RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ÉCOLE NATIONALE SUPERIEURE VÉTÉRINAIRE - EL HARRACH
المدرسة الوطنية العليا للطب البيطري

MÉMOIRE DE MAGISTÈRE EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES
Option : Zoonoses Infectieuses ; Diagnostic et Thérapeutique

Thème

Contribution à l'étude des agents de rickettsioses et de bartonelloses chez les réservoirs animaux (chiens et chats errants) par des méthodes moléculaires (PCR) dans la région d'Alger

Présenté par : Dr. Amina BESSAS

Soutenu publiquement le : 19/04/2012

Le jury :

Président	**:**	**M. BENMEHDI**	**Professeur**	**(ENSV)**
Promoteur	**:**	**I. BITAM**	**Maitre de recherche**	**(IPA)**
Examinateurs	**:**	**M. AISSI**	**Professeur**	**(ENSV)**
		F. GHALMI	**Maitre de conférences**	**(ENSV)**
		A. MILA	**Maitre de conférences**	**(ENSV)**

Année Universitaire 2011-2012

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes parents,
pour leur amour indéfectible et leur soutien pendant
mes années d'études, que ce travail soit la preuve
de toute ma reconnaissance et de mon amour profond.

A mon frère Yacine et mes sœurs (Zohra, Nacira, Wahiba,
Fatima et Soumia), pour leur affection et cette unité
familiale formidable, pour leur présence constante à mes
côtés, leur écoute et leurs encouragements permanents.
Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères sentiments.

A mes beaux frères (Ahmed, Mustapha et Mohamed),
pour leur aimable assistance. Qu'ils voient
dans cet aboutissement le témoignage de ma gratitude.

A ma chère amie Sara pour son aide et son soutien moral
dans les moments les plus difficiles et surtout pour tous
les bons moments passés ensemble. Qu'elle trouve ici
l'expression de mon amitié sincère.

A tous les enseignants qui ont participé à ma formation.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie الله *le tout puissant de m'avoir donné la force et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

Je tiens à remercier tout particulièrement mon promoteur, Mr Bitam, qui m'a fait l'honneur d'encadrer ce travail et de me guider au cours de sa réalisation, en témoignage de son dynamisme et de son implication dans la recherche, j'exprime par ces quelques mots ma profonde reconnaissance.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements :

A Mme Benmahdi, Professeur à l'ENSV d'Alger, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ce mémoire, Hommages respectueux.

A Mme Aissi, Professeur à l'ENSV d'Alger, pour son soutien moral, ses *encouragements* et ses précieux conseils*.*

A Mme Ghalmi, Maître de conférences à l'ENSV d'Alger, qui m'a fait l'honneur d'accepter l'évaluation et la critique de ce travail. Qu'elle trouve ici ma reconnaissance pour sa participation.

A Mme Mila, Maître de conférences à l'ENSV d'Alger, qui a eu la bienveillance d'accepter de faire partie de mon jury.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de la partie expérimentale et tout particulièrement :

Au personnel du Laboratoire d'écologie des systèmes vectoriels de l'IPA : Mme Korba, Mr Kernif, Mlle Beneljouzi, Melle Malek, Melle Babouri, Mme Nehmar pour leur aide précieuse et leur disponibilité.

A l'ensemble du personnel de l'HURBAL et spécialement à Mme Saidi et Mme Zerouk pour avoir mis à ma disposition les chiens et les chats de la fourrière canine.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers Docteur Slimi, Spécialiste dans la lutte contre les zoonoses, au niveau du Ministère de la Santé, qui m'a énormément aidé dans ce travail.

A tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, au bon déroulement de cette étude.

Enfin, Je remercie toute l'équipe de la bibliothèque de l'ENSV, sans oublier toute la promotion de Magistère 2010.

RESUME

Les rickettsioses et les bartonelloses sont des maladies vectorielles, zoonotiques, qui prennent de plus en plus d'ampleur, surtout en santé publique. Leur réémergence dans notre pays est éventuellement due à l'apparition de nouveaux réservoirs animaux, abritant les agents pathogènes.

Ce travail contribue à l'étude des réservoirs de *Rickettsia spp*. et de *Bartonella spp*. dans la wilaya d'Alger. Pour cela, des rates ont été prélevées à partir de chiens et de chats de la fourrière canine d'El-Harrach puis analysées par la méthode d'amplification génique (PCR).

La PCR standard révèle que 2,86 % (1/35) des chiens sont infectés par *Rickettsia sp.* et 8 % (2/25) des chats sont positifs à *Bartonella sp*. La deuxième analyse moléculaire par la PCR en temps réel montre que les taux d'infection chez les chiens sont de 14.28% (5/35) pour *Rickettsia sp.* et 8.57 % (3/35) pour *Bartonella s*p., tandis que les taux de positivité chez les chats sont de 20 % (5/25) et de 8 % (2/25) pour pour *Bartonella s*p. et *Rickettsia sp.* respectivement.

Du point de vue épidémiologique, nos résultats suggèrent que les chiens et les chats peuvent être considérés comme hôtes sentinelles ou plutôt réservoirs de ces agents pathogènes, et jouent certainement un rôle dans la persistance de ces infections dans la nature.

Mots clés: *Rickettsia sp.*, *Bartonella sp.*, PCR en temps réel, chien, chat, rates, réservoir, Alger.

ABSTRACT

Rickettsiosis and bartonellosis are zoonotic and vector-borne diseases, which are increasingly taking a major scale, especially in public health. Their re-emergence in our country is possibly due to the appearance of new animal reservoirs, harboring pathogens.

This work contributes to the study of reservoirs of *Rickettsia spp*. and *Bartonella spp*. in the wilaya of Algiers. For that, the spleens were collected from stray dogs and cats in pound of El-Harrach and then analyzed using Polymerase Chain Reaction (PCR).

The standard PCR reveals that 2.86% (1/35) of dogs are infected with *Rickettsia sp.* and 8% (2/25) of cats are positives for *Bartonella sp.* The second molecular analysis by real-time PCR shows that infection rates in dogs are 14.28% (5/35) for *Rickettsia sp.* and 8.57% (3/35) for *Bartonella sp*., while the positivity rates in cats are 20% (5/25) and 8% (2/25) for *Bartonella sp.* and *Rickettsia sp.* respectively.

From the epidemiologic perspective, our results suggest that dogs and cats can be considered as sentinel hosts or rather reservoirs of these pathogens and certainly have a role in the persistence of these infections in nature.

Keywords: *Rickettsia sp*. *Bartonella sp*., real-time PCR, dog, cat, spleen, reservoir, Algiers.

ملخص

الريكتسيوز و البارتونلوز هي أمراض حيوانية المنشأ تنتقل عن طريق الحشرات والتي أصبحت تسبّب مشكلة هامة خاصة في مجال صحة الإنسان.

عودة ظهورها في بلادنا يدل ربّما على تواجد خزّانات حيوانية جديدة، والتي يمكنها إيواء مسببات هذه الأمراض.

هذا العمل يساهم في دراسة خزّان *ريكتسيا* و *بارتونلا* في ولاية الجزائر العاصمة ، لهذا الغرض قمنا بإستئصال الطحال من مجموعة من الكلاب والقطط الضّالة في محشرة الحيوانات بالحرّاش ومن ثم تحليل هذه العينات عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل.

النتائج التي تمّ الحصول عليها بواسطة التفاعل البوليميرازالكلاسيكي تشير أن 2.86٪ (35/1) من الكلاب مصابة *بريكتسيا* و 8٪ (25/2) من القطط مصابة *ببارتونلا*.

التحليل الجزيئي الثاني بواسطة التفاعل البوليميراز في الوقت الحقيقي يبين أن معدلات الإصابة لدى الكلاب هي 14.28٪ (35/5) و8.57 ٪ (35/3) بالنّسبة إلى *ريكتسيا* و *بارتونلا* على التّوالي.

في حين أن معدل الإيجابية عند القطط هو 20٪ (25/5) و 8٪ (25/2) بالنّسبة إلى *ريكتسيا* و *بارتونلا* على التوالي.

نتائجنا تشير إلى أنه يمكن اعتبار الكلاب والقطط دليلا أو بالأحرى خزانا لهذه الجراثيم و أنّها بالتأكيد تلعب دورا في بقاء هذهالأمراض في الطبيعة.

الكلمات الأسّاسية: *ريكتسيا*، *بارتونلا*، تفاعل البوليميرازالمتسلسل ،الكلاب ،القطط ،الطحال، الخزان ، الجزائر.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale…… 01

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les Rickettsioses

I. Généralités…….... 02

II. Historique…….... 02

III. Étude de l'agent causal…… 03

III.1. Taxonomie et classification des *Rickettsiaceae*……... 03

III.2. Bactériologie……..…….. 05

IV. Épidémiologie…….. 06

IV.1. Agents pathogènes…… 06

IV.2. Réservoirs…….…….. 06

IV.2.1. Infection par *Rickettsia conorii*…….. 07

IV.2.2. Infection par *Rickettsia rickettsii*……..... 09

IV.2.3. Infection par *Rickettsia felis*…….. 10

IV.2.4. Infection par *Rickettsia typhi*…… 12

IV.3. Vecteurs……. 12

IV.4. Mode de contamination……..…….. 13

V. Étude clinique……..……..... 14

V.1. Pathogénie……..…….. 14

V.2. Symptômes……..…… 15

V.2.1. Chez le chien……..……... 15

V.2.2. Chez le chat……..……. 16

VI. La maladie chez l'homme……..…….. 17

VI.1. La fièvre boutonneuse méditerranéenne (FBM) ……..... 17

VI.2. La fièvre pourprée des montagnes rocheuses (FPMR) …… 17

VI.3. Le typhus murin …….. 17

VI.4. La fièvre boutonneuse à puces……..…… 18

VII. Diagnostic…… 18
VII.1. Diagnostic clinique…… 18
VII.1.1. Chez l'homme…… 18
VII.1.2. Chez le chien…… 19
VII.1.3. Chez le chat…… 19
VII.2. Diagnostic expérimental…… 19
VII.2.1. Diagnostic direct…… 19
VII.2.1.1. Cultures…… 19
VII.2.1.2. Coloration de Gimenez…… 20
VII.2.1.3. Amplification génique par PCR…… 20
VII.2.2. Diagnostic indirect : sérologie…… 21
VII.2.2.1. Immunofluorescence indirecte (IFI) …… 21
VII.2.2.2. Western-Blot…… 21
VIII. Traitement et prophylaxie…… 22
VIII.1. Traitement…… 22
VIII.2. Prophylaxie…… 22
VIII.2.1. Éliminer les arthropodes vecteurs…… 22
VIII.2.2. Limiter les réservoirs potentiels…… 23
IX. Conclusion…… 23

Chapitre II : Les bartonelloses

I. Généralités…… 24
II. Historique…… 24
III. Étude de l'agent causal…… 25
III.1. Taxonomie…… 25
III.2. Bactériologie…… 25
IV. Épidémiologie…… 27
IV .1. Agents pathogènes…… 27
IV.2. Réservoirs…… 27
IV.2.1. Réservoir félin…… 27
IV.2.2. Réservoir canin…… 28
IV.2.3. Autres réservoirs…… 29
IV.3. Vecteurs…… 29
IV.4. Mode de transmission…… 31
IV.4.1. Chez l'homme…… 31
IV.4.2. Chez les réservoirs animaux…… 31

V. Étude clinique…….. 32
V.1. Pathogénie…….. 32
V.2. Symptômes…….. 34
V.2.1. Conséquences de l'infection chez les réservoirs…….. 34
V.2.2. Conséquences de l'infection chez les hôtes accidentels……... 35
VI. La maladie chez l'homme…….. 36
VII. Diagnostic…….. 37
VII.1. Diagnostic clinique…….. 37
VII.1.1. Chez l'homme…….. 37
VII.1.2. Chez les animaux domestiques…… 37
VII.2. Diagnostic expérimental…….. 38
VII.2.1. Diagnostic direct…….. 38
VII.2.1.1. Cultures…….. 38
VII.2.1.2. Colorations…….. 39
VII.2.1.3. Immunofluorescence directe…… 39
VII.2.1.4. Amplification génique par PCR…….. 40
VII.2.2. Diagnostic indirect…….. 40
VII.2.2.1. Immunofluorescence indirecte (IFI)…… 40
VII.2.2.2. Western-Blot…….. 41
VIII. Traitement et prophylaxie…….. 41
VIII.1. Traitement…….. 41
VIII.2. Prophylaxie…….. 42
IX. Conclusion…….. 42

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I : Matériels et Méthodes

MATERIELS…….. 43
I. Matériel biologique…….. 43
I.1. Lieu et période de l'étude…….. 43
I.1.1 Collecte de prélèvements…… 43
I.1.2 Analyse des prélèvements…….. 44
I.2. Population étudiée…….. 44
I.3. Type de prélèvements…….. 44
I.4. Fiche de renseignements…… 44

II. Matériel non biologique…… 44

METHODES…… 45

I. Technique de prélèvement…… 45

I.1. Rappel anatomique…… 45

I.2. Préparation de l'animal…… 45

I.3. Préparation du matériel…… 46

I.4. Prélèvement de la rate…… 46

II. Transport des échantillons…… 47

III. Conservation des organes…… 47

IV. Extraction d'ADN…… 48

IV.1. Principe…… 48

IV.2. Protocole d'extraction d'ADN sur les Tissus…… 48

V. La PCR Standard…… 54

V.1. Principe…… 54

V.2. Première étape : « La PCR proprement dite »…… 55

V.2.1. Préparation du mix…… 55

V.2.2. Ajout des échantillons d'ADN aux mix…… 60

V.2.3. Programmation du thermocycleur…… 61

V.3. Deuxième étape : Électrophorèse…… 64

V.3.1. Préparation du gel d'Agarose 1,5 %…… 64

V.3.2. Coulage des gels dans la cuve à électrophorèse horizontale…… 65

V.3.3. Dépôt des échantillons dans les puits du gel…… 67

V.3.4. Migration et visualisation de l'ADN…… 68

VI. LA PCR en temps réel…… 69

VI.1. Principe…… 69

VI.2. Protocol de la PCR en temps réel…… 71

VII. Analyse statistique…… 72

Chapitre II : Résultats

I. Les prélèvements analysés…… 73

II. Le contrôle de l'extraction…… 73

III. Résultats des analyses de laboratoire…… 74

III.1. Résultats obtenus par la PCR standard…… 74

III.1.1. Chez l'espèce canine…… 74

III.1.2. Chez l'espèce féline…… 76

III.2. Résultats obtenus par la PCR real time…… 77

IV. Interprétation des résultats obtenus par la PCR en temps réel…… 80
IV.1. Chez l'espèce canine……..……. 80
IV.1.1. Les résultats globaux…….... 80
IV.1.2. Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction du sexe des chiens…..80
IV.1.3. Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'âge des chiens…. 81
IV.1.4. Les observations cliniques sur les chiens…….. 82
IV.2. Chez l'espèce féline……..... 83
IV.2.1. Les résultats globaux……..… 83
IV.2.2. Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction du sexe des chats……83
IV.2.3. Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'âge des chats…... 84
IV.2.4. Les observations cliniques sur les chats……... 85
IV.3. Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'espèce animale…… 86

Chapitre III : Discussion

I. Résultats obtenus à partir du réservoir canin…….. 87
I.1. Résultats globaux……..…… 87
I.1.1. Recherche de *Rickettsia spp*.…….……...… 87
I.1.2. Recherche de *Bartonella spp*..……...…… 88
I.2. Résultats en fonction du sexe et de l'âge……..……...… 89
I.3. Résultats en fonction des signes cliniques……..…… 89

II. Résultats obtenus à partir du réservoir félin…….. 90
II.1. Résultats globaux……..……...…… 90
II.1.1. Recherche de *Bartonella spp*..……...…….. 90
II.1.2. Recherche de *Rickettsia spp*…….……..... 91
II.2. Résultats en fonction du sexe et de l'âge ……..……. 92
II.3. Résultats en fonction des signes cliniques ……..……...… 92

Conclusion et Perspectives…….... 94

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Correspondance entre la classification phénotypique des genres rickettsiens et la classification génétique par analyse du gène 16S ARNr…… 04

Figure 02 : *Rickettsia sp.* sous microscope électronique……... 05

Figure 03 : Pathogénie et cycle de transmission de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses……15

Figure 04 : *Rickettsies* en culture sur cellules L 929 (fibroblastes de souris)…..…….. 20

Figure 05 : Aspect des colonies de *Bartonella henselae*…….. 26

Figure 06 : *Bartonella bacilliformis* sous microscope électronique…….. 26

Figure 07 : Model d'évolution de l'infection par *Bartonella sp.* chez les hôtes réservoirs……... 33

Figure 08 : Évolution de la bactériémie après infection expérimentale d'un chat par *Bartonella henselae*……... 34

Figure 09 : Coloration de Gimenez de *B. henselae*…….. 39

Figure 10 : Présence de *B. henselae* dans les globules rouges de chat, révélés après immunofluorescence directe à l'aide d'un anticorps monoclonal……..…….….. 39

Figure 11 : Immunofluorescence indirecte positive pour *B. henselae* chez un patient atteint de maladie des griffes du chat……..... 41

Figure 12 : Anatomie interne de chien et de chat…….. 45

Figure 13* : Étapes de décontamination du matériel de prélèvement……. 46

Figure 14* : Étapes de prélèvements et transport des échantillons d'organes……. 47

Figure 15* : Identification et conservation des prélèvements d'organes……. 47

Figure 16* : Les réactifs du Kit QIA amp utilisés pour l'extraction d'ADN……... 49

Figure 17* : Décontamination aux UV du matériel d'extraction……. 49

Figure 18* : Étapes de préparation des échantillons de rates avant l'ajout des réactifs d'extraction…… 50

Figure 19* : Désinfection du matériel avec l'alcool…… 50

Figure 20* : Ajout de l'ATL et broyage des échantillons…… 50

Figure 21* : Ajout de la protéinase K…….. 51

Figure 22* : Incubation et centrifugation……. 51

Figure 23* : Ajout de AL……. 51

Figure 24* : Ajout de l'éthanol…… 52

Figure 25* : Versement dans le tube collecteur…… 52

Figure 26* : Ajout de AW1 et AW2……. 53

Figure 27* : Ajout de AE……. 53

Figure 28* : Récupération et conservation des échantillons d'ADN……... 54

Figure 29* : Décontamination aux UV du matériel utilisé pour le mix……... 55

Figure 30* : Préparation de la solution de dNTPs…….. 56

Figure 31* : Réactifs du Mix pour la PCR……... 58

Figure 32* : Étapes de préparation du mix…….. 58

Figure 33* : Codification des microtubes utilisés pour la PCR…… 59

Figure 34* : Distribution du mix dans les barrettes PCR (barrettes à 8)……. 60

Figure 35* : Ajout des échantillons d'ADN dans les tubes de barrettes PCR contenant le mix ……...….. 61

Figure 36* : Lancement de l'amplification dans le thermocycleur…….. 61

Figure 37* : Préparation du gel d'agarose de 1,5 %……. 65

Figure 38* : Ajout du BET……... 65

Figure 39* : Coulage du TBE 0,5X dans la cuve à migration……. 66

Figure 40* : Coulage du gel d'Agarose et la pose de la cuve horizontale à électrophorèse dans la cuve à migration……... 66

Figure 41* : Le dépôt des échantillons d'ADN et du MPM dans les micropuits du gel…….. 67

Figure 42* : Migration des échantillons dans le gel……. 68

Figure 43* : Visualisation des bandes d'ADN……. 69

Figure 44 : Les trois phases du signal fluorescent au cours d'une PCR en temps réel…….. 70

