY, K. W. HINCHCLIFF et P. D. Constable, (2007): *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*, 10<sup>th</sup> edn. Elsevier Saunders, New York.
- RADWAN M., ABD EL FATAH, ABD EL HAMIED O., (2013), Epidemiological studies, molecular diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle and biochemical changes associated with it in Kaliobia Governorate, *Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2, 041-046..
- RAGAB M. FEREIG SAMY G.A. MOHAMED HASSAN Y.A.H. MAHMOUD MAHMOUD REZK ABOULAILA AZIRWAN GUSWANTO THU-THUY NGUYEN ADEL ELSAYED AHMED MOHAMED NOBORU INOUE IKUO IGARASHI YOSHIFUMI NISHIKAWA PHD, (2016). Seroprevalence of *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Trypanosoma evansi*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle in southern Egypt. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ttbdis.2016.10.08>.
- RAHALI T \* H. SAHIBI A. SADAK S. AIT HAMOU B. LOSSON W.L. GOFF A. RHALEM, (2014). Séroprévalence et facteurs de risque des hémoparasitoses (theilériose, babésiose et anaplasmosis) chez les bovins dans quatre grandes régions d'élevage du Maroc. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 67 (4) : 235-240.
- RASULOV I., (2007). Ticks status in Central Asia with a special emphasis on Uzbekistan. *Parasitol. Res.*, 101 (Suppl. 2), S183-S186.
- REES, C.W., AVERY, J.L., (1939). Experiments on the hereditary transmission of anaplasmosis by ticks. *North American Veterinarian*, 35-36.
- REINBOLD, J.B., COETZEE, J.F., HOLLIS, L.C., NICKELL, J.S., RIEGEL, C., OLSON, K.C., GANTA, R.R., (2010). The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infection. *Veterinary microbiology* 145, 69-75.
- RENAUD, T. (2004). Parasitologie. La besnoitiose bovine. *Action Vétérinaire*, (1683), 13-15.
- REY VALEIRON, C., ASO, P.M., CORONADO, A., (2003). Prevalence of *Anaplasma marginale* and specific antibodies in new born calves. *Acta científica venezolana* 54, 121-126.
- REYNA-BELLO A., CLOECKAERT A., VIZCAINO N., GONZATTI M.I., ASO P.M., DUBRAY G., ZYGMUNT M.S., (1998), Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela, *Clinical and Diagnostic laboratory immunology*, 5, 259–262.
- RIBEIRO, M.F., LIMA, J.D., (1996). Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Veterinary parasitology* 61, 31-39.
- RICHEY, E. J., (1991): Bovine anaplasmosis. *Proceedings of the 24th Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners*, Orlando, FL, 3–11.
- RICHEY, E. J., et G. H. PALMER, (1990): Bovine anaplasmosis. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 12, 1661–1668.
- RIKIHISAY., KAWAHARA M., WEN B., KOCIBA G., FUERST P., KAWAMORI F., SUTO C., SHIBATA S., FUTOHASHI M., (1997), Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *Journal of Clinical Microbiologie*, 35, 823-829.
- RINALDI L, MAURELLI MP, MUSELLAV, BOSCO A, CORTES H, CRINGOLI G, (2013). First cross-sectional serological survey on

- Besnoitia besnoiti* in cattle in Italy. Parasitol Res 112:1805–1807.
- RISTIC, M., CARSON, C.A., (1977). Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. Advances in experimental medicine and biology 93, 151-188.
- RODHAIN, F., (2015). Les insectes comme vecteurs : systématique et biologie. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 2015, 34 (1), 67-82.
- ROGERS, R.J., DIMMOCK, C.K., DE VOS, A.J., RODWELL, B.J., (1988). Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis. Australian veterinary journal 65, 285-287.
- ROMAND S, THULLIEZ P, DUBEY JP (1997). Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. Parasitol Res, 80 : 50-53.
- ROSTAHER A., MUELLER R.S., MAJZOUB M., SCHARES G., ET GOLLNICK N.S. (2010). Bovine besnoitiosis in Germany. Vet. Dermatol. 21, 329–334.
- ROUX V., BERGOIN M., LAMAZE N., RAOULT D., (1997), Reassessment of the taxonomic position of *Rickettsiella grylli*., International Journal of Systematic Bacteriology, 47, 1255-1257.
- RYAN EG, LEE A, CARTY C, O'SHAUGHNESSY J, KELLY P, CASSIDY JP, SHEEHAN M, JOHNSON A, DE WAAL T (2016) Bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in an Irish dairy herd. Vet Rec 178:608.
- SAHIBI H., RHALEM A., (2007). Tiques et maladies transmises par les tiques chez les bovins au Maroc. Transfert de technologie en agriculture. Bull. Inf. Liaison PNTTA, 151 : 1-4.
- SAHUN S. (1998). La besnoitiose bovine en France : mise au point d'un test Elisa et enquête sur le terrain. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Université Paul Sabatier, 114p.
- SAHUN, S. (1998). La besnoitiose bovine en France : mise au point d'un test ELISA et enquête sur le terrain. Thèse de Doctorat Vétérinaire (Toulouse), 106p.
- SALIH D.A., RAHMAN M.B.A., MOHAMMED A.S., AHMED R., KAMAL S., EI-HUSSEIN A.M. (2009). Seroprevalence of tick-borne diseases among cattle in the Sudan. Parasitol. Res., 104, 845-850.
- SÁNDOR HORNOK, ANDRÁS FEDÁK, FERENC BASKA, WALTER BASSO, LÁSZLÓ DENCŐ, GERGELY TÓTH, LEVENTE SZEREDI, TAMÁS ABONYI AND BÉLA DÉNES, (2015). Vector-borne transmission of *Besnoitia besnoiti* by blood-sucking and *secretophagous* flies: epidemiological and clinicopathological implications. Parasites & Vectors, DOI 10.1186/s13071-015-1058-0.
- SANNUSI, A. (1991). A simple field diagnostic smear test for bovine besnoitiosis. Vet. Parasitol. 39, 185–188.
- SCHARES G., BASSO W., MAJZOUB M., CORTES H.C.E., ROSTAHER A., SELMAIR J., HERMANN S. W., CONRATHS F.J., ET GOLLNICK N.S. (2009) First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. Vet. Parasitol. 163, 315–322.
- SCHARES G., BASSO W., MAJZOUB M., ROSTAHER A., SCHARR J.C., LANGENMAYER M.C., SELMAIR J., DUBEY J.P., CORTES H.C., CONRATHS F.J. (2010). Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. Vet. Parasitol. 171, 32–40.
- SCHARES G., BASSO W., MAJZOUB M., ROSTAHER A., SCHARR J.C., LANGENMAYER M.C., SELMAIR J., DUBEY J.P., CORTES H.C., CONRATHS F.J. (2011). Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. Vet. Parasitol. 175, 52–59.
- SCHARES G., LANGENMAYER M.C., SCHARR J.C., MINKE L., MAKSIMOV P., MAKSIMOV A., SCHARES S., BÄRWALD A., BASSO W., DUBEY J.P. (2013). Novel tools for the diagnosis and differentiation of