Figure 45 : Principe de quantification lors de la PCR en temps réel……. 71

Figure 46* : Équipement de PCR real time…….. 72

Figure 47* : Gel d'électrophorèse pour le contrôle de l'extraction d'ADN……...…... 73

Figure 48* : Gel de PCR de *Rickettsia sp*. (gène OmpA) sur des rates de chiens……..…… 74

Figure 49* : Gel de PCR de *Rickettsia sp*. (gène OmpA) sur des rates de chiens……..… 75

Figure 50* : Gel de PCR de *Bartonella sp*. (gène ITS) sur des rates de chiens……...…...75

Figure 51* : Gel de PCR de *Rickettsia sp*. (gène gltA) sur des rates de chats ……...… 76

Figure 52* : Gel de PCR de *Bartonella sp*. (gène ftsZ) sur les rates de chats……..…….. 76

Figure 53* : Les courbes illustrant l'amplification de l'ADN des témoins positifs de *Bartonella spp*. à différentes concentrations……...78

Figure 54* : Les courbes d'amplification obtenues par PCR real time des échantillons d'ADN positifs à *Bartonella spp.* qui correspondent aux résultats du tableau 09.……..… 78

Figure 55* : La courbe illustrant l'amplification de l'ADN du témoin positif de *Rickettsia spp*… 79

Figure 56* : Les courbes d'amplification obtenues par PCR real time des échantillons d'ADN positifs à *Bartonella spp.* qui correspondent aux résultats du tableau 10...…… 79

Figure 57 : Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction du sexe des chiens….. 81

Figure 58 : Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'âge des chiens…. 82

Figure 59 : Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction du sexe des chats…… 84

Figure 60 : Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'âge des chats...… 85

Figure 61 : Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'espèce animale.... 86

*** Photos personnelles faites par nos soins au cours de notre partie pratique pendant l'année 2011.**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Enquêtes de séroprévalence de l'infection canine à *Rickettsia conorii*……..….... 08

Tableau 02 : Enquêtes de séroprévalence de l'infection canine et féline à *Rickettsia felis*….……... 11

Tableau 03 : Les espèces de *Bartonella* détectées dans les puces collectées en Algérie……...… 30

Tableau 04 : Produits du mix…….…… 57

Tableau 05 : Volumes des produits du mix en utilisant le master mix…….. 59

Tableau 06 : Les amorces (primers) de l'ADN des bactéries recherchées……... 62

Tableau 07 : Programme du Thermocycleur des bactéries recherchées…….. 63

Tableau 08 : Amorces et sondes utilisées lors de la PCR en temps réel ……...……... 72

Tableau 09 : Résultats positives de *Bartonella spp.* chez les chiens et les chats par PCR real time…….…… 78

Tableau 10 : Résultats positives de *Rickettsia spp.* chez les chiens et les chats par PCR real time……. 79

Tableau 11 : Récapitulatifs des infections à *Rickettsia sp* chez les chiens par sexe……..... 80

Tableau 12 : Récapitulatifs des infections à *Bartonella sp* chez les chiens par sexe…… 80

Tableau 13 : Récapitulatifs des infections à *Rickettsia sp* par tranches d'âges chez les chiens…… 81

Tableau 14 : Récapitulatifs des infections à *Bartonella sp* par tranches d'âges chez les chiens…. 81

Tableau 15 : Les renseignements cliniques des chiens atteints de rickettsioses et de bartonelloses ……..... 82

Tableau 16 : Récapitulatifs des infections à *Rickettsia sp* chez les chats par sexe……. 83

Tableau 17 : Récapitulatifs des infections à *Bartonella sp* chez les chats par sexe……..…….. 83

Tableau 18 : Récapitulatifs des infections à *Rickettsia sp* par tranches d'âges chez les chats.…... 84

Tableau 19 : Récapitulatifs des infections à *Bartonella sp* par tranches d'âges chez les chats.…. 85

Tableau 20 : Les renseignements cliniques des chats atteints de rickettsioses et de bartonelloses……..…….... 85

Tableau 21 : Récapitulatifs des infections à *Rickettsia sp* en fonction de l'espèce animale …….... 86

Tableau 22 : Récapitulatifs des infections à *Bartonella sp* en fonction de l'espèce animale..... 86

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Adénine
ADN : Acide **D**ésoxyribo**N**ucléique
AE: Elution **B**uffer
AL : Lysis **B**uffer for DNA purification
ATL : Tissue **L**ysis buffer
AW: Wash **B**uffer
B* : *B*a****rtonella***
B. cl* : *B. cl*a****rridgeiae***
B. h* : *B. h*e****nselae***
BET : Bromure d'**Et**hidium
C : Cytosine
C. canis*: *C*t****enocephalides* *canis***
C. felis*: *C*t****enocephalides* *felis***
C° : degré **C**elsius
CNR: Centre **N**ational de **R**éférence
CSD: Cat **S**cratch **D**isease
dNTP : 2'-**d**ésoxyribose **N**ucléoside **T**ri**P**hosphate
dom. : domestique
EDTA : Ethylène-**D**iamine-**T**étr**A**cétate
ELISA : Enzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay
FBM : Fièvre **B**outonneuse **M**éditerranéenne
FC: Fixation du **C**omplément
FPMR : Fièvre **P**ourprée des **M**ontagnes **R**ocheuses
FtsZ : Cell Division Protein
g : gramme
G : Guanine
gltA ou CS : Citrate **S**ynthase
H.URB.AL : Hygiène **Urb**aine d'**Al**ger (Fourrière canine de Boumati, El-Harrach)
IF: Immuno**F**luorescence
IFI : Immuno**F**luorescence **I**ndirecte
IgG : Immuno**g**lobuline **G**
IgM : Immuno**g**lobuline **M**
IPA : Institut **P**asteur d'**A**lgérie
ITS : Intergenic Spacer Region
MgCl2 : Ch**l**orure de **M**a**g**nésium
mm : milli**m**ètre
MPM : Marqueur de **P**oids **M**oléculaire
N°: Numéro
nm : Nanomètre
OmpA : Surface Antigen
P : Primer
pB: paires de **B**ase
PCR : Polymérase **C**haîne **R**éaction
PM : Poids **M**oléculaire
R*: *R*i****ckettsia***
Rh. Sanguineus*: *Rh*i****picephalus* *sanguineus***
T- : Témoin négatif
T : Thymine
T+ : Témoin positif
TBE : Tris **B**orique acide **E**DTA
Tm : Température de **M**elting
tr / min : tou**r** par **min**ute
UV : Ultra**V**iolet
V : Volte
VEGF: Facteur de **C**roissance de l'**E**ndothélium **V**asculaire
VIH : Virus d'**I**mmunodéficience **H**umain
W : **W**att
X. cheopis*: *X*e****nopsylla* *cheopis***
µg : Microgramme
µl : Microlitre
µm : micromètre
% : pourcentage

INTRODUCTION

Les maladies vectorielles, zoonotiques, prennent de plus en plus de l'ampleur, surtout en santé publique (Shaw., et *al*., 2001). Ces maladies sont de plus en plus décrites en régions tempérées et dans les environnements urbains (Parola et Raoult, 2006). Ceci est en partie dû à l'augmentation de l'importance des vecteurs et particulièrement à l'apparition de nouveaux réservoirs abritant les agents pathogènes et probablement à cause des changements climatiques (Bitam et *al*., 2006; 2009b; 2010; Davoust et *al*., 2010).

Les animaux de compagnie notamment les chiens et les chats, développent des maladies sub-cliniques et deviennent des réservoirs potentiels. Parmi les agents affectant ces animaux, nous citons *Bartonella* (Boulouis et *al*., 2008; Kernif et *al*., 2010; Levy et *al*., 2011) et *Rickettsia* (Case et *al.*, 2006; Piranda et *al.*, 2008).

Des pathologies émergentes liées à ces bactéries sont régulièrement décrites, et de nouvelles espèces impliquées en pathologie humaine sont de plus en plus mises en évidence. Certaines maladies sont bénignes alors que d'autres peuvent mettre le pronostic vital en jeu (Renvoisé et Raoult, 2009). Récemment des nouvelles espèces de rickettsies et de bartonelles qui peuvent infecter l'homme sont détectées en Algérie (Benslimani et *al*., 2007; Mouffok et *al*., 2008; Bitam, 2008; Bitam et *al*., 2009a; 2011).

L'intérêt d'une bonne connaissance de ces maladies et leur réémergence dans notre pays, nous a amené à réaliser leur étude dans la région d'Alger.

Les objectifs de notre travail est de :

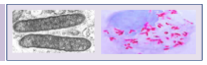
- Rechercher les agents de rickettsioses (*Rickettsia spp*. et *Bartonella spp*) chez les réservoirs animaux (chiens et chats errants), par la technique d'amplification génique (PCR).
- Et préciser le rôle exact des chiens et des chats dans l'épidémiologie des rickettsioses.

Ce présent mémoire comporte, en première partie, une revue bibliographique articulée en deux chapitres. Le premier fait le point des connaissances récentes sur les rickettsioses vraies, et le second, présente l'étude des bartonelloses. La deuxième partie du mémoire est consacrée à l'étude expérimentale portant sur la recherche des espèces de *Rickettsia* et de *Bartonella* chez les chats et les chiens. La méthodologie et le protocole utilisés dans notre essai seront d'abord, globalement décrits puis les résultats seront présentés et discutés.

Dans la conclusion générale, nous ferons le point des idées acquises au cours de cette étude et présenterons les perspectives qui en découlent.

1ère PARTIE
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
Les rickettsioses



I. GÉNÉRALITÉS

Les rickettsioses constituent un groupe de maladies infectieuses ré-émergentes, polymorphes, potentiellement mortelles et mondialement répandues (Kamrani et *al*., 2008). Elles sont responsables de maladies humaines ainsi que d'infections animales. Leur transmission est assurée par des arthropodes hématophages impliqués comme vecteurs et, dans certains cas, comme réservoirs de bactéries (Davoust et *al*., 2010).

L'aspect zoonotique de ces rickettsioses est souvent mal connu par rapport aux connaissances bien établies sur les vecteurs. Cent ans après la mise en évidence de l'agent du typhus (*Rickettsia typhi*) ayant comme réservoir le rat, il est important de faire un point des connaissances concernant le rôle des vertébrés, notamment les animaux domestiques, dans le cycle des rickettsies (Davoust et *al*., 2010).

II. HISTORIQUE

Les rickettsioses présentent le paradoxe de comprendre sous ce terme des maladies connues depuis plusieurs siècles, ainsi que des pathologies émergentes rapportées depuis peu (Renvoisé et Raoult, 2009).

Le genre *Rickettsia* est baptisé au nom de Howard Taylor Ricketts, qui a travaillé dessus en 1906 et curieusement mourut du typhus en 1910 (Raoult et Brouqui, 1998).

La fièvre boutonneuse méditerranéenne (FBM) a été décrite, pour la première fois en 1910 par Conor et Bruch en Tunisie (Conor et Bruch, 1910). C'est en 1932, que la tique brune du chien a été reconnue comme vecteur en Europe et qu'une rickettsie du groupe boutonneux a été découverte par Brumpt et nommée *Rickettsia conorii* en hommage au premier descripteur de la maladie (Brumpt, 1932).

Bien que la sensibilité des chiens aux *Rickettsia* ait été mise en évidence en 1933, les informations concernant la maladie ne sont apparues dans la littérature qu'en 1979 (Bitan, 2002).

En 2001, le premier génome d'une rickettsie transmise par les tiques (*Rickettsia conorii*) a été complètement séquencé (Raoult et Parola, 2007).

Plus récemment, plusieurs espèces sont déjà séquencées, on peut citer entre autres *R. rickettsii, R. typhi, R. massiliae, R. slovaca, R. africae, R. bellii* et *R. felis*; de nombreux travaux de séquençages des génomes sont en cours (Renvoisé et Raoult, 2009). Ces données vont certainement éclairer les mécanismes de la pathogénicité des rickettsies et fournir de nouvelles cibles moléculaires de diagnostic et de nouveaux outils pour les études taxonomiques et phylogénétiques ainsi que de nouvelles mesures thérapeutiques. Le séquençage permet aussi la détection du gène codant pour la résistance aux antibiotiques et la définition des conditions de culture (Raoult et Parola, 2007).

Au cours des dernières années, de nombreuses rickettsies de pathogénicité inconnue ont été isolées d'arthropodes à travers le monde. Ces bactéries doivent être considérées comme des potentiels pathogènes (Raoult et Brouqui, 1998).

III. ÉTUDE DE L'AGENT CAUSAL

III.1. Taxonomie et classification des *Rickettsiaceae*

La taxonomie des *Rickettsiaceae* est en plein remaniement suite à l'avènement des techniques de biologie moléculaires et à la découverte incessante de souches, d'espèces ou de nouveaux genres.

La taxonomie de ces bactéries reposait sur quelques critères phénotypiques incluant leur écologie, les données épidémiologiques, le pouvoir pathogène expérimental ou clinique, et sur le sérotypage (Raoult et Brouqui, 1998).

L'utilisation d'outils moléculaires a permis de mettre en place une nouvelle taxonomie des rickettsies basée sur les liens phylogéniques entre ces bactéries et l'ensemble du monde bactérien, qui a bouleversé les anciennes classifications (Raoult et Brouqui, 1998).

Certaines entités ont été renommées ou reclassées, c'est pourquoi il nous semble important de connaître l'ancienne et la nouvelle classification (Fig. 1).

L'ordre des *Rickettsiales* était historiquement devisé en trois familles : les *Rickettsiaceae*, les *Bartonellaceae* et les *Anaplasmaceae*.

La famille des *Rickettsiaceae* comprenait trois tribus : les *Rickettsiae*, les *Ehrlichiaeae* et les *Wolbachiaeae*.

La tribu des *Rickettsiae* était divisée en trois genres : *Rickettsia*, *Rochalimaea* et *Coxiella*.

D'après ces études moléculaires, les anciens genres rickettsiens sont maintenant répartis dans trois sous-groupes différents des *Protéobactéries* (alpha 1, alpha 2 et gamma), ce qui révèle bien leurs fortes disparités phylogénétiques (Brenner et *al*., 2005).

Ainsi, *Coxiella burnetii*, seule bactérie du genre *Coxiella*, agent de la fièvre Q, a été exclue de l'ordre des *Rickettsiales* car les séquences du gène du 16S ARNr se trouvaient être proches de celles des membres du sous-groupe gamma des protéobactéries, alors que les bactéries du genre *Rickettsia* appartenaient au sous-groupe alpha-1. D'autre part, le genre *Rochalimaea* a été récemment intégré au genre *Bartonella* de la famille des *Bartonellaceae* et le genre unifié a été exclu de l'ordre des *Rickettsiales* car ses membres étaient intégrés dans le sous-groupe alpha-2 des protéobactéries. Actuellement, la tribu des *Rickettsiae* ne comprend que les genres *Rickettsia* et *Orientia* (Raoult et Brouqui, 1998).

Les auteurs proposent que les « Tribus » des *Ehrlichieae* et des *Wolbachieae* soient transférées dans la famille des *Anaplasmataceae*, ne laissant que les *Rickettsieae* dans la famille des *Rickettsiaceae* ; le terme « Tribu » serait ainsi éliminé (Brenner et *al*., 2005).

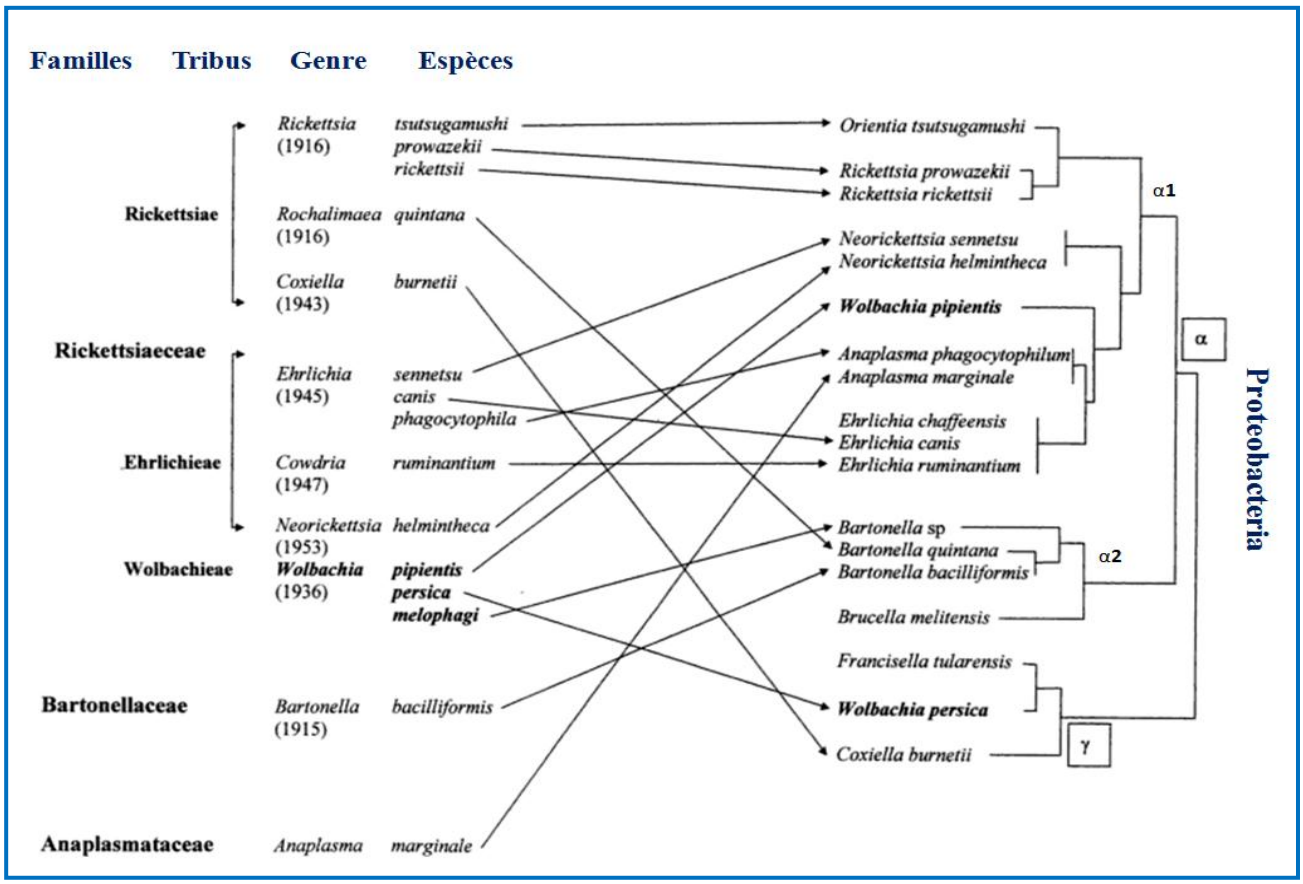


Fig. 1 : Correspondance entre la classification phénotypique des genres rickettsiens et la classification génétique par analyse du gène 16S ARNr (Brenner et *al*., 2005)

Actuellement, les bactéries du genre *Rickettsia* sont classées en deux génogroupes (**génogroupe typhus et géno-groupe boutonneux)** (Annexe 01), d'après les caractéristiques génétiques du gène codant pour la protéine de surface rOmpA. Quelques rickettsioses ne peuvent pas être classées dans ces deux génogroupes, parce qu'elles sont dues à des bactéries génétiquement différentes et que ces maladies sont cliniquement et épidémiologiquement distinctes des autres (Davoust et *al*., 2010).

L'étude des génomes des rickettsies, qui est un domaine prometteur de recherche, sera probablement à l'origine de nouveaux changements taxonomiques dans les prochaines années (Renvoisé et Raoult, 2009).