- acute and chronic bovine besnoitiosis. *Int. J. Parasitol.* 43, 143–154.
- SCHARES G., MAKSIMOV A., BASSO W., MORE G., DUBEY J.P., ROSENTHAL B., MAJZOUB M., ROSTAHER A., SELMAIR J., LANGENMAYER M.C. (2011b). Quantitative real time polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Vet. Parasitol.* 178, 208–216.
- SCHARES, G., BASSO, W., MAJZOUB, M., ROSTAHER, A., SCHARR, J.C., LANGENMAYER, M.C., SELMAIR, J., BUBEY, J.P., CORTES, H.C., CONRATHS, F.J., HAUPT, T., PÜRRO, M., RAEBER, A., BULHOLZER, P., GOLLNICK, N.S., (2011a). Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. *Vet. Parasitol.* 175, 52–59.
- SCHARES, G., LANGENMAYER, M.C., SCHARR, J.C., MINKE, L., MAKSIMOV, P., MAKSIMOV, A., SCHARES, S., BÄRWALD, A., BASSO, W., DUBEY, J.P., CONRATHS, F.J., GOLLNICK, N.S., (2013). Novel tools for the diagnosis and differentiation of acute and chronic bovine besnoitiosis. *Int. J. Parasitol.* 43, 143–154.
- SHKAP V. ; PIPANO E. ; MARCUS S. ; KRIGEL Y. (1994). Bovine besnoitiosis : transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 61, 273-275.
- SHKAP V., DE WAAL D.T., ET POTGIETER F.T. (1985). Chemotherapy of experimental *Besnoitia besnoiti* infection in rabbits. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 52, 289.
- SHKAP V., PIPANO E., ET GREENBLATT C. (1987) *Besnoitia besnoiti*: chemotherapeutic trials in vivo and in vitro. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 40, 259–264.
- SHKAP V., PIPANO E., MARCUS S., ET KRIGEL Y. (1994). Bovine besnoitiosis: transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 61, 273-275.
- SHKAP V., RESKE A., PIPANO E., FISH L., ET BASZLER T. (2002). Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Vet. Parasitol.* 106, 35–43.
- SHKAP V., UNGAR-WARON H., PIPANO E., ET GREENBLATT C. (1984). Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 16, 233–238.
- SHKAP, V., KOCAN, K., MOLAD, T., MAZUZ, M., LEIBOVICH, B., KRIGEL, Y., MICHAYTCHENKO, A., BLOUIN, E, DE LA FUENTE, J., SAMISH, M., MTSHALI, M., ZWEYGARTH, E., FLEIDEROVICH, E.L. and FISH, L. (2009). Experimental transmission of field *Anaplasma marginale* and the *A. centrale* vaccine strain by *Hyalomma excavatum*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks. *Veterinary Microbiology*, 134: 254-260.
- SJ SAMBO, NDG IBRAHIM, KAN ESIEVO ,HM KAZEEM, (2014).Prevalence of *Besnoitia besnoiti* antibodies in bovine sera and milk in Northern Nigeria. *Sambo et al/Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 12(1): 29-35. <http://dx.doi.org/10.4314/sokjvs.v12i1.5>.
- STICH, R.W., KOCAN, K.M., PALMER, G.H., EWING, S.A., HAIR, J.A., BARRON, S.J., (1989). Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *American journal of veterinary research* 50, 1377-1380.
- STRIK, N. I., ALLEMAN, A.R., BARBET, A.F., SORENSON, WAMSLEY, H.L., GASCHEN, F.P., LUCKSCHANDER, N., WONG, S., CHU, F., FOLEY, J.E., BJOERSDORFF, A., STUEN, S. and KNOWLES, D.P. (2007). Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clinical Vaccine Immunology*, 14: 262–268.
- SUTHERST R.W, (2004). Global change and human vulnerability to vector- borne diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, 17, 136-173.
- TARTERA, P. (2001). La besnoitiose bovine. *Action vétérinaire*, 1547, 17-20.
- TASSI P, CARELLI G, CECI L, (2002). Tick-borne diseases (TBDs) of dairy cows in a