III.2. Bactériologie

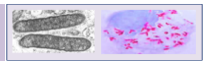
Les rickettsies sont des coccobacilles pléomorphiques immobiles de 0,3-0,5 X 0,8- 2,1 µm de longueur (Fig. 2). Leur structure est celle des bactéries à Gram négatif. Elles sont entourées par un glycocalyx ou *slime*. Ces bactéries **intracellulaires strictes** ne sont pas colorées par la coloration de Gram. La méthode de Gimenez utilisant la fuchsine basique et la coloration de Giemsa permettent de les mettre en évidence (Raoult et Brouqui, 1998; Parola et Raoult, 2001).

Ces bactéries, parasitant les cellules eucaryotes, ne peuvent pas être cultivées sur milieu synthétique. Elles sont cultivées sur des lignées cellulaires continues ou sur des oeufs de poule embryonnés (Davoust et *al*., 2010).

Actuellement, les *Rickettsia* sont produites sur cellules de rein de singe de type Véro pour les rickettsies du groupe boutonneux, à l'exception de *R. felis* qui est cultivée sur fibroblastes de crapauds de type XTC2, et sur fibroblastes murins de type L929 pour les rickettsies du groupe typhus (Raoult et Richet, 2010). Ces bactéries se multiplient par scissiparité (Fig. 2). La température optimale de croissance en culture est de 32°C pour les rickettsies du groupe boutonneux et 35°C pour le groupe typhus (Parola et Raoult, 2001; Bitan, 2002; Renvoisé et Raoult, 2009).

Le diagnostic des rickettsies est réalisé dans des laboratoires spécialisés disposant d'outils diagnostiques adaptés à l'étude des bactéries intracellulaires (Renvoisé et Raoult, 2009).

Fig. 2 : *Rickettsia sp.* sous microscope électronique (source Internet n° 1: http://www.ncagr.gov/oep/oneMedicine/noms/2010/Breitschwerdt_Edward_Spotted_Fever_Group_Rickettsioses.pdf)



IV. ÉPIDÉMIOLOGIE

IV.1. Agents pathogènes

Les *Rickettsia* du groupe boutonneux représentent une cause importante de maladies infectieuses ré-émergentes chez l'homme et le chien (Kidd et *al*., 2008). La fièvre pourprée des montagnes rocheuses (FPMR) causée par ***Rickettsia rickettsii***, est l'une des rickettsioses potentiellement fatale chez le chien et l'être humain aux USA. Or, la fièvre boutonneuse due à ***Rickettsia conorii***, touche les êtres humains dans le sud de l'Europe, en Afrique et surtout dans le pourtour méditerranéen, cette bactérie peut aussi infecter les chiens (Mumcuoglu et *al.*, 1993), mais les signes cliniques de la maladie chez ce dernier n'ont pas été rapportés (Shaw et *al*., 2001).

Bien que les chats et leurs parasites arthropodes puissent parfois être des sources importantes de maladies zoonotiques chez l'homme, le degré d'exposition des populations de chats à de nombreux agents de rickettsioses reste incomplètement décrit (Case et *al*., 2006).

Il est probable que de nombreuses pathologies humaines inexpliquées résultent en fait de rickettsioses encore méconnues (Raoult et Roux, 1997).

Nous aborderons les potentialités de développement de ces bactéries chez le chien et le chat, suspects d'être réservoirs d'agent causal de maladies humaines.

IV.2. Réservoirs

Dans l'épidémiologie des rickettsioses, on peut considérer deux partenaires qui sont réunis en une entité réservoir : l'animal vertébré et l'arthropode vecteur. Dans la majorité des cas, aucun des deux ne suffit à assurer la survie de la rickettsie sur le long terme. Le cycle associe nécessairement un réservoir habituel : l'arthropode vecteur et **un réservoir secondaire amplificateur et disséminateur : « l'animal vertébré ».**

La distribution géographique des rickettsioses dépend surtout de la distribution des vecteurs et de leurs hôtes. Elle est liée aux facteurs écologiques marquant des lieux et des moments donnés, en particulier à la densité des espèces réservoirs et au climat. L'écologie des rickettsioses est donc souvent spécifique de l'environnement (Davoust et *al*., 2010).

Pour qu'un animal devienne un réservoir d'une maladie vectorielle, il faut qu'il soit un hôte habituel de l'arthropode-vecteur, qu'il soit réceptif à la rickettsie et le critère principal réside dans le fait qu'il développe une rickettsémie assez longue pouvant infecter d'autres arthropodes.

L'infection de l'animal « bon réservoir » doit être asymptomatique et à l'origine d'une rickettsémie quantitativement élevée (Davoust et *al*., 2010).

Dans le cas des rickettsioses, on connaît bien les vecteurs de ces maladies mais la circulation des rickettsies dans l'environnement est souvent hypothétique. Cependant, pour répondre à la question: les animaux vertébrés sont-ils réservoirs de rickettsies ?, nous présenterons l'état des connaissances à ce sujet concernant les animaux domestiques (chien et chat), infection par infection.

IV.2.1. Infection par *Rickettsia conorii*

Le rôle vecteur de la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus* a été démontré par l'inoculation d'un broyat de tiques à l'homme. La transmission transovarienne ayant été prouvée, *Rh. sanguineus* a été longtemps considérée comme le réservoir de *R. conorii* (Davoust et *al*., 2010).

Des études récentes ont montré que les tiques *Rh. sanguineus* infectées expérimentalement par *R. conorii* meurent pour la plupart et qu'une proportion importante des tiques infectées naturellement ne survit pas après la première génération (Davoust et *al*., 2010). D'autre part la tique brune du chien a une répartition mondiale mais l'infection à *R. conorii* n'est observée que dans quelques régions de l'ancien monde. Ces faits suggèrent que les vertébrés pourraient avoir un rôle dominant dans la persistance de l'agent dans un écosystème donné (Davoust et *al*., 2010).

Le chien porteur de *Rh. sanguineus* infectés peut amener le vecteur dans l'environnement de son propriétaire. Il arrive aussi qu'il introduise l'infection d'un endroit à l'autre, lorsqu'il voyage en portant des tiques (Senneville et *al.*, 1991). Il joue alors un rôle épidémiologique de propagateur de l'infection (Alexandre et *al*., 2011). Par ailleurs, le chien infecté expérimentalement ne manifeste pas de symptôme et développe une rickettsémie faible et intermittente du 2^{eme} au 10^{eme} jour après l'inoculation (Kelly et *al.*, 1992). Une étude récente a prouvé que les chiens sont capables d'acquérir *R. conorii* à partir de tiques *Rh. sanguineus* infectés et de transmettre l'infection à un groupe de tiques non infectées (Levin et *al*., 2011).

Le chien pourrait être considéré comme un réservoir intermittent, forcément secondaire. Par contre, il est une bonne sentinelle de l'infection (Alexandre et *al*., 2011) . Les chiens errants fréquemment porteurs de *Rh. sanguineus* sont le plus souvent séropositifs. Des enquêtes de séroprévalence attestent de taux élevés (15 à 85%) chez cette espèce (Tableau 1). Elles montrent une corrélation entre les résultats et l'infestation par *Rh. sanguineus* ainsi que la répartition géographique de la FBM (Davoust et *al*., 2010).

Les hérissons et les petits rongeurs de l'ancien monde sont aussi suspects d'être des réservoirs de *R. conorii* (Davoust et *al*., 2010).

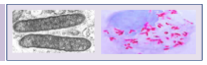
Le point essentiel relatif à l'épidémiologie de cette infection est qu'elle n'a jamais été décrite dans le nouveau monde, ce qui suggère que les réservoirs de *R. conorii* sont des animaux dont l'aire de répartition est limitée à l'ancien monde (Davoust et *al*., 2010).

Les résultats présentés dans le tableau suivant montrent que la sérologie canine pourrait être un indicateur sensible de la présence et l'ampleur de l'exposition humaine à *R. conorii* (Herrero et *al*., 1992; Alexandre et *al*., 2011).

Tableau 1: Enquêtes de séroprévalence de l'infection canine à *Rickettsia conorii*

Pays	Auteurs	Populations canines étudiées	Taux de séroprévalence (IFI) (%)
France	Raoult et *al.*, 1985	317 chiens militaires et 164 chiens civils, en bonne santé, du sud-est de la France	**80**
Portugal	Bacellar et *al.*, 1995	104 chiens de la fourrière de Setubal	**85,6**
Espagne	Segura-Porta et *al.*, 1998	138 chiens de la région de Barcelone	**26,1**
	Solano-Gallego et *al.*, 2006a	260 chiens du nord-est de l'Espagne	**56,4**
	Amasutegui et *al.*, 2008	479 chiens examinés en consultation chez un vétérinaire du nord-ouest de l'Espagne	**24,6**
	Amasutegui et *al.*, 2008	170 chiens de la fourrière de Ourense	**50**
	Ortuño et *al.*, 2009	130 chiens de la région de Barcelone	**53**
Italie	Davoust et *al*., 2010	116 chiens du Piémont (Cuneo)	**15,5**
	Torina et Caracappa, 2006	342 chiens de Sicile	**73,6**
Israël	Baneth et *al.*,1998	40 chiens suspects de maladies transmises par les tiques	**58**
	Harrus et *al.*, 2007	85 chiens	**81**
Croatie	Punda-Polic et *al.*, 1995	194 chiens	**62,4**
Tunisie	Parzy et *al.*, 1991	60 chiens militaires en bonne santé	**63,3**
Zimbabwe	Kelly et Mason, 1991	184 chiens	**82**

Une étude a montré que les sérums de chats, au Zimbabwe (n = 119) et à l'Afrique du Sud (n = 52), contiennent des anticorps réagissant contre *Rickettsia conorii* (34% et 19% respectivement). Ces résultats indiquent que les chats peuvent aussi être infectés par *Rickettsia conorii* et donc devenir des indicateurs de la présence de ces organismes (Matthewman et *al*., 1997).



IV.2.2. Infection par *Rickettsia rickettsii*

Howard Ricketts démontre que l'infection peut circuler entre les tiques et les mammifères. Il prouve que la bactérie se transmet chez la tique par voie transovarienne et trans-stadiale. Ce constat, fréquent pour les rickettsioses, est important (Annexe 01) (Davoust et *al*., 2010). Lors de l'infection expérimentale d'un chien réalisée par une souche de *R. rickettsii*, la rickettsémie objectivée par PCR, débute trois à huit jours après l'inoculation et persiste trois à 13 jours (Piranda et *al.*, 2008).

Du point de vue épidémiologique, le chien n'est pas considéré comme réservoir de rickettsies car il ne développe pas une rickettsémie suffisante pour assurer la transmission de *R. rickettsii*. Cependant, une étude expérimentale très récente a prouvé que les chiens peuvent être une source efficace de l'infection à *R. rickettsii* pour les tiques *Rh. Sanguineus* (Piranda et *al*., 2011).

Ces animaux jouent aussi un rôle de sentinelle de la circulation de *R. rickettsii* dans un environnement donné (Elchos et Goddard, 2003). Ainsi, dans le foyer de l'Arizona aux États-Unis où, de 2003 à 2008, 70 personnes étaient malades et huit étaient décédées, les chiens avaient des sérologies positives (5,7 % - 14/247) avant l'apparition du premier cas humain (Mcquiston et *al*., 2011).

Une enquête menée dans la région de São Paulo au Brésil, a montré que la séroprévalence à *R. rickettsii* était de 28 % (7/25) chez le chien et de 2,8 % (1/35) chez l'homme (Pinter et *al.* 2008). Dans cette même région, 2 cas cliniques de FPMR chez les chiens, ont été confirmés par séroconversion et analyse moléculaire (PCR) (Labruna et *al*., 2009).

Plusieurs études ont démontré que les chiens et les chevaux peuvent servir de sentinelles utiles pour le risque humain de FPMR (Hidalgo et *al.*, 2009; Milagres et *al*., 2010; Batista et *al*., 2010; Bermúdez et *al*., 2011). Des taux de séropositivité élevés à *R. rickettsii* ont été détectés chez des chevaux et des chiens sains, à partir des zones endémiques de la FPMR, au Brésil (Horta et *al*., 2006; Pacheco et *al*., 2011).

Aux États-Unis, 170 chats ont été testés par la sérologie vis-à-vis des différentes espèces de *Rickettsia*. Les résultats positifs ont montré que 17,2% des chats étaient séropositifs pour *Rickettsia rickettsii* (Case et *al*., 2006).

Le cycle de la FPMR s'établit entre les tiques, les vertébrés et les rickettsies. La dynamique des interactions est complexe, mal connue. Elle varie selon les écosystèmes (Davoust et *al*., 2010).

Le rôle de réservoir de *R. rickettsii* est surtout joué par les animaux sauvages (Annexe 01), tel que les lièvres et les rongeurs. Une étude, menée aux États-Unis, a permis l'isolement de sept souches de *R. rickettsii* à partir du sang ou de la rate d'un lièvre (Burgdorfer et *al.*, 1962).

Ces observations soulignent l'importance de l'infection naturelle des animaux sauvages dans l'entretien du cycle sylvatique de rickettsiose et de son intégration potentielle avec le cycle domestique et donc dans la persistance de l'infection dans la nature (Davoust et *al*., 2010; Milagres et *al*., 2010).

IV.2.3. Infection par *Rickettsia felis*

Les chats errants sont davantage infestés par des puces qui sont le plus souvent infectés par *R. felis*. Ils sont par ailleurs plus exposés au virus de l'immunodéficience féline et donc plus sensibles aux infections (Davoust et *al*., 2010). La séroprévalence de l'infection à *R. felis* chez cette espèce varie de 4 à 73 % (Tableau 2) (Reif et Macaluso, 2009). Une étude expérimentale a montré que 16 chats continuellement infestés par des puces infectées par *R. felis* présentaient tous une séroconversion dans un délai de deux à quatre mois. De plus, l'ADN de *R. felis* a été mis en évidence, de façon transitoire, dans le sang de cinq chats parmi les 16 (Wedincamp et Foil, 2000).

Au bilan, la séroconversion chez le chat suggère qu'au moins une infection transitoire se produit chez cette espèce (Sorvillo et *al*., 1993; Wedincamp et Foil, 2000; Breitschwerdt et *al*., 2005b; Case et *al*., 2006). Le caractère transitoire de l'infection sanguine peut s'expliquer soit par une élimination rapide de la bactérie chez les vertébrés, sous l'effet d'une réponse immunitaire rapide et efficace, soit par la séquestration des rickettsies dans des tissus autres que le sang (Davoust et *al*., 2010).

Récemment, en Californie, *R. felis* a été révélé par PCR dans les tissus (le foie et les reins) de trois opossums *(Didelphis virginiana)* sur 16 testés. C'est la première fois que *R. felis* soit détecté chez un vertébré, dans un organe autre que le sang (Karpathy et *al.*, 2009).

Chez les chiens, une étude très récente réalisée en Australie, a détecté l'ADN de *R. felis* dans neuf échantillons sanguins (soit 9 %), ceci suggère que les chiens peuvent aussi agir comme un hôte réservoir important pour *R. felis* et comme une source potentielle de rickettsioses humaine (Hii et *al*., 2011).

Selon Perlman, *R. felis* pourrait être considérée comme un symbionte transmis verticalement chez les invertébrés et devenant secondairement pathogène chez les vertébrés (Perlman et *al.*, 2006). À ce jour, le rôle du chat, du chien, des rongeurs ou des hérissons comme réservoir de *R. felis* reste un sujet de débat (Williams et *al*., 1992; Parola et Raoult, 2006; Davoust et *al*., 2010; Hii et *al*., 2011). S'il existe un réservoir vertébré dans le cycle d'infection de *R. felis*, l'opossum est le meilleur candidat, en particulier aux États-Unis. En effet, non seulement les opossums présentent des séroconversions mais ils sont aussi fortement parasités par des puces infectées (Boostrom et *al*., 2002).

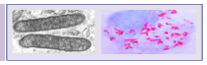
L'infection à *R. felis* chez les arthropodes, a été mise en évidence sur les cinq continents et sa distribution est cosmopolite (Davoust et *al*., 2010).

Au laboratoire, la transmission transovarienne de *R. felis* chez la puce du chat (*Ctenocephalides felis*) a été démontrée par la présence de la bactérie dans des oeufs et des adultes n'ayant pas encore pris leur premier repas sanguin (Azad et *al.*, 1997). *C. felis* peut donc être considérée comme le principal vecteur et réservoir de *R. felis* (Raoult et *al*., 2001; Hawley et *al*., 2007; Reif et Macaluso, 2009). Mais la chute du taux d'infection de génération en génération, chez des puces élevées en laboratoire sans contact avec des animaux vertébrés, peut suggérer l'existence d'un réservoir vertébré dans le cycle naturel de l'infection (Davoust et *al*., 2010).

Les données présentées dans le tableau suivant confirment l'importance des chats et des chiens en tant que sentinelles dans le contrôle de la circulation de *Rickettsia felis*, dans une zone urbaine.

Tableau 2 : Enquêtes de séroprévalence de l'infection canine et féline à *Rickettsia felis*

Pays	Auteurs	Populations félines et canines étudiées	Taux de séroprévalence (IFI) (%)
États-Unis	Davoust et *al*., 2010	Chats fébriles du nord-est des États-Unis	**8**
	Case et *al.*, 2006	170 chats de refuges en Californie et au Wisconsin	**11,1**
	Labruna et *al.*, 2007	22 chats domestiques de Santiago	**72,7**
	Bayliss et *al.*, 2009	90 chats fébriles et 90 chats en bonne santé	**3,9**
France	Davoust et *al*., 2010	91 chats errants du sud-est de la France	**18**
Espagne	Nogueras et *al.*, 2009	93 chiens dépourvus d'ectoparasites, dans des refuges du nord-est de l'Espagne	**49,5**



IV.2.4. Infection par *Rickettsia typhi*

La puce du rat *(Xenopsylla cheopsis)*, vecteur principal, ne meurt pas de l'infection et peut transmettre la rickettsie à une faible partie de sa descendance, par voie transovarienne (Raoult et Parola, 2007). En revanche, les rickettsies transmises par les puces ne sont pas maintenues principalement par voie transovarienne et donc ces bactéries possèdent des réservoirs mammifères (Raoult et Parola, 2007).

Rickettsia typhi est maintenue principalement par les rats (*Rattus spp.*) (Parola et Raoult, 2006; Civen et Ngo, 2008). Mais divers rongeurs et autres animaux sauvages et domestiques, tels que les souris, les chats, les opossums, les musaraignes et les mouffettes, ont également été observés occasionnellement à agir comme hôtes (Williams et *al*., 1992; Azad et *al*., 1997; Matthewman et *al*., 1997; Boostrom et *al*., 2002; Civen et Ngo, 2008).

Les tests sérologiques chez des animaux sélectionnés en étroite association avec des cas humains de typhus murin à Los Angeles, ont révélé une forte prévalence de séropositivité à *R. typhi* chez les chats domestiques et les opossums (Sorvillo et *al*., 1993). De plus, l'ADN de *R. typhi* a été détecté à partir des **rates** d'opossums (Williams et *al*., 1992).

En Espagne, Les résultats des tests d'immunofluorescence indirecte ont indiqué que neuf (12,3%) des 73 chiens ont été vérifiées portant des anticorps contre *R. typhi*. Ces résultats confirment que les chiens peuvent être infectés par *R. typhi* et indiquent leur utilité potentielle comme des sentinelles dans les études épidémiologiques de l'agent pathogène (Nogueras et *al.*, 2009).

IV.3. Vecteurs

Les rickettsies sont associées aux arthropodes appartenant à la classe des arachnides (sous-classe des acariens), principalement les tiques, ou aux arthropodes appartenant à la classe des insectes comme les poux, les puces ou les coccinelles. Ces hôtes peuvent être réservoirs, vecteurs et/ou amplificateurs de la bactérie (Parola et Raoult, 2001; Parola et Raoult, 2006; Renvoisé et Raoult, 2009).

a. Les rickettsies du groupe boutonneux sont principalement associées à des tiques :

- ***R. conorii*** (agent de FBM) est transmise par des tiques de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus* spécifiques aux chiens (Parola et Raoult, 1998). L'ADN de cette bactérie a été détecté récemment à partir de *Rh. sanguineus*, récoltées sur des chiens en Algérie (Kernif, 2007).

- ***R. rickettsii*** (agent de FPMR) est transmise principalement par 3 genres de tiques (*Dermacentor*, *Rhipicephalus* et *Amblyomma*) (Mumcuoglu et *al.*, 1993). Une étude récente a montré que 13,1% des tiques « *Rh. Sanguineus* » recueillies auprès de chiens ont été trouvées infectées par *R. rickettsii.* Toutes les étapes actives (larves, nymphes, adultes) étaient restées 100% infectées. Ces résultats indiquent un risque potentiel de transmission de la FPMR aux humains par la tique brune de chien (Pacheco et *al*., 2011).

b. Deux espèces de rickettsies sont transmises par les puces :

- ***Rickettsia typhi***, agent du typhus murin, est transmis principalement par les puces des rats (*Xenopsylla cheopis*) (Civen et Ngo, 2008), et occasionnellement, par autres vecteurs arthropodes comme les puces de chat *Ctenocephalides felis*, les puces de souris, ainsi que les poux, les acariens et les tiques (Raoult et Roux, 1997; Raoult et Parola, 2007). En Algérie, *R. typhi* a été détecté par PCR dans les puces *X. cheopis* recueillies auprès de rongeurs (Bitam et *al*., 2009a).
- ***Rickettsia felis*** a été détectée dans les puces : *C. felis* et *C. canis* parasitant les chiens et les chats (Wedincamp et Foil, 2002; Rolain et *al*., 2003; Kamrani et *al*., 2008; Nogueras et *al.*, 2009; Bermúdez et *al*., 2011), ainsi que d'autres espèces de puces (Annexe 01). En Algérie, une étude récente a permis la détection de *R. felis* par PCR dans les puces *C. canis* provenant de rongeurs et dans les puces d'hérissons (Bitam et *al*., 2006). Ces résultats suggèrent que l'infection par *R. felis* est répandue en Algérie et que les puces sont des vecteurs potentiels de rickettsioses humaines dans ce pays (Bitam et *al*., 2006).

IV.4. Mode de contamination

Les rickettsies infectent de nombreux arthropodes, qui interviennent dans leur cycle infectieux en assurant la transmission inter-humaine, inter-animale ou de l'animal à l'homme de ces bactéries (Fig. 3) (Maurin, 2003).

La transmission indirecte, lors de morsure, par des tiques infectées, est primordiale (Fig. 3). Les rickettsies sont inoculées par voie cutanée à partir de la salive de l'arthropode durant le repas sanguin (Raoult et Parola, 2007).

Les carnivores domestiques peuvent ramener dans les habitations des tiques non encore fixées, susceptibles de contaminer l'homme. De plus, l'hémolymphe et les fèces des tiques étant très riches en germes, le propriétaire peut s'infecter via les muqueuses (les conjonctives) ou les abrasions cutanées, en arrachant l'acarien fixé sur son animal (Bitan, 2002).

La transmission de *R. typhi* et *R. felis* chez l'homme, a lieu à l'occasion du prurit provoqué par les défécations des puces infectées et il s'ensuit ainsi une auto-inoculation à la faveur de lésions de grattage. Ces rickettsies peuvent d'autre part rester infectantes des années dans les poussières de déjections de puces et entraîner des contaminations par aérosols (Raoult et Roux, 1997; Reif et *al*., 2011). Une transmission par voie muqueuse est également possible (Raoult et Parola, 2007; Renvoisé et Raoult, 2009).

La découverte récente de *R. felis* dans les glandes salivaires de *C. felis* suggère mais ne prouve pas une transmission par la salive lors des piqûres de puces (Parola et Raoult, 2006; Macaluso et *al.*, 2008).

V. ÉTUDE CLINIQUE

V.1. Pathogénie

Les rickettsies pénètrent la circulation sanguine par voie cutanée ou conjonctivale. Elles vont ensuite s'attacher et pénétrer dans leurs cellules cibles, les cellules endothéliales. Après pénétration par phagocytose induite, les rickettsies s'échappent du phagosome pour se multiplier dans le cytoplasme (Renvoisé et Raoult, 2009).

Les rickettsies du groupe boutonneux peuvent également envahir le noyau cellulaire. *Rickettsia rickettsii* est le seul organisme du genre qui envahit les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Raoult et Parola, 2007).

Les bactéries vont grâce à plusieurs mécanismes, endommager les cellules endothéliales et induire une vascularite qui va déterminer les manifestations cliniques et les anomalies biologiques (Raoult et Brouqui, 1998). Ce processus entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire et contribue à créer œdème, hémorragie, hypotension et choc. Sont ensuite observés des troubles de la coagulation (pétéchies et multiples thromboses) (Fig. 3), une perturbation de l'irrigation de certains organes et nécrose (Bitan, 2002; Greene et Breitschwerdt, 2006).

Bien que *Rickettsia* infecte tous les organes entraînant une vascularite diffusée, le cœur et le cerveau sont les cibles essentielles pour déterminer la létalité des rickettsioses (Fig. 3) (Raoult et Brouqui, 1998; Raoult et Parola, 2007).

Les rickettsies ont également la capacité de se répliquer dans les tissus d'invertébrés (multiplication au niveau de l'épithélium intestinal, les ovaires, les glandes salivaires et autres organes chez les tiques et les puces) (Raoult et Parola, 2007; Macaluso et *al*., 2008).

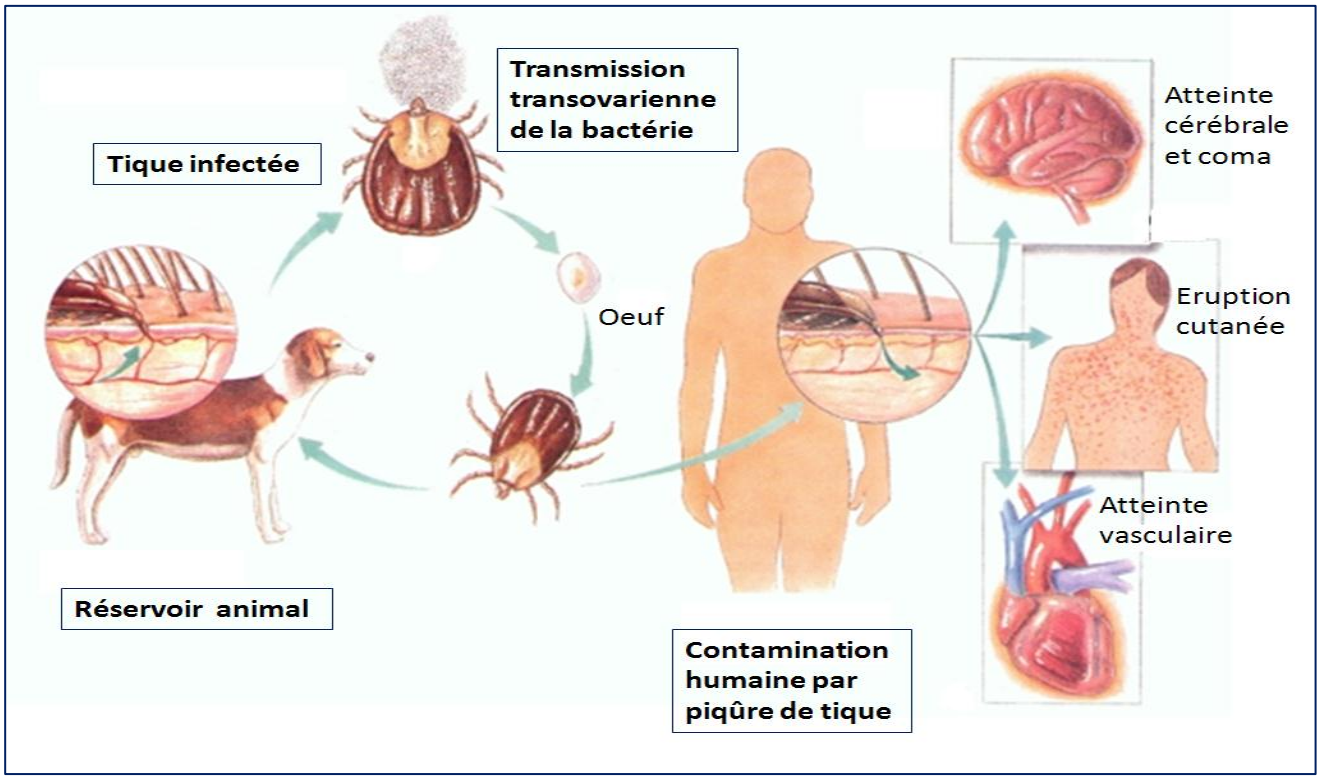


Fig. 3 : Pathogénie et cycle de transmission de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses (source Internet n°2 : http://www.ecosociosystemes.fr/rockymountainsfever.jpg)

V.2. Symptômes

V.2.1. Chez le chien

En tant que rickettsie la plus pathogène et la plus étudiée, *Rickettsia rickettsii* sert de modèle dans l'étude ci-dessous.

Les symptômes de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses chez les chiens malades consiste en une fièvre, anorexie, léthargie, adénopathie, troubles respiratoires et digestifs, douleur musculaire, polyarthrite et divers signes neurologiques incluant hyperesthésie, ataxie, parésie, troubles oculaires, perte de l'audition et coma (Breitschwerdt et *al*., 1985; Mumcuoglu et *al.*, 1993; Grindem et *al.*, 1999; Gasser et *al*., 2001).

Les signes cutanées observés se présentent sous formes d'œdèmes, d'hémorragies de type pétéchies à ecchymoses et de nécroses (Weiser et Greene, 1989; Gasser et *al*., 2001; Mikszewski et Vite, 2005).

L'épistaxis, méléna, et hématurie apparaissent chez certains sujets sévèrement touchés (Gyles et *al*., 2011).

Des thromboses ou des hémorragies dans les organes vitaux (cœur, cerveau, rein) entraînent souvent la mort de l'animal, par collapsus cardiovasculaire, insuffisance rénale ou une mort cérébrale (Mikszewski et Vite, 2005; Gyles et *al*., 2011). L'animal peut cependant guérir spontanément (Bitan, 2002).

La plupart des infections par *Rickettsia rickettsii* chez les chiens, dans des régions endémiques, sont subcliniques (Smith et *al.,* 1983). Une étude expérimentale a démontré que l'inoculation de *R. rickettsii* à des chiens, trois ans après la maladie, n'a pas permis de reproduire la maladie clinique, ce qui suggère qu'ils étaient prémunis (Davoust et *al*., 2010).

Les chiens infectés par *Rickettsia conorii* (agent de la fièvre boutonneuse) ne développent pas souvent de manifestations cliniques et sont souvent asymptomatique (Bitan, 2002).

les seuls signes cliniques observés étaient la douleur, un érythème et un oedème au site d'inoculation ainsi qu'une lymphadénopathie régionale, chez des chiens infectés expérimentalement par *R. conorii* (Kelly et *al*., 1992).

Cependant, un chien de trois 3 mois infecté naturellement par *R. conorii* a présenté une fièvre, une léthargie et une lymphoadénomégalie (Baneth et *al*., 1998). Et récemment, trois cas de fièvre chez des yorkshires terrier ont été attribués à cette rickettsie (sérologie et PCR) en Sicile (Solano-Gallego et *al.,* 2008).

Très peu d'infections cliniques par *R. felis* sont rapportées chez les animaux vertébrés. De façon intéressante, en Espagne, deux personnes d'une même famille ont présenté une fièvre boutonneuse à puces et le chien vivant sous le même toit a manifesté de l'asthénie, des vomissements et de la diarrhée sans apparition de fièvre. De l'ADN de *R. felis* a été mis en évidence à partir d'un prélèvement sanguin réalisé sur le chien (Oteo et *al.,* 2006). Dans une situation similaire en Allemagne, le chien vivant dans une maison où étaient apparus deux cas de fièvre boutonneuse à puces, a présenté une sérologie positive en Western blot mais est resté asymptomatique (Richter et *al.,* 2002).

V.2.2. Chez le chat

Les chats semblent développer des réponses d'anticorps contre *R. typhi* et *R. felis*, bien qu'il y ait peu de documentation sur la maladie clinique associée à l'infection (Wedincamp et Foil, 2000; Case et *al.*, 2006; Bayliss et *al.*, 2009).

VI. LA MALADIE CHEZ L'HOMME

VI.1. La fièvre boutonneuse méditerranéenne (FBM)

La FBM est endémique dans le bassin méditerranéen (Benabdellah et *al*., 2007). C'est une maladie émergente, en particulier au Portugal, en Italie, en Bulgarie et en Algérie (Annexe 02) (Rovery et *al.,* 2008). Des taux de mortalité élevés (32,2%) ont récemment été décrits au Portugal (Davoust et *al*., 2010).

En Algérie, les cas présumés de fièvre boutonneuse méditerranéenne ont été identifiés en 1993 et depuis ce temps, sa fréquence n'a cessé de croître (Annexe 03**)** (Mouffok et *al*., 2006; Benabdellah et *al*., 2007). Plusieurs études ont montré, grâce à des méthodes sophistiquées sérologiques ou directes, que les rickettsioses sont probablement sous-estimées et sous-déclarées en Algérie (Mouffok et *al*., 2006; Benabdellah et *al*., 2007; Mouffok et *al*., 2009; Bitam et *al*., 2009a).

La FBM est une maladie estivale qui se caractérise par une incubation asymptomatique d'environ six jours, puis brutalement on observe une association d'une fièvre élevée avec céphalées, d'une éruption maculopapuleuse, d'un syndrome pseudogrippal et d'une escarre d'inoculation (tâche noire) avec parfois de myalgies. Les symptômes durent 12 à 20 jours et l'amélioration clinique survient après 48 heures de traitement. Il existe des formes sévères de fièvre boutonneuse méditerranéenne dans 5 à 6 % des cas. Elles sont liées à une vascularite diffuse associée à l'angiotropisme des rickettsies ; on relève ainsi des manifestations rénales, neurologiques, cardiovasculaires, pulmonaires, oculaires, ainsi qu'une hépatomégalie et une splénomégalie. Le caractère purpurique doit faire craindre une forme sévère. Enfin, cette maladie peut être mortelle (Raoult et Brouqui, 1998; Bitan, 2002; Benabdellah et *al*., 2007; Mouffok et *al*., 2009), ou parfois asymptomatique, ne laissant qu'une trace sérologique (Gyles et *al*., 2011).

VI.2. La fièvre pourprée des montagnes rocheuses (FPMR)

La FPMR est l'affection la plus sévère dans le groupe boutonneux (Parola et Raoult, 2006). Les signes cliniques associés à cette rickettsiose sont semblables à ceux de la fièvre boutonneuse méditerranéenne, mais le taux de mortalité est élevé avec plus de 50% en absence de traitement adéquat chez l'homme (Parola et Raoult, 2006; Gyles et *al*., 2011; Favacho et *al*., 2011).

VI.3. Le typhus murin

La maladie a une répartition mondiale et on la rencontre en particulier dans les pays en voie de développement, notamment dans les ports, où les contacts avec les muridés et leur puces sont fréquents (Davoust et *al*., 2010).

Elle est caractérisée par une fièvre élevée, des céphalées, une asthénie et des myalgies. Une éruption maculo-papuleuse est présente dans plus de 50% des cas. La participation des manifestations respiratoire, gastro-intestinale et neurologique est également fréquemment signalée (Parola et Raoult, 2006; Civen et Ngo, 2008; Mouffok et *al.*, 2008). L'évolution sous antibiotique est favorable. Les formes graves semblent être en rapport avec un retard de diagnostic (Garnier et *al*., 2008). On déplore 2 à 3 % de cas fatals (Azad et *al.*, 1997).

En Algérie, 2 cas d'infection à *R. typhi* ont été confirmés chez des patients présentant des signes non spécifiques tels que la «fièvre d'origine inconnue». Les cliniciens doivent être conscients de la présence du typhus murin en Algérie (Mouffok et *al.*, 2008).

VI.4. La fièvre boutonneuse à puces

Rickettsia felis est responsable de la fièvre boutonneuse à puces. Le premier cas humain a été identifié en 1994 aux États-Unis (Texas) chez un patient présentant des symptômes ressemblant au typhus murin. Depuis, quelques dizaines de cas seulement ont été diagnostiqués dans le monde, sur les cinq continents. Le nombre d'infections humaines pourrait être en réalité beaucoup plus élevé car la symptomatologie, le plus souvent bénigne, n'incite pas à confirmer le diagnostic. De plus, certains cas cliniques peuvent être confondus avec d'autres rickettsioses et même d'autres maladies fébriles (Reif et Macaluso, 2009).

A ce jour, 2 cas seulement ont été diagnostiqués en Algérie (Bitam et *al*., 2009a).

VII. DIAGNOSTIC

VII.1. Diagnostic clinique

VII.1.1. Chez l'homme

Il est avant tout épidémio-clinique (La Scola et Raoult, 1997), pour cela les rickettsioses humaines doivent être évoquées systématiquement devant tous les patients présentant (IFR48, 2006c; Garnier et *al*., 2008):

- L'association clinique « fièvre, éruption cutanée et escarre d'inoculation », en période estivale, après piqûre de tique (groupe boutonneux).
- Un tableau fébrile, éruption, myalgie, pneumonie et encéphalite dans un contexte de contact avec les rats et leurs puces (groupe typhus).

VII.1.2. Chez le chien

Une réapparition saisonnière, des commémoratifs d'infestation par les tiques, de la fièvre et une combinaison des signes cliniques suivants : pétéchies, lymphadénopathies, douleur articulaire suggèrent la possibilité d'une FPMR chez le chien. Du fait de la variation marquée de la présentation clinique, la confirmation du diagnostic de cette infection, est importante pour le clinicien (Bitan, 2002).

VII.1.3. Chez le chat

Il y a peu de documentation sur la maladie clinique associée aux rickettsioses chez le chat (Case et *al.*, 2006).

VII.2. Diagnostic expérimental

La bactériémie chez les animaux réservoirs, est mise en évidence soit par culture (difficile pour les rickettsies), soit par la détection de l'ADN. La sensibilité des outils de biologie moléculaire actuellement disponibles, permet d'exclure l'existence d'une infection sanguine inférieure au seuil de détection (Davoust et *al*., 2010). La séropositivité est un critère indirect d'une infection chronique (Bermúdez et *al*., 2011). Un taux de séroprévalence élevé et stable dans une population animale est en faveur du rôle de réservoir potentiel de ces animaux (Davoust et *al*., 2010; Pacheco et *al*., 2011).

VII.2.1. Diagnostic direct

VII.2.1.1. Cultures : Les rickettsies sont cultivées sur œufs embryonnés ou sur tapis cellulaire (cellules L, fibroblastes, cellules Véro). Actuellement, la méthode utilisée au Centre Nationale de référence des Rickettsioses (CNR) à Marseille est l'isolement par centrifugation en tubes bijoux. Au fond d'un tube stérile est déposée une lamelle de verre, support d'un tapis cellulaire. Le prélèvement pathologique (sang prélevé sur tubes héparinés, biopsies d'escarres cutanées, broyat de tiques ou de puces…) est déposé dans le tube puis centrifugé 1 heure afin de faciliter l'adhésion des bactéries aux cellules. L'inoculum est ensuite retiré et remplacé par du milieu frais de culture. Les rickettsies sont ensuite détectées directement sur la lamelle par immunofluorescence en utilisant des anticorps spécifiques aux rickettsies.