- Mediterranean environment: a clinical serological and hematological study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 969:314-316.
- TEBELE N., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., (1991), Induction of Protective Immunity by Using *Anaplasma marginale* Initial Body Membranes, *Infection and Immunity*, Vol.59, 3199-3204.
- TENTER AM and JOHNSON AM, (1997). Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Adv Parasit*, 39 : 69-139.
- THOMAS C, (2007). La besnoitiose bovine, données bibliographiques. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse: Université Paul Sabatier, 134.
- THOMAS HAIRGROVE MEGAN E. SCHROEDER CHRISTINE M. BUDKE SANDY RODGERS CHUNGWON CHUNG MASSARO W. UETI MANGKEY A. BOUNPHENG, (2014). Molecular and serological in-herd prevalence of *Anaplasma marginale* infection in Texas cattle. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.prevetmed.2015.02.006>.
- THOMAS, C. (2007). La besnoitiose bovine, données bibliographiques. Thèse de Doctorat Vétérinaire (Toulouse), 132p.
- TORINA A., AGNONE A., BLANDA V., ALONGI A., D'AGOSTINO R., CARACAPPA S., MARINO A., DI MARCO V., DE LA FUENTE J, (2012), Development and validation of two PCR tests for the detection of and differentiation between *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale*, *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3, 282– 286.
- TORINA, A., ALONGI, A., NARANJO, V., ESTRADA-PENA, A., VICENTE, J., SCIMECA, S., MARINO, A.M., SALINA, F., CARACAPPA, S., DE LA FUENTE, J., (2008). Prevalence and genotypes of *Anaplasma* species and habitat suitability for ticks in a Mediterranean ecosystem. *Applied and environmental microbiology* 74, 7578-7584.
- TORINA,A., ALONGI,A., NARANJO,V., SCIMECA,S., NICOSIA, S.,DI MARCO,V., CARACAPPA,S., KOCAN, K. M., DE LA FUENTE J., (2008)b, Characterization of *Anaplasma* infections in Sicily, Italy. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases, Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149: 90-93.
- TORIONI DE ECHAIDE S., KNOWLES D.P., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., SUAREZ C.E., MCELWAIN T.F., (1998), Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5, *Journal of clinical microbiology*, 36, 777-782.
- TRINH A.D.T. (2002). Etude expérimentale de la réinfection par le protozoaire parasite *Toxoplasma gondii*. Thèse de doctorat en biologie. Nancy : Université Henri Poincaré, 250
- TSHILENGE G.M., BALOWA L.K, TSHINGUTA C.L, MANDE J.M, BHA G.N, EGALA A.N, NDADI V.N, MUKALAKATA T.N, MADIMBA C.Y.K, MPIANA S.T, SUMBU WA LANDILA J, KAZADI E.K. (2015). Séroprévalence de l'*Anaplasma marginale* chez le Bovin en République Démocratique du Congo. ISSN: 2410-4299, an International Journal.
- TUO W., PALMER G.H., MCGUIRE T.C., ZHU D., BROWN W.C., (2002), Interleukin-12 as an Adjuvant Promotes Immunoglobulin G and Type 1 Cytokine Recall Responses to Major Surface Protein 2 of the Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale*, *Infection and immunity*, 68, 270-280.
- UETI MW, REAGAN JO, JR., KNOWLES DP, JR., SCOLES GA, SHKAP V, PALMER GH (2007): Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 2007, 75(6):2959-2964.
- UZEDA RS, ANDRADE MR, CORBELLINI LG, ANTONELLO AM, VOGEL FS, GONDIM LF, (2014). Frequency of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in Brazilian cattle. *Vet Parasitol* 199(3–4):242–246.
- VALERIA MEDEIROS DE MENDONÇA COSTA; MUCIO FLAVIO BARBOSA