Si l'immunofluorescence directe est positive, la souche est isolée dans des boites de culture cellulaire (Raoult et Brouqui, 1998; Renvoisé et Raoult, 2009)

Cette technique ne peut être réalisée que dans les laboratoires de référence disposant d'un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 et d'un personnel qualifié (Renvoisé et Raoult, 2009).

VII.2.1.2. Coloration de Gimenez : Les rickettsies retiennent la fuchsine basique lorsqu'elles sont colorées par la technique de Gimenez et apparaissent en rouge vif, tandis que le fond est teinté en bleu pâle avec le vert de malachite (Fig. 4) (Raoult et Parola, 2007).

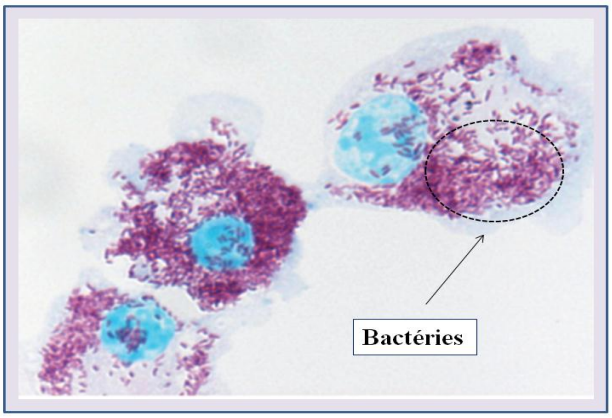


Fig. 4: *Rickettsies* en culture sur cellules L 929 (fibroblastes de souris)
[coloration de Gimenez – grossissement 10 X 100] (Davoust et *al*., 2010)

Les antigènes *R. rickettsii* ont été détectés, par la coloration de Gimenez, dans les cellules endothéliales vasculaires du cerveau et du poumon d'un chien mort de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses (Breitschwerdt et *al*., 1985).

VII.2.1.3. Amplification génique par PCR

Les outils de biologie moléculaire sont sensibles, spécifiques et rapides, ils contribuent en grande part au diagnostic car ils peuvent donner un résultat positif avant la séroconversion et permettent d'identifier de nouvelles rickettsies (La Scola et Raoult, 1997; Kidd et *al*., 2008). On peut chercher l'acide nucléique sur: le sang (qui doit être prélevé sur tube EDTA), les biopsies cutanées, les arthropodes (broyats de tiques ou puces…) ou les souches en culture (Raoult et Richet, 2010). Les rickettsies peuvent être détectées directement à partir des différents tissus (foie, cœur, rein et rate) (Karpathy et *al.* 2009; Elchos et Goddard, 2003; Favacho et *al*., 2011).

Lors de PCR, les gènes les plus étudiés des rickettsies du groupe boutonneux et du groupe typhus sont ceux codant pour le 16S ARNr, la citrate synthase (gltA), les protéines de la membrane externe (ompA, ompB), et une protéine intracytoplasmique (gène D) (Raoult et Brouqui, 1998; Fournier et *al*., 2003; Hawley et *al*., 2007; Renvoisé et Raoult, 2009).

Récemment, le séquençage de gènes de rickettsies a été utilisé pour l'identification d'espèces (Raoult et Brouqui, 1998).

Ces tests moléculaires ont été largement utilisés dans l'identification des différentes espèces de *Rickettsia* qui infectent les chiens et les chats (Wedincamp et Foil, 2000; Oteo et *al.*, 2006; Solano-Gallego et *al.*, 2008; Kidd et *al*., 2008; Davoust et *al*., 2010).

VII.2.2. Diagnostic indirect : Sérologie

VII.2.2.1. Immunofluorescence indirecte (IFI)

Actuellement, le test sérologique de référence est l'immunofluorescence indirecte. Ce test sensible permet de détecter simultanément des anticorps, IgM et IgG, dirigés contre un grand nombre d'antigènes. Mais la limitation majeure de cette technique est la réactivité croisée entre les différentes espèces de rickettsies, voire avec d'autres bactéries intracellulaires (Parola et Raoult, 2006; Renvoisé et Raoult, 2009).

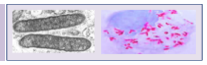
Par exemple, les anticorps contre *R. felis* peuvent donner des réactions croisées avec *R. typhi*, *R. rickettsii*, et d'autres antigènes des rickettsies du groupe boutonneux (Raoult et *al*., 2001). En raison des réactions croisées entre antigènes, l'immunofluorescence indirecte peut être complétée par une adsorption croisée pour préciser contre quel antigène est dirigée la réponse d'anticorps (Raoult et Richet, 2010).

Plusieurs enquêtes de séroprévalence de l'infection à *Rickettsia*, ont été réalisées chez le chien et le chat par la méthode de l'immunofluorescence indirecte (Tableau 1 et 2) (Parzy et *al.*, 1991; Bacellar et *al.*, 1995; Nogueras et *al.*, 2009; Batista et *al*., 2010; Bermúdez et *al*., 2011).

VII.2.2.2. Western-Blot

Le western blot permet un diagnostic précoce et peut également être un outil intéressant lors d'enquêtes séro-épidémiologiques. Les réactions croisées sont possibles et il est difficile dans ce cas de préciser avec certitude l'espèce responsable d'une infection, particulièrement avec des sérums tardifs. Des techniques d'adsorption croisée ont été associées au wastern blot. Cependant, bien qu'efficaces dans le diagnostic d'espèce, ces techniques consomment beaucoup d'antigènes et sont longues, couteuses et disponibles que dans les laboratoires de référence (Raoult et Parola, 2007).

Il existe d'autres tests sérologiques qui peuvent être utilisés comme par exemples : le test d'hémagglutination, fixation du complément et le test ELISA.



VIII. TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

VIII.1. Traitement

Les antibiotiques efficaces contre les rickettsies sont : les tétracyclines, le chloramphénicol, les fluoroquinolones et certains macrolides. La doxycycline est l'antibiotique de référence des rickettsioses transmises par les tiques (Raoult et Brouqui, 1998; Renvoisé et Raoult, 2009; Labruna et *al*., 2009).

Le traitement de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses chez le chien, est basé sur l'administration de la doxycycline pour les oedèmes sous-cutanés, de l'oxytetracycline contre la vascularite nécrosante et du chloramphénicol pour les signes neurologiques, ou un traitement général par l'enrofloxacine (Weiser et Greene, 1989; Breitschwerdt et *al*., 1991; Mumcuoglu et *al.*, 1993; Grindem et *al.*, 1999). L'antibiothérapie n'est efficace que si elle est appliquée de manière précoce, avant l'installation de la thrombose et la nécrose des tissus qui peuvent être fulgurants (Bitan, 2002).

Les chats ne deviennent pas cliniquement malades avec *R. typhi* et *R. felis*, et le traitement n'est pas recommandé (Bayliss et *al.*, 2009).

VIII.2. Prophylaxie

Actuellement, il n'existe pas de vaccin efficace (Davoust et *al*., 2010).

Les zoonoses vectorielles continuent à poser un risque potentiel pour la santé humaine. Leur prévention nécessite à la fois un contrôle efficace des vecteurs arthropodes et une compréhension du rôle des animaux sauvages et domestiques dans l'entretien et la transmission de la maladie (Blagburn et Dryden, 2009).

Deux mesures de lutte doivent être établies :

VIII.2.1. Éliminer les arthropodes vecteurs

Application régulière de traitements insecticides et acaricides dans l'environnement (la végétation), sur les animaux domestiques et dans les habitations infectées (Nozais et *al*., 1996).

Ces traitements sont à base de : organophosphorés, organochlorés, pyréthrines et pyréthrinoïdes (Nozais et *al*., 1996).

Chez l'homme, la prévention repose sur l'application de répulsives directement sur la peau ou le port de vêtements couvrants et imprégnés d'insecticide spécifique pour tissus lors de séjours dans les jardins infestés de tiques ou les forêts. Une inspection corporelle minutieuse incluant le cuir chevelu est nécessaire pour éliminer les tiques non encore fixées ou récemment fixées (Rodhain et Perez, 1985).

VIII.2.2. Limiter les réservoirs potentiels

La destruction des hôtes de ces insectes, qu'ils soient sauvages ou domestiques est très difficile à mettre en œuvre :

La destruction des rongeurs par des substances rodenticides, le piégeage ou le gazage des terriers. Ainsi que la clôture des jardins pour limiter l'introduction d'animaux sauvages porteurs de parasites externes, sont des méthodes très efficaces (Nozais et *al*., 1996).

Le contrôle des populations de chiens et de chats errants est considéré comme un moyen limitant la transmission des rickettsies (Mcquiston et *al*., 2011).

IX. CONCLUSION

Les rickettsioses présentent la grande originalité de rassembler des pathologies à la fois très anciennes et des pathologies émergentes. De nouvelles espèces viennent régulièrement rejoindre ce genre en permanente expansion et de nouvelles implications en pathologie humaine sont rapportées. Durant les vingt dernières années, la rickettsiologie a été l'objet d'une véritable révolution en termes d'avancées épidémiologiques, microbiologiques et moléculaires. Tandis que de nombreuses questions au sujet de leur écologie notamment la spécificité d'hôte réservoir, sont encore mal connues (Renvoisé et Raoult, 2009).

En plus des arthropodes hématophages vecteurs et réservoirs principaux, les vertébrés constituent bien des réservoirs secondaires dans des écosystèmes donnés qui permettent la persistance des rickettsies et dans lesquels l'homme peut s'infecter accidentellement.

Au bilan, l'existence d'animaux vertébrés comme réservoirs de rickettsies a pu être montrée depuis un siècle mais des études sont encore à mener pour en préciser l'importance épidémiologique selon les cas (Davoust et *al*., 2010).

1ère PARTIE
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE II
Les bartonelloses

I. GÉNÉRALITÉS

Les bartonelloses dues aux genres *Bartonella* sont considérées comme des maladies émergentes à cause des critères suivants (Breitschwerdt et Kordick, 2000; Chang et *al.*, 2000; Boulouis et *al*., 2005a) :

- Leurs zoonoses potentielles ;
- Leur transmission par plusieurs vecteurs arthropodes ;
- Leur capacité d'infecter et de persister dans les réservoirs mammifères.

Les bartonelloses sont des maladies à distribution mondiale, affectant l'homme, les animaux terrestres domestiques et sauvages ainsi que les animaux marins (Saisongkorh et *al*., 2009; Welc-Faleciak, 2009).

Les animaux domestiques et le bétail représentent un réservoir important d'espèces de *Bartonella*, en particulier **les chats** et **les chiens**, qui sont impliqués dans les infections humaines (Saisongkorh et *al*., 2009; Levy et *al*., 2011).

II. HISTORIQUE

Les *Bartonella* sont des bactéries connues depuis le début du 20ème siècle et responsables de maladies variées chez l'homme et les animaux. Chronologiquement, c'est l'homme qui est le premier a été identifié comme victime de cette bactérie et deux maladies importantes étaient associées à ce genre : la maladie de Carrion due à *Bartonella bacilliformis* (mise en évidence en 1909 par Barton) et la fièvre des tranchées due à *Rochalimea quintana* (décrite en 1915). Parallèlement à ces découvertes bactériologiques, des observations microscopiques de bactéries hémotropes chez des animaux comme les bovins ou le chien ont été effectuées sans conduire à des isolements (Boulouis et *al*., 2008).

Enfin vers la fin de la première moitié du 20ème siècle, *B. vinsonii* a été isolée de rongeurs (Boulouis et *al*., 2008). Il a fallu attendre 1992, et l'identification de la bactérie responsable de la maladie des griffes du chat (*Rochalimea henselae*) (Koehler et *al.,* 1994) puis son isolement chez le chat, pour assigner aux animaux, un rôle de réservoir de ce qui devient le genre *Bartonella* (Birtles et *al*., 1995). L'infection canine à *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* a été rapportée en 1994 (Breitschwerdt et *al*., 1995). En 1996, une nouvelle espèce, *B clarridgeiae*, a été isolée dans le sang d'un chat bactériémique (Raoult et Brouqui, 1998).

Depuis les 20 dernières années, le nombre des espèces ou sous-espèces de *Bartonella*, identifiées à partir de nombreuses espèces animales, a considérablement augmenté (Chomel et *al*., 2009).

Le développement des techniques moléculaires a bénéficié du séquençage du génome des principales espèces. Actuellement, les génomes de *B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis*, *B. tribocorum* et *B. birtlesii* sont complètement séquencés (Boulouis et *al*., 2008).

III. ÉTUDE DE L'AGENT CAUSAL

III.1. Taxonomie

En 1993, Brenner et *al*. ont proposé la reclassification des bactéries du genre *Rochalimaea* dans le genre *Bartonella* parce qu'on a découvert qu'elles puissent être cultivées sur des milieux synthétiques acellulaires et en se basant sur la similarité des séquences du gène codant pour l'ARN 16S de ces deux genres bactériens (Brenner et *al*., 1993). Ainsi les espèces *Rochalimaea quintana* et *Rochalimaea henselae* ont été nommées respectivement *Bartonella quintana* et *Bartonella henselae*. De même, en 1995, Birtles et *al*. ont proposé l'unification du genre *Grahamella* et *Bartonella* d'après la similarité des ces mêmes séquences (Birtles et *al*., 1995).

Actuellement toutes les espèces des trois genres *Bartonella*, *Rochalimaea*, et *Grahamella* sont regroupées dans la famille des *Bartonellaceae* et le genre *Bartonella* (Brenner et *al*., 1993; Boulouis et *al*., 2005a).

La famille des *Bartonellaceae* a été également retirée de l'ordre des Rickettsiales. Les études taxonomiques récentes placent le genre *Bartonella* dans la subdivision alpha-2 des *Proteobacteria*. Ce genre est phylogénétiquement plus proche des genres *Brucella* et *Agrobacterium* que du genre *Rickettsia* (Edouard et Raoult, 2009; Saisongkorh et *al*., 2009).

III.2. Bactériologie

Les bactéries du genre *Bartonella* sont de petits bacilles Gram négatif légèrement incurvés, mesurant en moyenne 0,3-0,5 x 1-1,5 µm (Edouard et Raoult, 2009; Boulouis et *al*., 2007), *Bartonella bacilliformis* et *B. clarridgeiae* font partie des quelques bactéries du genre à posséder des flagelles (Fig. 5) (Bitan, 2002; Boulouis et *al*., 2007).

Les bartonelles sont des bactéries aérobies, catalase et oxydase négatives. Les autres caractères biochimiques ont peu d'intérêt car ils ne permettent pas la différenciation entre diverses espèces de *Bartonella.* Ces bactéries sont intracellulaires facultatifs (Boulouis et *al*., 2008; Edouard et Raoult, 2009).

La culture des bartonelles est laborieuse. Ces bactéries sont capables de croitre in vitro sur des milieux inertes dans la mesure où leurs besoins nutritifs, et en particulier la présence d'hémine, sont assurés. Elle nécessite des conditions qui peuvent varier d'une espèce à l'autre. Les conditions optimales de culture sur milieu axénique, valables pour la majorité des espèces, requièrent une gélose enrichie au sang frais de lapin, de mouton ou de cheval, une incubation à 35-37 °C et une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2 (sauf *B. bacilliformis* qui croît à 28-30 °C sans nécessiter de CO_2). De petites colonies polymorphes, blanchâtres ou translucides apparaissent en 10 à 15 jours mais leur délai de croissance peut atteindre 45 jours (Fig. 6) (Boulouis et *al*., 2007, 2008; Edouard et Raoult, 2009; Chomel et Kasten, 2010). Les colonies, rugueuses, adhérentes et incrustées dans la gélose lors du primo-isolement, deviennent lisses et moins adhérentes après quelques repiquages (Raoult et Brouqui, 1998). La sensibilité de la culture est augmentée par la lyse des cellules eucaryotes (méthode chimique, congélation-décongélation et centrifugation-lyse pour les hémocultures) avant ensemencement (Euzéby, 2010).

La culture cellulaire en tubes bijoux semble plus rapide et plus sensible que les cultures en milieux axéniques. Elle est réalisée uniquement dans des laboratoires spécialisés, sur cellules L929, HeLa, Vero ou sur cellules endothéliales (Edouard et Raoult, 2009).

Les *Bartonella* sont des bactéries fastidieuses à cultiver, c'est pourquoi la culture sur gélose et la culture cellulaire sont réalisées en parallèle pour obtenir un résultat optimal (Edouard et Raoult, 2009). La difficulté certaine de culture des Bartonelles explique sans doute la description tardive de bon nombre de ces espèces et le rôle central de la biologie moléculaire (PCR) dans leur découverte et dans le diagnostic actuel des infections (Boulouis et *al*., 2008).

Fig. 5: *Bartonella bacilliformis* sous microscope électronique (Castillo, 2006)

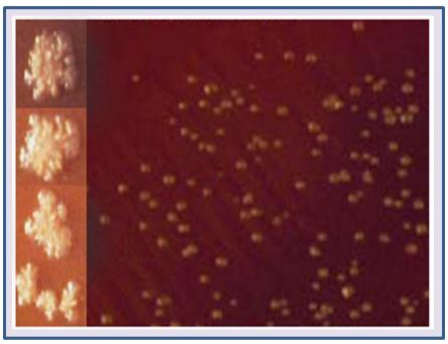


Fig. 6: Aspect des colonies de *Bartonella henselae* (source Internet n°3 : http://www.microbe-edu.org/professionel/diag/imgbar/bar15.jpg)

IV. ÉPIDÉMIOLOGIE

IV.1. Agents pathogènes

Plus de 30 espèces connues de *Bartonella*, ont été isolées chez l'homme ainsi que les animaux sauvages et domestiques (Saisongkorh et *al*., 2009). On connaît actuellement 14 espèces de *Bartonella* zoonotiques (Annexe 4) (Boulouis et *al*., 2008; Chomel et Kasten, 2010).

Les bartonelloses sont des maladies pathogènes qui prennent de l'importance chez les canidés. En effet, les résultats des analyses moléculaires de l'infection à *Bartonella* chez les chiens domestiques en Algérie (Alger) ont montré l'existence de trois espèces de *Bartonella*: *Bartonella vinsonii* subsp. *Berkhoffii*, *Bartonella clarridgeiae* et *Bartonella elizabethae* (Kernif et *al*., 2010).

Il est possible que certaines infections humaines en Algérie, peuvent être causées par les agents de bartonelloses identifiés chez ces réservoirs animaux (Bitam et *al*., 2009b).

Nous aborderons la bartonellose chez le chat et le chien qui a fait l'objet de notre étude expérimentale, et nous parlerons de son impact sur la santé humaine.

IV.2. Réservoirs

Les animaux représentent un réservoir important des *Bartonella*, mais l'homme est l'unique réservoir pour deux d'entre elles (*B. quintana* et de *B. bacilliformis*). les espèces animales réservoirs appartiennent principalement à trois groupes de mammifères: les carnivores, les ruminants et les rongeurs (Annexe 4) (Boulouis et *al*., 2008).

Les animaux de compagnie servent de réservoirs pour plusieurs espèces de *Bartonella* zoonotiques, et peuvent aussi servir de sentinelles pour ces bactéries, hébergées par les animaux sauvages (Guptill, 2010).

IV.2.1. Réservoir félin

Le chat a longtemps été considéré comme un hôte réservoir n'exprimant pas de symptômes, mais des preuves directes et indirectes (sérologiques) indiquent que cette espèce peut aussi être affectée par *Bartonella* (Boulouis et *al*., 2007).

Les chats domestiques sont les principaux réservoirs de ***Bartonella henselae***, l'agent principal de la maladie des griffes du chat (CSD), ***Bartonella clarridgeiae***, qui a été suspectée dans quelques cas de CSD et ***Bartonella koehlerae***, considérée comme cause d'endocardite chez l'homme et le chien (Chomel et *al*., 2004; Breitschwerdt, 2008; Kamrani et *al*., 2008; Ohad et *al*., 2009; Chomel et Kasten, 2010). De plus, des cas de co-infections à *B. clarridgeiae* et de *B. henselae* ont été décrites chez les félins (Gurfield et *al*., 1997).

La prévalence des bactériémies retrouvées chez les félidés est plus importante chez les chatons (âgés de moins d'un an) que chez les adultes (Chomel et *al*., 1995).

La fréquence des bactériémies varie de 4 à 70 % en fonction du mode de vie félin (Chomel et *al*., 1995). En effet, la proportion de chats errants présentant une bactériémie est plus importante que celle des chats domestiques (Chomel et *al*., 2004; Kamrani et *al*., 2008). En France, le pourcentage de chats bactériémiques par *B. henselae* et *B. clarridgeiae* varie entre 8 % et 16,5 % chez les chats domestiques et entre 53 et 62 % chez les chats errants (Heller et *al.*, 1997; Gurfield et *al.*, 2001).

D'autres facteurs semblent aussi influencer le niveau d'infection de ces animaux, notamment l'importance de l'infestation des chats par les puces, l'état de santé des animaux et la localisation géographique (prévalence élevée dans les pays au climat chaud et humide) (Rolain et *al*., 2004; Chomel et *al*., 2006; Boulouis et *al*., 2005a).

IV.2.2. Réservoir canin

Le rôle du chien comme réservoir possible de Bartonelles reste controversé. En effet, le nombre de chiens sains pour lesquels un isolat de *Bartonella* a été obtenu, est très réduit (Gundi *et al.*, 2004) et ils représentent à ce jour, uniquement un hôte accidentel du bacille (Chomel et *al*., 2006; Boulouis et *al*., 2008).

Nombreuses recherches montrent que les chiens domestiques sont infectés par un grand nombre d'espèces de *Bartonella*, telles que ***Bartonella vinsonii berkhoffii*** (Michau et *al*., 2003; Breitschwerdt et *al*., 1995), ***B. henselae*** (Gillespie et *al*., 2003; Gundi et *al*., 2005), ***B. clarridgeiae*** (Chomel et *al*., 2001; Gillespie et *al*., 2003; Gundi et *al*., 2005), ***Bartonella rochalimae*** (Henn et *al*., 2009), ***B. quintana*** (Kelly et *al*., 2006), ***B. koehlerae*** (Ohad et *al*., 2009), ***Bartonella washoensis*** (Chomel et *al*., 2003b), ***Bartonella bovis*** (Duncan et *al.*, 2007; Saisongkorh et *al*., 2009) et ***Bartonella elizabethae*** (Mexas et *al*., 2002).

La séroprévalence de l'infection à *B. vinsonii berkhoffii* chez les chiens de compagnie est relativement faible, inférieure à 3 % - 5 % dans plusieurs études effectuées aux Etats-Unis et en Europe (Boulouis et *al.*, 2005b; Henn et *al.*, 2005). Cette situation contraste avec les études menées en régions tropicales où la prévalence en anticorps anti-*B. vinsonii berkhoffii* est beaucoup plus élevée, allant d'environ 18 % à l'Île de la Réunion à 38% en Thaïlande et jusqu'à plus de 50% en Afrique subsaharienne (Boulouis et *al.*, 2005b).

Comme pour les chats, la prévalence est plus importante chez les chiens errants que chez les chiens domestiques, en effet une étude menée au Maroc a montré que 4 % (1/24) des chiens domestiques étaient séropositifs pour *B. vinsonii berkhoffii* contre 36 % (8/22) à 47 % (47/101) chez les chiens errants (Henn et *al.*, 2006).

Il a été démontré que les chiens, vivant dans un environnement rural et fortement exposés aux piqûres de tiques et de puces, représentent un facteur de risque d'infections à *Bartonella* chez l'homme (Boulouis et *al*., 2005a; Solano-Gallego et *al*., 2006a).

Bien que le rôle des chiens en tant que source d'infection humaine ne soit pas encore clairement établi, ces animaux représentent des sentinelles épidémiologiques pour l'exposition humaine (Chomel et Kasten, 2010)**.**

IV.2.3. Autres réservoirs

D'autres animaux commencent à être identifiés comme réservoirs tel que le kangourou, réservoir de *B. australis* (Fournier et *al.*, 2007) et le bovin qui est le réservoir principal de *B. bovis* (Boulouis et *al*., 2008). L'ADN de *Bartonella* a été récemment retrouvé dans le sang d'animaux marins (marsouins et tortues) (Maggi et *al.*, 2005b; Valentine et *al.*, 2007) et chez le cheval (Jones et *al.*, 2008). Les coyotes semblent être le réservoir principal de *B. vinsonii berkhoffii* aux Etats Unies (Chang et *al.*, 2000). Les renards sont réservoirs d'une nouvelle espèce zoonotique *B. rochalimae* (Boulouis et *al*., 2008). Des études récentes indiquent que plusieurs espèces de *Bartonella* transmises par les rongeurs sont à l'origine d'un nombre croissant de cas d'infections humaines et canines (Annexe 4) (Boulouis et *al*., 2005a).

Récemment, une enquête sur la distribution et la diversité des espèces de *Bartonella* chez les rongeurs et les hérissons a été rapportée en Algérie (Benslimani et *al.*, 2005). Ces animaux étaient suspectés d'être des réservoirs sauvages de *Bartonella spp*. (Benslimani et *al.*, 2005; Bitam et *al*., 2009b). La découverte d'espèces de *Bartonella* (*B. elizabethae* et *B. tribocorum*) dans les rates de ces mammifères, suggère que ces agents pourraient être responsables chez l'homme, de maladies infectieuses d'étiologie inconnue en Algérie (Bitam et *al*., 2009b).

IV.3. Vecteurs

Les espèces de *Bartonella* ont une distribution mondiale avec des prévalences plus élevées dans les zones où les conditions sont plus favorables pour les vecteurs arthropodes (Guptill, 2010)

Les ectoparasites impliqués dans la transmission de *Bartonella* sont les phlébotomes, les poux, les puces, les acariens, et les tiques (Saisongkorh et *al*., 2009).

La puce du chat (*Ctenocephalides felis*) joue un rôle majeur dans la transmission de Bartonellose féline (Chomel et *al*., 1996; Boulouis et *al*., 2008). Effectivement plusieurs espèces de *Bartonella* autres que *B. henselae* ont été également détectées dans des puces de chats, notamment *B. quintana*, *B. clarridgeiae* et *B. koehlerae* (Rolain et *al*., 2003). Les puces jouent ainsi un rôle indirect en accroissant le réservoir félin et donc le risque de transmission à l'homme (Edouard et Raoult, 2009).

En Algérie, cinq espèces de *Bartonella* ont été détectées par des méthodes moléculaires (PCR), dans des puces provenant des rongeurs et insectivores (Tableau 3).

Tableau 3 : Les espèces de *Bartonella* détectées dans les puces collectées en Algérie (Bitam et *al*., 2010; Bitam et *al*., 2011)

Puces	**Hôte animal**	**Espèces de *Bartonella***
Xenopsylla cheopis	Rongeurs (Rats)	*B. elizabethae, B. tribocorum, Bartonella sp.*
Leptopsylla segnis	Rongeurs (Souris)	*B. elizabethae*
Archeopsylla erinacei	Hérissons	*B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*

Un nouveau génotype nommé *'Candidatus Bartonella eldjazairii'* a été détecté dans les puces des rats *Xenopsylla cheopis* (Bitam, 2008).

D'autres vecteurs potentiels, tels que les tiques ont été récemment identifiés comme porteurs d'ADN de *Bartonella*, en effet plusieurs publications récentes ont rapporté une prévalence élevée d'infection à *Bartonella spp.* chez les tiques provenant de diverses régions du monde (Cotté et *al*., 2008; Chomel et *al*., 2009; Guptill, 2010; Tijsse-Klasen et *al*., 2011). Il a été démontré que le genre *Ixodes* (espèce *Ixodes pacificus*) peut transmettre plusieurs espèces de *Bartonella* : *B. henselae*, *B. quintana*, *B. washoensis* et *B. vinsonii* sous-espèce *berkhoffii*, parmi les animaux et les êtres humains (Chang et *al*., 2001). Cependant, la tique *Ixodes ricinus* est compétente pour la transmission de *B. henselae*. En effet la transmission expérimentale de matériel infectieux à partir de cette espèce de tique aux chats a été récemment prouvée (Cotté et *al*., 2008).

De plus, l'ADN de *B. vinsonii berkhoffii* a été trouvé dans des espèces de tiques inféodées aux chiens (Boulouis et *al.*, 2005b), de ce fait l'exposition aux tiques est déterminée comme facteur de risque associé aux chiens séropositifs à *B. vinsonii berkhoffii* (Billeter et *al*., 2008).

La transmission des *Bartonella* au sein des réservoirs ruminants s'effectue par des tiques ou des mouches piqueuses (*Tabanidae*, *Stomoxidae*, *Hippoboscidae*,…) (Halos et *al.*, 2004).

IV.4. Mode de transmission

IV.4.1. Chez l'homme

La transmission de *B. henselae* du chat à l'homme est censée se produire plus fréquemment par des griffures de chat contaminées par des excréments de puces (Chomel et *al*., 1996; Mcelroy et *al*., 2010). La transmission peut également se faire par morsure si les excréments de puces ou le sang de chat infecté, contaminent le site de morsure (Chomel et *al*., 1996; Guptill, 2010), car l'excrétion de *B. henselae* dans la salive de chat n'a pas été clairement documentée (Chomel et *al*., 2006). La salive de chat peut être contaminée par les saignements gingivaux survenant lors de maladie parodontale causée par la bactérie (Chomel et *al*., 1996). Une transmission de *B. henselae* à l'homme par des puces de chats a été évoquée (Boulouis et *al*., 2007; Mcelroy et *al*., 2010).

Il a été suggéré que *B. henselae* et *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* peuvent être transmises à l'homme par les morsures ou griffures de chien (Duncan et *al*., 2007; Rolain et *al*., 2009). En effet, deux patients ont été rapportés comme ayant été infectés par *Bartonella henselae* après un contact avec un chien. Les deux patients propriétaires d'un chien, n'avaient aucun contact avec les chats. De plus, l'ADN de *B. henselae* a été détecté à partir d'écouvillons de la gencive et la muqueuse buccale du chien avec lequel un des patient avait été en contact (Murano et *al*., 2001).

L'importance réelle de l'infection des chiens par *B. henselae* et le rôle de l'espèce canine dans la transmission de la bactérie à l'homme restent encore à évaluer (Murano et *al*., 2001).

Plusieurs espèces de *Bartonella* (*Bartonella vinsonii* sous-espèces *arupensis*, *B. elizabethae*, *B. grahamii* et *B. washoensis*) peuvent se transmettre à l'homme par contact avec des rongeurs (Guptill, 2010).

IV.4.2. Chez les réservoirs animaux

Les arthropodes hématophages constituent les vecteurs majeurs des Bartonelles chez les réservoirs. Ils contribuent à exporter les bactéries du flux sanguin, assurer leur multiplication et à inoculer les bactéries au cours de la morsure d'un hôte. La relative spécificité des ectoparasites pour leur hôte vertébré, participe sans doute à la spécificité des *Bartonella* pour leur hôte mammifère (Boulouis et *al*., 2008). La bactériémie chronique qui est fréquente chez les chats infectés, facilite la transmission vectorielle (Breitschwerdt et Kordick, 2000).

La puce du chat (*Ctenocephalides felis*) est indispensable pour maintenir l'infection au sein de la population féline (Chomel et *al.*, 1996). Ce ne sont pas directement les piqûres de puces qui sont infestantes mais leurs fècés. Il a été démontré que *B. henselae* peut se multiplier dans le système digestif de la puce du chat et survivre plusieurs jours dans les déjections des puces infectées (Chomel et *al*., 2009). Les chats inoculés avec des déjections de puces deviennent bactériémiques (Foil et *al.*, 1998). Ces résultats conduisent à l'hypothèse que la bactérie présente dans les déjections de puces est déposée sur les poils de l'animal lors du repas sanguin et pénètre ensuite dans l'organisme de celui-ci soit par les puces elles-mêmes soit lors de traumatisme cutané ou de lésion de grattage (Foil et *al.*, 1998) soit par l'ingestion de puces infectées au cours de la toilette (Kordick et *al*., 1999a).

Chez les chats infectés expérimentalement, aucune transmission directe par griffure ou morsure n'a pu être mise en évidence (Chomel et *al.*, 1996). Il semble donc que cela n'est pas un mode de transmission classique même si la détection de l'ADN de *B. quintana* dans la pulpe dentaire d'un chat domestique et la détection moléculaire de *B. henselae* et *B. grahamii* à partir de la pulpe dentaire des chats errants (Foucault et *al*., 2006; La et *al*., 2005; Aboudharam et *al*., 2005), ainsi que la mise en évidence d'ADN de quatre espèces de *Bartonella* dans la cavité buccale de chiens Labrador (*B. bovis*, *B. henselae*, *B.v.berkhoffii*, *B. quintana*) (Duncan et *al.*, 2007), rendent ce mode de transmission possible entre ces animaux (Duncan et *al.*, 2007).

La transmission transplacentaire de *Bartonella*, établie chez les rongeurs n'a été mise en évidence ni chez le chat ni chez les bovins (Boulouis et *al*., 2008).

V. ÉTUDE CLINIQUE

V.1. Pathogénie

Chez les hôtes réservoirs, la persistance de la bactérie est liée d'une part à sa capacité de pénétrer et se multiplier dans les érythrocytes et les cellules endothéliales (Fig. 7) et d'autre part, à des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire (Dehio, 2005; Boulouis et *al*., 2008).

Les étapes de l'infection sanguine sont induites expérimentalement sur des modèles animaux. En 2001, l'équipe de Shulein propose le rat comme modèle de leur étude. Ils utilisent une souche recombinante de *B. tribucorum* exprimant des protéines fluorescentes, afin de visualiser la cinétique de l'invasion des globules rouges par la bactérie (Schulein et *al*., 2001) (Fig. 7).

Très rapidement après l'injection intraveineuse, l'inoculum bactérien est éliminé du sang circulant. Il colonise un premier site qui est toujours inconnu à l'heure actuelle. Cinq jours après l'inoculation, la bactérie réapparait dans le sang et simultanément adhère aux érythrocytes matures puis les envahit. Se produit alors une courte période de multiplication intracellulaire. Cette première phase d'infection érythrocytaire est suivie par des vagues de récurrence à des intervalles de 3 à 5 jours. Ainsi, tous les 5 jours, il y aurait relargage de bactéries à partir de la première niche colonisée. Ces bactéries infectent alors de nouvelles cellules ce qui explique la longue phase bactériémique (Fig. 7) (Schulein et *al*., 2001; Locatelli, 2003).

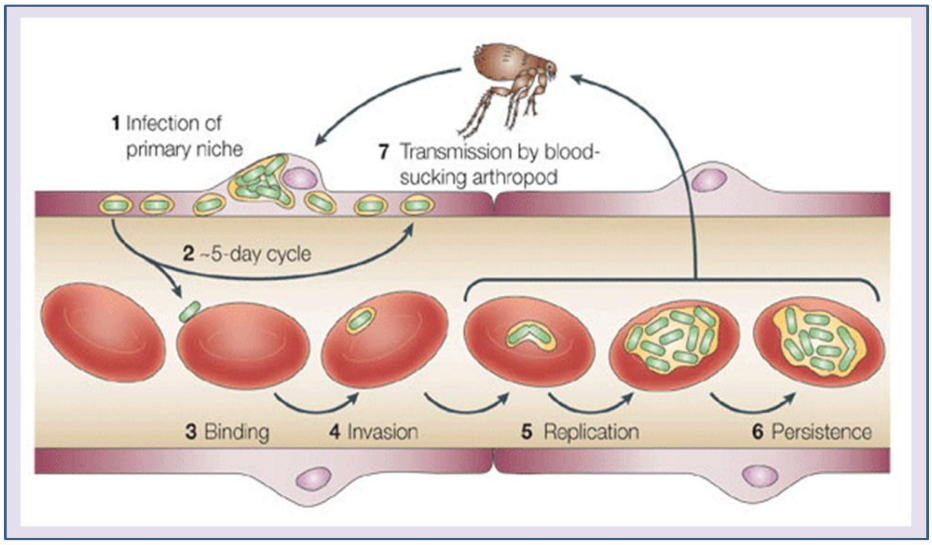


Fig. 7: Model d'évolution de l'infection par *Bartonella sp.* chez les hôtes réservoirs (Dehio, 2005)

Les caractéristiques de cette bactériémie au long terme sont bien décrites chez le chat infecté par *B. henselae* ou *B. clarridgeiae*. La durée de la bactériémie chez le chat varie de quelques mois à plusieurs années. Les récurrences consistent en l'apparition de pics de bactériémie détectables après la disparition de la bactériémie primaire (Fig. 8) (Yamamoto et *al.*, 2002; Boulouis et *al*., 2008).

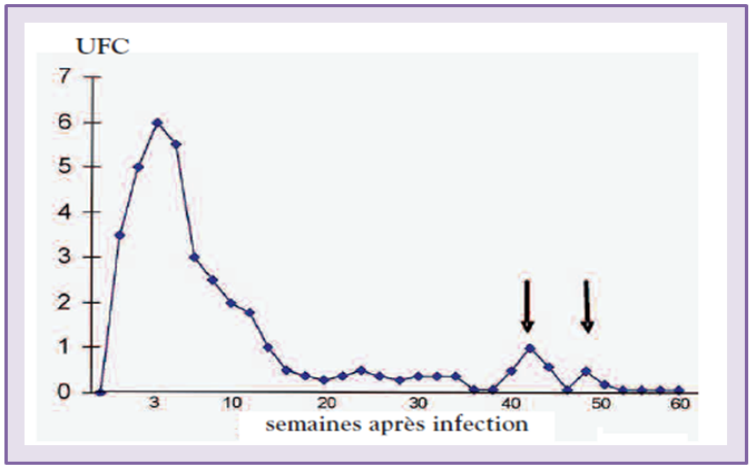


Fig. 8: Évolution de la bactériémie après infection expérimentale d'un chat par *Bartonella henselae*.
(UFC : Unité formant colonie ; les chiffres représentent des puissances de 10, les flèches indiquent les récurrences)
(Yamamoto et *al.*, 2002)

Chez l'homme et particulièrement chez les sujets immunodéprimés, la bactérie est responsable de lésions vasculaires prolifératives reposant sur deux mécanismes principaux : l'inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales et la stimulation de l'angiogénèse par un processus multifactoriel qui tend à accroître la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Dehio, 2005).

Une étude récente a prouvé qu'il y a une diminution du potentiel pathogène de *Bartonella henselae* chez des chats infectés par rapport à l'homme et suggère fortement que la sécrétion autocrine de VEGF par les cellules endothéliales de la peau de l'homme pourrait induire leur croissance et finalement conduire à la formation de l'angiomatose bacillaire (Berrich et *al*., 2011).