- RIBEIRO; AMELIA LIZZIANE LEITE DUARTE; JULIA MARRY MANGUEIRA; ANDRE FLAVIO ALMEIDA PESSOA; SERGIO SANTOS AZEVEDO; ANTONIO THADEU MEDEIROS DE BARROS; FRANKLIN RIET-CORREA; MARCELO BAHIA LABRUNA. (2013). Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region, *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal*. 22 (2) : 207-213.
- VANHOUDT. A, B. PARDON, P. DE SCHUTTER, L. BOSSELER, C. SARRE, J. VERCRUYSSSE, P. DEPREZ, (2015). First confirmed case of bovine besnoitiosis in an imported bull in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2015, 84.
- VARGAS, M., MONTERO, C., SANCHEZ, D., PEREZ, D., VALDES, M., ALFONSO, A., JOGLAR, M., MACHADO, H., RODRIGUEZ, E., MENDEZ, L., LLEONART, R., SUAREZ, M., FERNANDEZ, E., ESTRADA, M.P., RODRIGUEZ-MALLON, A., FARNOS, O., (2010). Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavacplus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC veterinary research* 6, 43.
- VIDOTTO, M.C., MCGUIRE, T.C., MCELWAIN, T.F., PALMER, G.H., KNOWLES, D.P., JR. (1994). Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun*, 62(7), 2940-6.
- VIRESHAKUL N., KAMPER S., BOWIE M.V., BARBET A.F., (2000), Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale* Gene , 253, 45-53.
- VISSER, E. S., MCGUIRE, T.C., PALMER, G.H., DAVIS, W.C., SHKAP, V., PIPANO, E. and KNOWLES, D.P.J. (1992). The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection and Immunity*, 60: 5139-5144.
- WAAP H., CARDOSO R., MARCELINO E., MALTA J., CORTES H., ET LEITÃO A. (2011). A modified agglutination test for the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection. *Vet. Parasitol.* 178, 217-222.
- WALLACE, J.O., HOLLIS, L.C., REINHARDT, C.D., COETZEE, J.F., RENTER, D.G., LLEWELLYN, D., MARSTON, T.T., (2007). Failure to Eliminate the *Anaplasma marginale* Carrier State in Beef Cows Following Multiple Treatments with Long-acting Injectable Oxytetracycline. *The Bovine practitioner*. 41, 84-87.
- YU X.J., ZHANG X.F., MCBRIDE J.W., ZHANG Y., WALKER D.H., (2001), Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and 'Ehrlichia platys' to other Ehrlichia species determined by GroEL amino acid sequences, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1143-1146.
- ZAHANG, L., WANG, Y., CAI, D., HE, G., CHENG, Z., LIU, J., MENG, K., YANG, D., WANG, S., (2013). Detection of *Anaplasma marginale* in *Hyalomma asiaticum* ticks by PCR assay. *Parasitology research* 112, 2697-2702.
- ZAUGG, J.L., (1985). Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *American journal of veterinary research* 46, 570-572.
- ZIAM H., BENAOUF H. (2004) : Prevalence of blood parasites in cattle from wilayates of Annaba and El Tarf East Algeria. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 81, 27-29.
- ZIAM. H, A. ABABOU, J.M. KAZADI, KH. HARHOURA, M. AISSI, D. GEYSEN, D. BERKVENNS, (2003). Prévalences et signes cliniques associés des piroplasmoses bovines dans les Wilayates d'Annaba et El Tarf, Algérie. *Revue Méd. Vét.* 167, 9-10, 241-249.
- ZIVKOVIC, Z., NIJHOF, A.M., DE LA FUENTE, J., KOCAN, K.M., JONGEJAN, F., (2007). Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male Dermacentor reticulatus. *BMC veterinary research* 3, 32.
- ZORICA ŽIVKOVIC, (2010). Tick-pathogen interactions in bovine anaplasmosis, ter

verkrijging van de grad van doctor aan de  
Universiteit Utrecht op gezag. ISBN 978-90-

393-5298-4.

# **ANNEXE**

# Annexe 1: Fiche de renseignement

Commune :

Code de la ferme : .....

## 1. Identification de l'animal

Numéro d'identification : .....

Race : .....

Sexe.....

Age.....

Type de d'élevage .....

Origine :  locale  importée  croisée

## 2. Symptômes présents au moment du prélèvement (pour la besnoitiose)

Fièvre  Œdèmes  kystes oculaire ou vaginale

## 3. symptômes présents au moment du prélèvement (pour l'anaplasmose)

hyperthermie  ataxie  anorexie  
 anémie  Ictère  hémoglobinurie

Œdème des paturons  symptômes respiratoires  Antécédent d'avortement

## 4. Présence ou l'absence des arthropodes hématophages au moment du prélèvement

Oui  Non

## **Annexe 2 : Protocoles détaillés des tests sérologiques utilisés**

### **1. *Anaplasma marginale* :**

Test ELISA-c (Anaplasma Antibody Test Kit, cELISA, VMRD, Pullman, Washington, USA)

#### **- Réactifs du kit de diagnostic**

Une microplaque de 96-puits fixée avec l'antigène rMSP5,

Une plaque de 96-puits fixée pour l'absorption/transfert du sérum,

100 × l'anticorps monoclonal et le conjugué couplé à la peroxydase,

Solution de lavage 10× et du tampon de dilution pour le conjugué prêt à l'emploi,

Substrat et solution stop prêt à l'emploi,

Témoins positif et négatif.

#### **- Protocole**

1) Ajouter 70 µl du sérum non dilué à la plaque fixée pour l'absorption/transfert et incuber à température de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 30 min ;

2) Transférer 50 µl par puits de sérum absorbé à la plaque fixée avec l'antigène rMSP5 et incuber à température de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 60 min ;

3) Eliminer le sérum et laver la plaque 2 fois avec la solution de lavage diluée ;

4) Ajouter 50 µl/puits de l'anticorps monoclonal dilué et conjugué à la peroxydase à la plaque à laquelle a été fixée le rMSP5. Incuber à température de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 20 min ;

5) Eliminer l'anticorps monoclonal dilué et conjugué à la peroxydase et laver la plaque 4 fois avec la solution de lavage diluée ;

6) Ajouter 50 µl/puits de la solution substrat, couvrir la plaque avec une feuille et incuber 20 min à température de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  ;

7) Ajouter 50 µl/puits de solution stop à la solution substrat déjà dans les puits et tapoter le bord de la plaque pour mélanger doucement le mélange ;

8) Lire les plaques dans un lecteur à 620, 630 ou 650 nm.

#### **- Validation**

La moyenne de la densité optique (DO) du témoin négatif doit varier de 0,40 à 2,10. Le pourcentage d'inhibition du témoin positif doit être supérieur ou égal à 30 %.

### - Interprétation des résultats

Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$\% I = 100 [1 - DO \text{ de l'échantillon} \div \text{moyenne de la DO du témoin négatif}]$$

Les échantillons dont le pourcentage est inférieur à 30 % sont négatifs. Les échantillons dont le pourcentage est supérieur ou égal à 30 % sont positifs.



**Figure :** Réactifs de Kit cELISA, Anaplasma Antibody Test, VMRD



**Figure :** Lecteur utilisé pour la lecture des microplaques cELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Figure :** Plan de la microplaque cELISA

## 2. *Besnoitia besnoiti*

Test ELISA indirect, (ID Screen, Besnoitia indirect 2.0)

### - Réactifs du kit de diagnostic

Microplaques sensibilisées avec un antigène *Besnoitia besnoiti*

Conjugué concentré 10x

Contrôle positif

Contrôle négatif

Tampon de dilution 13

Tampon de dilution 3

Solution de lavage concentré (20x)

Solution de révélation

Solution d'arrêt

### - Protocole

3. Distribuer 90 ul de Tampon de dilution 13 dans chaque puits ;
4. Distribuer :
  - 10 ul de contrôle négatif dans les cupules A1, A2, B1 et B2
  - 10 ul de contrôle positif dans les cupules C1, C2, D1 et D2
  - 10 ul de chaque échantillon à tester dans les cupules restantes ;
3. incuber 45 min à 21°C ;
4. vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 ul de solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages ;
5. préparer le conjugué 1X en diluant le conjugué 10X au 1/10<sup>ème</sup> en Tampon de dilution 3 ;
6. distribuer 100 ul de conjugué 1X dans chaque cupule ;
7. incuber 30 minute à 21°C ;
8. vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 ul de solution de lavage ;
9. Distribuer 100 ul de révélation dans chaque cupule ;

10. incuber 15 min à 21°C à l'obscurité ;
11. distribuer 100 ul de solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction ;
12. mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

#### - Validation

Tous les calculs de validation et d'interprétation se font sur la valeur de la DO nette de chaque échantillon, obtenue comme suit :

$$\text{DO nette} = \text{DO colonne paire} - \text{DO colonne impaire}$$

Le test est validé si :

- la valeur moyenne de densité optique nette des contrôles positifs est supérieure à 0.350.
- le rapport entre la moyenne des contrôles positifs et la moyenne des contrôles négatifs est supérieur à 3. Pour ce calcul utiliser la valeur absolue de la DO nette du CN

#### - Interprétation des résultats

Pour chaque échantillon, calculer le pourcentage S/P :

$$\text{S/P\%} = \text{DO nette échantillon} / \text{DO nette CP} \times 100$$

Les échantillons présentant un S/P% :

- inférieur ou égale à 25% sont considérés comme négatifs ;
- compris entre 25% et 30% sont considérés comme douteux ;
- supérieur ou égale à 30% considérés comme positifs.



**Figure :** Réactifs de Kit *besnoitia* indirect