V.2. Symptômes

V.2.1. Conséquences de l'infection chez les réservoirs

Le Chat a longtemps été considéré comme un porteur sain de l'infection à *B. henselae* et *B. clarridgeiae* et les infections expérimentales vont plutôt dans ce sens. La reproduction d'une bactériémie s'accompagne rarement de symptômes (Boulouis et *al*., 2008). Ainsi selon les expérimentateurs, il a pu être décrit un épisode fébrile associé à une adénopathie et/ou un dysfonctionnement neurologique (léthargie, anorexie, douleur musculaire) ainsi qu'une lésion au point d'injection (Kordick et Breitschwerdt, 1997; O'reilly et *al.*, 1999), et parfois des troubles de la reproduction (Guptill et *al.*, 1998). Mais de tels signes ne sont pas détectés systématiquement et dépendent sans doute de la souche utilisée (Boulouis et *al*., 2008).

Récemment en Italie, *B. clarridgeiae* a été isolée chez un chat présentant une fièvre et une adénopathie sous-maxillaire (Capitta et *al*., 2010).

Cependant, un cas d'endocardite consécutif à une infection naturelle par *B. henselae* a été récemment décrit, rendant caduque cette notion de réservoir asymptomatique (Chomel et *al.*, 2003a).

D'autre part, chez les populations félines soumises à une infection naturelle, la présence d'anticorps contre *B. henselae* a été associée de façon significative à des infections rénales et urinaires, des stomatites ou des lymphadénopathies (Glaus et *al.*, 1997; Boulouis et *al*., 2005; Sykes et *al*., 2010). Enfin différents auteurs ont décrit des cas d'uvéite pour lesquelles *B. henselae* peut être incriminée, sur des bases sérologiques ou par PCR à partir de liquide de la chambre antérieure de l'œil (Lappin et *al.*, 2000).

Cependant, compte tenu de la fréquence de la bactériémie dans cette espèce, la démonstration de l'implication de *B. henselae* est difficile (Boulouis et *al*., 2008).

Des endocardites sont aussi décrites chez les bovins (Maillard et *al.*, 2007).

V.2.2. Conséquences de l'infection chez les hôtes accidentels

Les manifestations cliniques des bartonelloses commencent à être bien décrites chez le Chien. Les endocardites constituent les premiers symptômes observés (Breitschwerdt et *al.*, 1995). Les espèces de *Bartonelles* le plus souvent incriminées sont *B. vinsonii berkhoffii* et *B. clarridgeiae* (Chomel et *al.*, 2001; Sykes et *al.*, 2006). D'autres manifestations ont été recensées, mais semblent plus rares. Il s'agit en premier lieu d'atteintes granulomateuses ayant des localisations variées incluant rate, cœur, ganglions, foie, reins, poumons, médiastin, et glandes salivaires (Saunders et Monroe, 2006). Un épistaxis accompagné systématiquement d'une thrombocytopénie a été décrit chez trois chiens incriminant *B. vinsonii berkhoffii* ou *B. henselae* (Breitschwerdt et *al.*, 2005a).

Par ailleurs, des études épidémiologiques démontrent des associations entre une sérologie positive à *Bartonella* chez les chiens et ces différents tableaux cliniques : polyarthrites, jetage nasal, splénomégalie (Henn et *al.*, 2005), méningo-encéphalite, vascularite cutanée et uvéite (Breitschwerdt et *al.*, 2004; Goodman et Breitschwerdt, 2005).

La maladie chez le chien peut aussi être chronique avec des signes cliniques non spécifiques (perte de poids, anorexie, asthénie) (Mexas et *al*., 2002), ou asymptomatique (Euzéby, 2002). En effet, une étude a montré que des chiens en bonne santé peuvent être infectés par *B. vinsonii berkhoffii*. Sur une période de 16 mois, la bactérie a été isolée à 8 reprises chez un chien, une séroconversion coexistait à chaque fois avec la bactériémie (Locatelli, 2003).

Compte tenu de ces différents tableaux cliniques, le chien pourrait constituer un excellent modèle pour l'étude immuno-pathogénique des infections humaines à *Bartonella*, puisque les manifestations dans cette espèce sont assez similaires au tableau clinique chez l'homme et que les espèces de *Bartonella* incriminées chez le chien sont aussi celles qui ont été identifiées comme pathogènes dans l'espèce humaine (Annexe 5) (Boulouis et *al*., 2008).

VI. La maladie chez l'homme

Le nombre d'espèces zoonotiques de *Bartonella* identifiées dans les 20 dernières années a considérablement augmenté. Plusieurs espèces de *Bartonella* sont devenues pathogènes pour l'homme et provoquent divers symptômes avec des manifestations cliniques isolées qui permettent de qualifier ces maladies d'émergentes ou de ré émergentes (Boulouis et *al*., 2005a, 2007).

B. henselae est responsable d'adénopathie bénigne lors de la maladie des griffes du chat. L'expression de sa pathogénécité est dépendante du statut immunitaire des sujets infectés. L'angiomatose bacillaire (tumeurs vasoprolifératives) et la péliose hépatique (prolifération des capillaires sinusoïdes hépatiques) sont les manifestations cliniques les plus fréquentes chez les immunodéprimés (Boulouis et *al*., 2005a). *B. henselae* est, de plus, responsable d'endocardites chez les sujets porteurs de valvulopathie et peut être à l'origine de formes cliniques diverses telles que des bactériémies, rétinites, troubles musculosquelettiques, atteintes viscérales, méningoencéphalites, uvéites et myocardites (Edouard et Raoult, 2009). Les infections à *Bartonella* chez les personnes immunodéprimées sont plus souvent systémiques et peuvent entraîner la mort (Guptill, 2010).

En Algérie, Une étude menée à Alger entre 2000 et 2003 a permis de retrouver; par l'utilisation des techniques sérologiques, histologiques et de biologie moléculaire, *Bartonella quintana* dans un nombre élevé d'endocardites infectieuses à hémocultures négatives, soit 13 % de l'ensemble des cas (Benslimani et *al*., 2005, 2007).

VII. DIAGNOSTIC

VII.1. DIAGNOSTIC CLINIQUE

VII.1.1. Chez l'homme

Il est avant tout épidémio-clinique (LA Scola et Raoult, 1997), pour cela les bartonelloses humaines doivent être évoquées systématiquement devant les patients atteints (IFR48, 2006a, b): de la maladie des griffes du chat (***B. henselae***), de syndromes ganglionnaires chroniques (***B. quintana***), d'endocardite à hémocultures négatives (***B. quintana, B. henselae, B. elizabethae***), de septicémie (***B. quintana***), d'angiomatose bacillaire au cours de l'infection VIH (***B. quintana, B. henselae***) et de péliose hépatique au cours de l'infection VIH (***B. henselae***).

La présence de facteurs épidémiologiques tels que : griffure ou morsure de chat, éventuel contact avec des rongeurs, des puces, des tiques ou autres arthropodes hématophages peuvent suggérer une telle étiologie et devrait conduire aux tests spécifiques de *Bartonella* (Boulouis et *al*., 2005a).

VII.1.2. Chez les animaux domestiques

Le diagnostic clinique n'est pas généralement facile, car le tableau clinique de l'infection à *Bartonella* chez les animaux domestiques n'est pas totalement élucidé. La bartonellose doit être suspectée chez les chiens souffrant d'endocardite, surtout si elle touche la valve aortique (Chomel et *al*., 2001; Ohad et *al*., 2009). Il convient également de la soupçonner chez les chiens présentant une fièvre prolongée ou intermittente, une léthargie, une boiterie ou une maladie granulomateuse inexpliquée (Mexas et *al*., 2002; Saisongkorh et *al*., 2009).

De même, les vétérinaires devraient envisager de faire un test sérologique pour *Bartonella* chez les chiens malades, quand il ya une suspicion clinique ou épidémiologique sur l'exposition aux tiques (Boulouis et *al*., 2005a).

Chez les animaux réservoirs, le diagnostic de ces infections s'appuie principalement sur l'hémoculture, la sérologie et la recherche de l'ADN (par PCR) à partir de différents prélèvements (Boulouis et *al*., 2008).

VII.2. Diagnostic expérimental

L'importance croissante de cette zoonose émergente peut s'expliquer par l'identification de nouveaux agents pathogènes et de leur réservoir animal grâce à l'amélioration des moyens de diagnostic au laboratoire (Boulouis et *al*., 2008).

VII.2.1. Diagnostic direct

VII.2.1.1. Cultures

La culture peut être mise en œuvre à partir de sang prélevé sur EDTA ou de tout autre prélèvement réalisé stérilement (biopsie ganglionnaire, valves cardiaques, pus lors de suppuration, biopsies cutanées, biopsies ostéomédullaires ou autres biopsies d'organes lors de bactériémie…) (Boulouis et *al*., 2008; Edouard et Raoult, 2009).

Les bactéries du genre *Bartonella* peuvent être isolées soit en milieu axénique soit en culture cellulaire (La Scola et Raoult, 1997). Ainsi, *B. vinsonii* sous espèce *berkhoffii* a été isolée par culture pour la première fois du sang d'un chien atteint d'endocardite (Breitschwerdt et *al*., 1995).

La culture de ces bactéries requiert un laboratoire de niveau de sécurité 3 et de techniques d'expertise spécialisées (Bitan, 2002).

L'isolement de *Bartonella spp.* sur gélose à partir d'échantillons sanguins donne satisfaction lorsqu'on cherche à dépister la bactériémie chez les réservoirs. Il est décevant, quel que soit le prélèvement, chez les hôtes accidentels (Boulouis et *al*., 2008). Cependant, une pré-culture en milieu liquide (Maggi et *al*., 2005a) peut être pratiquée, couplée à l'isolement ou à la PCR. Ce type de technique utilisant un milieu relativement complexe a permis d'augmenter la sensibilité de détection de *Bartonella* chez les espèces non réservoirs y compris l'homme, les chiens, les chevaux et les animaux sauvages (Jones et *al.*, 2008; Breitschwerdt et *al*., 2007b, 2008; Bai et *al*., 2010).

L'identification des souches isolées s'appuie sur le temps de culture, l'aspect macroscopique et microscopique de la souche et sur la biologie moléculaire, seule susceptible d'établir définitivement l'identification de l'espèce (Boulouis et *al*., 2008).

VII.2.1.2. Colorations

B. henselae est difficile à observer avec les techniques de coloration habituelles, mais elle est visible par la coloration argentique de **Warthin-Starry** effectuée sur des coupes histologiques. C'est d'ailleurs cette coloration qui a permis de mettre en évidence le bacille dans les ganglions lymphatiques des patients atteints de la maladie des griffes du chat (Edouard et Raoult, 2009).

Lorsqu'une croissance bactérienne est détectée lors de la culture, une coloration de **Gimenez** peut être réalisée pour mettre en évidence le bacille intracellulaire (Fig. 9) (Edouard et Raoult, 2009).

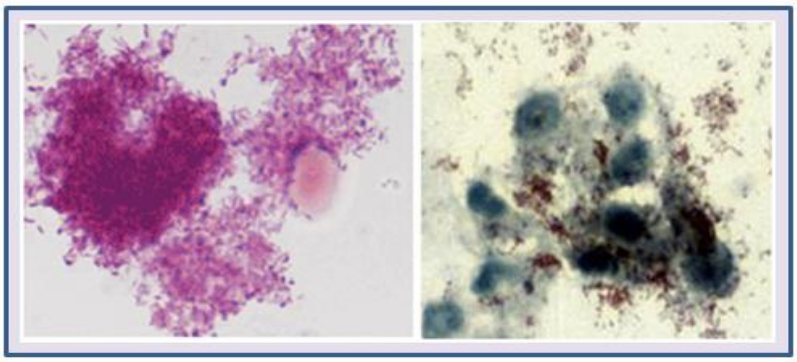


Fig. 9: Coloration de Gimenez de *B. henselae* (source Internet n ° 4 : http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/12/10-0647-f1.htm http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Bartonella_henselae.html)

VII.2.1.3. Immunofluorescence directe

Cette technique a permis de confirmer la localisation intra érythrocytaire de la bactérie, chez les chats naturellement infectés par *Bartonella henselae* à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'espèce (Fig. 10) (Rolain et *al*., 2001; Edouard et Raoult, 2009).

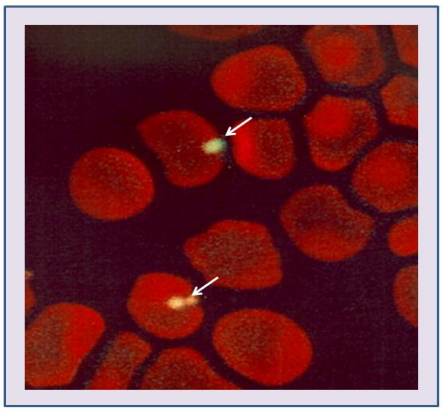


Fig. 10: Présence de *B. henselae* dans les globules rouges de chat, révélés après immunofluorescence directe [grossissement ×100] (Edouard et Raoult, 2009)

VII.2.1.4. Amplification génique par PCR

L'amplification de gènes par PCR constitue une méthode déterminante pour la mise en évidence des bactéries du genre *Bartonella* (Kamrani et *al*., 2008).

Elle est réalisée directement sur des tissus (peau, nœuds lymphatiques, valve cardiaque, foie, rein, cerveau, rate...), sur du sang total non coagulé ou bien sur des arthropodes (comme les puces, les tiques…) prélevés sur les patients ou les animaux suspects, ou indirectement à partir de la souche isolée (Kordick et *al*., 1999a; Boulouis et *al*., 2008; Duncan et *al*, 2008; Ohad et *al*., 2010).

Les gènes ou portion de gènes fréquemment utilisés pour une amplification spécifique de *Bartonella spp.* sont nombreux : ARNr 16s, ARNr 23s, gltA (citrate synthase), ITS (intergenic spacer region or spacer entre le 16S et le 23S), ribC (chaine α de la riboflavine synthase), rpoB (sous-unité β de l'ARN polymerase), Pap 31 (31-kDa major protein) et FtsZ (cell division protein) (Rolain et *al*., 2003; Saisongkorh et *al*., 2009 ; Edouard et Raoult, 2009) . Actuellement, le Centre National de référence des Rickettsioses (CNR) à Marseille utilise une combinaison d'au moins deux gènes spécifiques. Grâce à la PCR, les espèces et les souches de *Bartonella* peuvent être identifiées suite au séquençage des produits de la réaction. Les PCR quantitatives en temps réel utilisant des sondes spécifiques sont souvent utilisées (KIDD et *al*.,2008; Edouard et Raoult, 2009).

La PCR est plus sensible que la sérologie et la culture bactérienne, particulièrement concernant la détection de l'ADN de *Bartonella* dans les tissus de chien et de chat (Kordick et *al*., 1999a; Saunders et Monroe, 2006; Guptill, 2010).

VII.2.2. Diagnostic indirect

VII.2.2.1. Immunofluorescence indirecte (IFI)

L'immunofluorescence indirecte reste la technique de choix pour établir un diagnostic indirect de l'infection (Fig. 11) (Boulouis et *al*., 2007).

La sérologie est d'intérêt plus limité dans les espèces réservoirs, en particulier féline : une sérologie positive ne renseigne pas sur l'état bactériémique de l'animal (Chomel et *al*., 1995; Boulouis et *al*., 2008).

De plus, l'IFI est utilisée aussi pour la détection des *Bartonella* chez les chiens. Cependant, Il existe des preuves croissantes que les chiens naturellement infectés par *Bartonella* (tel que déterminé par tests de PCR) peuvent être séronégatifs (Diniz et *al.*, 2007; Duncan et *al.*, 2008). L'ampleur de ce phénomène n'est pas encore bien déterminée, mais il est suggéré que la sérologie n'est pas un test aussi sensible pour les chiens que pour les chats (Guptill, 2010).

L'immunofluorescence indirecte présente toutefois certaines limites. En effet, de nombreuses réactions croisées existent entre les différentes espèces de *Bartonella*. De plus, diverses réactions croisées ont été rapportées avec d'autres bactéries intracellulaires telles que *Chlamydia sp*. (Maurin et *al*., 1997) et *Coxiella burnetii* (La Scola et Raoult, 1996).

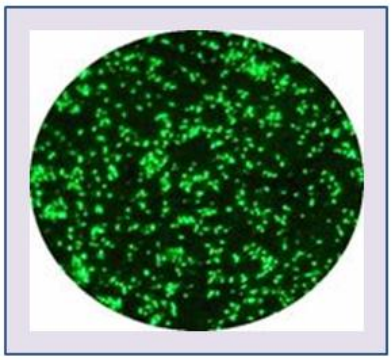


Fig. 11 : Immunofluorescence indirecte positive pour *B. henselae* chez un patient atteint de maladie des griffes du chat (IFR 48, 2006a)

VII.2.2.2. Western-Blot

Le western blot avec adsorption croisée permet à la fois de poser le diagnostic d'endocardite et d'identifier l'espèce en cause dans 96 % des cas d'endocardites à *Bartonella* (Houpikian et Raoult, 2003).

VIII. TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

VIII.1. Traitement

Bartonella présente un haut niveau de sensibilité *in vitro* à de nombreux antibiotiques en particulier ceux présentant une bonne pénétration intracellulaire (Maurin et *al.*, 1995).

Chez le chien, l'azithromycine ainsi que la doxycycline ou l'enrofloxacine, seraient les antibiotiques de choix lors d'une infection à *Bartonella.* Ces antibiotiques ont été utilisés pour le traitement des uvéites (doxycycline) (Michau et *al.*, 2003), des endocardites (amoxycilline-acide clavulanique ou enrofloxacine suivis de doxycycline) (Breitschwerdt et *al.*, 1995; Chomel et *al.*, 2001; Chomel et *al.,* 2003a,b), des atteintes granulomateuses (azithromycine) et de l'hépatite granulomateuse (enrofloxacine ou doxycycline) (Gillespie et *al.,* 2003). Cependant, l'efficacité de ces protocoles thérapeutiques antibiotiques reste difficile à évaluer chez le chien (Boulouis et *al*., 2008).

Chez le chat, ce traitement peut induire une diminution de l'intensité de la bactériémie mais ne modifie ni sa durée, ni les éventuelles récurrences constatées expérimentalement ou lors d'infection naturelles. Donc, le traitement de ces infections chez les animaux réservoirs reste aléatoire et ne permet pas une éradication définitive de la bactérie (Boulouis et *al*., 2008).

VIII.2. Prophylaxie

Puisque la protection croisée est absente ou incomplète entre les isolats de *Bartonella*, probablement en raison de la variation génétique, le développement de vaccins est devenu difficile (Guptill, 2010). Il n'existe actuellement aucun vaccin (Edouard et Raoult, 2009).

La prévention des infections à *Bartonella* chez l'homme est mieux accomplie en évitant l'exposition aux animaux infectés et aux vecteurs arthropodes (Chomel et Kasten, 2010).

La principale mesure préventive à prendre pour réduire le risque de développer la maladie des griffes du chat chez l'homme, repose sur l'éviction d'être griffé ou mordu par des chats ainsi que l'hygiène des mains et une désinfection complète des plaies (Chomel et Kasten, 2010; Boulouis et *al*., 2005a). Des études récentes ont toutefois montré la difficulté d'éradiquer *B. henselae* chez les chats bactériémiques. Les sujets immunodéprimés, notamment ceux infectés par le VIH, doivent éviter le contact avec les chats, seul moyen prophylactique réellement efficace à ce jour (Raoult et Brouqui, 1998).

L'utilisation très régulière de produits pulicides est l'une des principales mesures de prophylaxie dans le contrôle de l'infection et de la contamination du réservoir félin et potentiellement de sa transmission au chien et à l'homme (Breitschwerdt, 2008; Kamrani et *al*., 2008; Chomel et Kasten, 2010). La prévention de l'infection à *Bartonella* chez les chiens est principalement basée sur le contrôle des tiques (Boulouis et *al*., 2005a).

IX. CONCLUSION

Au cours des quinze dernières années, les données accumulées sur le genre *Bartonella* ont permis de mettre au jour l'extrême diversité des animaux lui servant d'hôtes réservoirs. Le nombre croissant de nouvelles espèces isolées d'animaux s'accompagne d'une augmentation du nombre d'espèces de *Bartonella* zoonotiques (Boulouis et *al*., 2008).

Les chats ont été identifiés comme un réservoir principal d'espèces de *Bartonella* et jouent un rôle important comme source pour l'infection humaine.

L'amélioration des techniques d'isolement a permis de mieux détecter les infections humaines et canines et de documenter sur la présence de nouvelles espèces de *Bartonella* dans ces infections (Chomel et Kasten, 2010).

2ème PARTIE
ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I
Matériels & Méthodes

L'objectif de notre travail est de rechercher les agents de rickettsioses et de bartonelloses, par la technique d'amplification génique (PCR), chez les réservoirs animaux (chiens et chats errants) dans la région d'Alger.

MATERIELS

I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

I.1. Lieu et période de l'étude

I.1.1 Collecte de prélèvements

Une période de collecte de prélèvements a été effectuée de Décembre 2010 à Mars 2011 au niveau de la fourrière canine de la wilaya d'Alger.

Présentation de la fourrière :

La wilaya d'Alger ne dispose que d'une seule fourrière canine située dans la commune d'El-Harrach et dépendant du bureau d'hygiène communal de la ville d'Alger (HURBAL). Elle est en activité depuis plus d'un siècle et ayant en charge la lutte contre les zoonoses qui présentent un problème de santé publique.

La fourrière a pour rôles de :

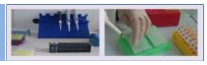
- Capturer et de prendre en charge les animaux dangereux ou errants ;
- Mettre en observation les animaux suspects de maladies contagieuses telle que la rage ;
- Euthanasier ces animaux en cas de maladies incurables ou sénilité ;
- Restituer les animaux capturés réclamés par leurs propriétaires ;
- Abattre et enfouir les animaux morts après chaulage.

Les champs d'action de la fourrière canine :

Pour capturer les chiens et les chats errants, les agents interviennent dans les voies publiques au niveau de 57 communes de la wilaya d'Alger en collaboration avec :

- Les bureaux communaux d'hygiène ;
- Les collectivités (hôpitaux, hôtels, cités universitaires, sociétés privées et étatiques..) ;
- Au domicile des citoyens.

Le rayon peut être exceptionnellement plus grand lorsque la capture a lieu dans les wilayas limitrophes (Boumerdes, Tipaza et Blida) (Benjaballah, 2006).



I.1.2 Analyse des prélèvements

Une période d'analyses de prélèvements a été effectuée dans le laboratoire d'écologie des systèmes vectoriels à l'annexe El-Hamma de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), qui a duré 4 mois.

I.2. Population étudiée

L'essai concerne des chiens et des chats errants au niveau de la fourrière canine d'El Harrach. Ces animaux examinés par nos soins sont de tout âge et sexe. Un total de 55 chiens et 45 chats est prélevé.

Ces animaux sont capturés par l'équipe de la fourrière dans les différentes communes de la wilaya d'Alger dans le cadre des compagnes sanitaires organisées dans la capitale. Les chiens et les chats sont ensuite transportés dans des cages jusqu'aux locaux de séquestration de la fourrière. L'échantillonnage est donc établi de façon fortuite.

Après une semaine de séquestration, les chiens sont abattus à l'aide d'une décharge électrique de 380 volts. L'abattage se fait une fois par semaine (chaque jeudi) et exceptionnellement 2 fois par semaine (jeudi et mardi).

I.3. Type de prélèvements

En vue de rechercher les différentes espèces de rickettsies et de bartonelles chez ces réservoirs animaux, des rates sont prélevées sur des chats et des chiens juste après leur abattage.

I.4. Fiche de renseignements

Une fiche de renseignement est établie pour chaque animal, sur laquelle sont notés, notamment l'espèce, la race, le sexe et l'âge de l'animal ainsi que la présence ou absence d'ectoparasites (tiques ou puces) (Annexe 6).

II. MATÉRIEL NON BIOLOGIQUE (Annexe 7)

METHODES

I. TECHNIQUE DE PRÉLÈVEMENT

I.1. Rappel anatomique

La rate est le plus volumineux organe lymphoïde périphérique, située dans la loge sous-diaphragmatique gauche (Fig. 12). C'est un organe mou délimité par une capsule, et qui présente une dépression en regard de l'estomac, le hile, par lequel pénètrent les vaisseaux spléniques. Physiologiquement, sa position varie en fonction de l'état de réplétion de l'estomac et lors d'une splénomégalie importante, elle peut s'étendre jusqu'au pubis. Chez le chien, elle est relativement peu mobile et maintenue en place par les ligaments spléno-colique et gastro-splénique. De grandes variations de formes et de tailles existent selon les espèces, son poids correspond à 0,2 % du poids total chez les carnivores. Dans les conditions physiologiques, chez le chien, elle pèse de 8-150 g selon la race et la taille de l'individu ; chez le chat, elle est de 2 à 25 g. Sa longueur varie de 8 à 30 cm chez le chien, et de 8 à 14 cm chez le chat (Noroy, 2003).

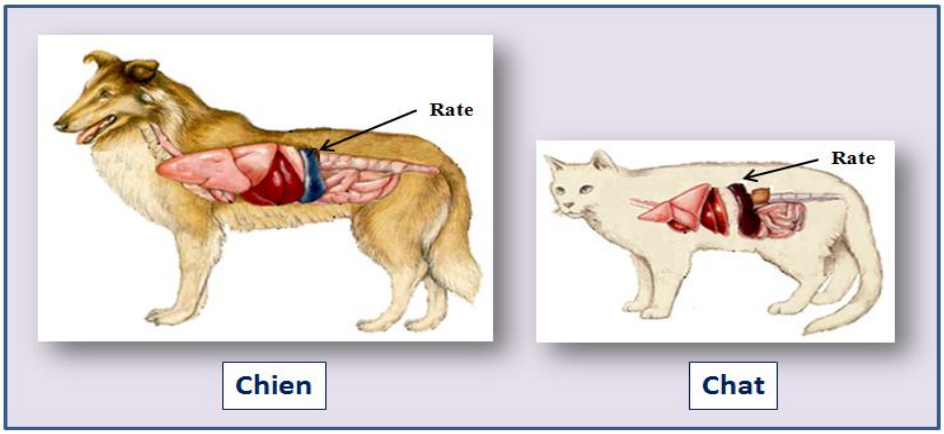


Fig. 12: Anatomie interne de chien et de chat (source Internet n°5 : http://www.vetmed.wsu.edu/cliented/anatomy/)

I.2. Préparation de l'animal

L'examen général s'effectue après une bonne contention de l'animal et la mise d'une muselière. Une fiche de renseignements numérotée auparavant est remplie en mentionnant une éventuelle présence d'ectoparasites ainsi que les informations relatives à l'animal (espèce, sexe, âge…).

Juste après l'abattage, je dépose l'animal en décubitus latéral droit sur une table propre, ensuite je pratique un bon rasage au niveau de la partie abdominale gauche. Après une désinfection

rigoureuse à ce niveau à l'aide du coton imbibé d'alcool, je dépose des champs propres autour de l'endroit où l'incision va avoir lieu dans le but de minimiser le degré de contamination.

I.3. Préparation du matériel

Une trousse à dissection est préparée, composée de : pinces, sonde cannelée, scalpel, paires de ciseaux et un écarteur chirurgical. Le matériel est préalablement décontaminé à l'autoclave au niveau de l'Institut Pasteur (Fig. 13).

Fig. 13: Étapes de décontamination du matériel de prélèvement (Personnelle, 2011)

Des tubes à vis sont préparés et étiquetés en vue de noter le numéro du prélèvement de la fiche de renseignement correspondante pour chaque animal. Ces tubes stériles sont utilisés pour les prélèvements d'organes.

I.4. Prélèvement de la rate

Au niveau de la partie haute de l'abdomen gauche juste derrière la dernière cote, je réalise une petite incision de la peau à l'aide des ciseaux et une pince. Je maintiens l'incision ouverte par un écarteur, puis j'incise les plans musculaires ainsi que le péritoine plan par plan jusqu'à l'apparition de la rate. Si l'accès à cette dernière n'est pas direct je peux la rechercher autour de l'incision.

Une fois l'organe cible est repéré, je le maintiens grâce à une pince, ensuite je prélève un petit bout de rate à l'aide d'un bistouri puis je l'introduis directement dans un tube à vis stérile. Ces tubes sont fermés hermétiquement, pour éviter tout risque de contamination lors du transport.

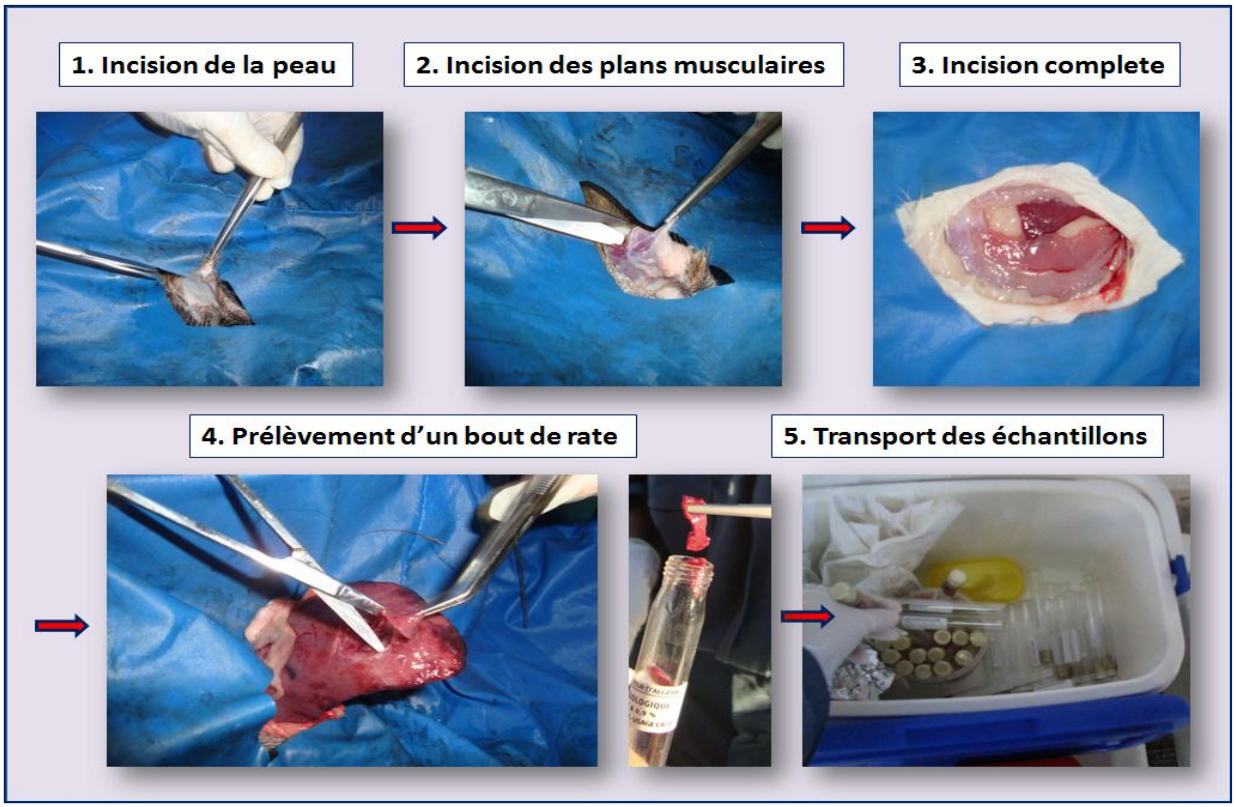


Fig. 14: Étapes de prélèvement et transport des échantillons d'organes (Personnelle, 2011)

II. TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

Les prélèvements sont acheminés rapidement au laboratoire sous froid dans une glacière.

III. CONSERVATION DES ORGANES

Les échantillons sont conservés dans l'éthanol absolu à température ambiante. Chaque rate identifiée reçoit un code nécessaire pour l'analyser ultérieurement par PCR (Fig. 15).

Un contrôle des codes d'identification est nécessaire en s'assurant que les étiquettes sont lisibles et bien colées.

Fig. 15 : Identification et conservation des prélèvements d'organes (Personnelle, 2011)

IV. EXTRACTION D'ADN

IV.1. Principe

L'extraction totale de l'ADN génomique nécessite trois étapes distinctes (Chesnay et *al*., 2004) :

1. Lyse cellulaire : les tissus sont macérés dans une solution de lyse cellulaire (tampon ATL). Celle ci décompose les tissus et rompe fondamentalement les cellules et les membranes nucléaires. Par conséquent, l'ADN (qui se retrouve en suspension dans la solution) sera exposé aux protéines des tissus. L'ajout de l'enzyme protéinase K est indispensable pour dénaturer les protéines contaminantes et digérer les nucléases (enzymes qui dégradent les acides nucléiques) et donc protège et garde l'ADN intact. Le AL est ajouté pour compléter la lyse. Enfin, l'éthanol est utilisé pour précipiter l'ADN à partir du matériel extrait.

2. Élimination des débris cellulaires : après la destruction des enzymes hydrolytiques et la précipitation de l'ADN, le processus de purification d'ADN est réalisé. Les composants cellulaires, y compris l'ADN sont placés dans des colonnes à filtre. Après centrifugation, tous les débris vont passer à travers le filtre sauf l'ADN qui reste dans le filtre (L'ADN précipité se retrouve fixé sur la membrane de la colonne et le filtrat est rejeté). Cette étape sera suivie par deux étapes de lavage qui purifie l'ADN des débris cellulaires à l'aide de deux tampons (AW1 et AW2).

3. Dilution et récupération de l'ADN purifié : cette étape permet de supprimer l'ADN du filtre. Ceci est fait en ajoutant le tampon d'élution (AE) qui permet d'éluer l'ADN dans le tube collecteur et permet un stockage stable de l'ADN dans le réfrigérateur ou le congélateur pour une longue durée.

IV.2. Protocole d'extraction d'ADN

Cette étape consiste en l'extraction des acides nucléiques (ADN) à partir des organes (rates), à l'aide d'un Kit spécial QIA amp (kit QIAGEN®, Hilden, Germany). Ce Kit est un système générique utilisant la technologie QIAamp pour extraire et purifier l'ADN génomique (Fig. 16).

Le protocole d'extraction est appliqué conformément aux instructions du fabricant (QIAAMP® DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2007).

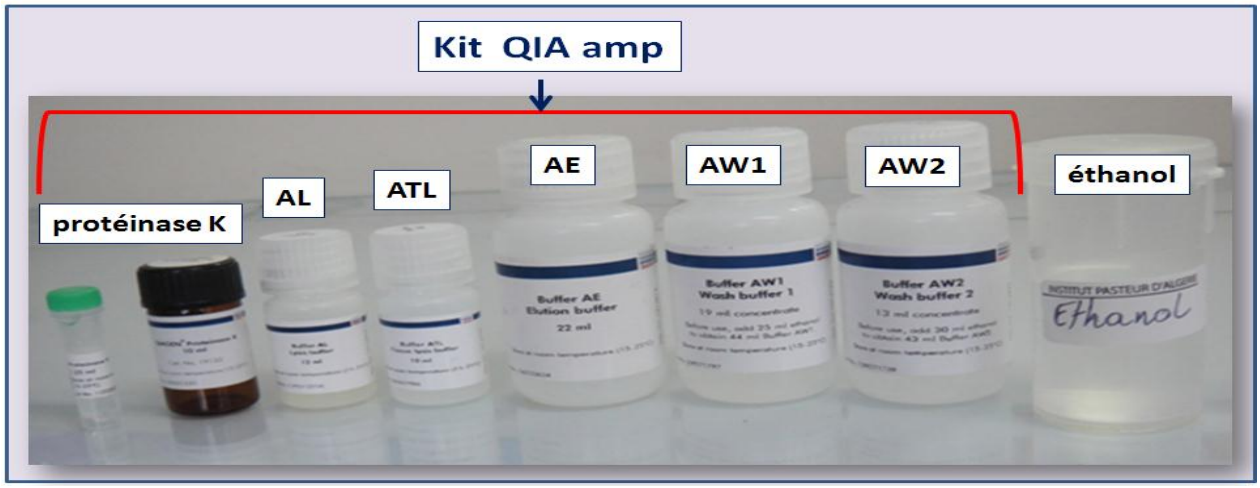


Fig. 16 : les réactifs du Kit QIA amp utilisés pour l'extraction d'ADN (Personnelle, 2011)

L'extraction est réalisée dans des conditions d'hygiène rigoureuse (sous une hotte à flux laminaire, port de gants stériles, masque et lunettes de protection).

1. En première étape, je décontamine le matériel d'extraction pendant 30 min sous UV avant son utilisation.

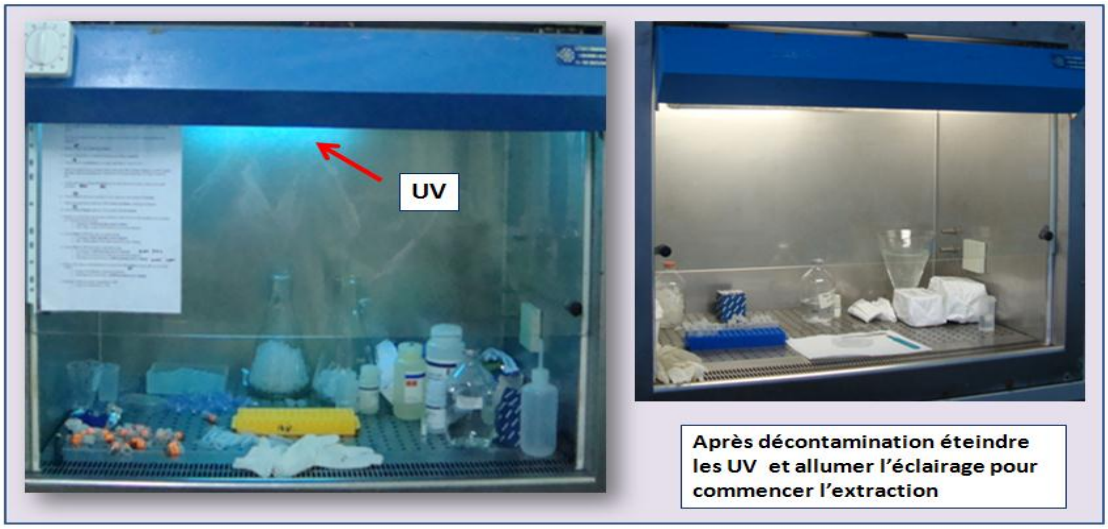


Fig. 17: Décontamination aux UV du matériel d'extraction (Personnelle, 2011)

2. Les tissus conservés dans l'éthanol absolu doivent être rincés à l'eau distillée stérile (1).

3. Je prends les échantillons, je les coupe en petit morceaux à l'aide d'une pince et un bistouri (2) puis j'introduis qu'une petite quantité de rate (environ 10 mg) dans des tubes Eppendorf (3).

Remarque : Le rendement de l'ADN dépendra à la fois de la quantité et du type de tissu traité.

1 mg de tissu donne environ 0,2 à 1,2 µg d'ADN (QIAAMP® DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2007).

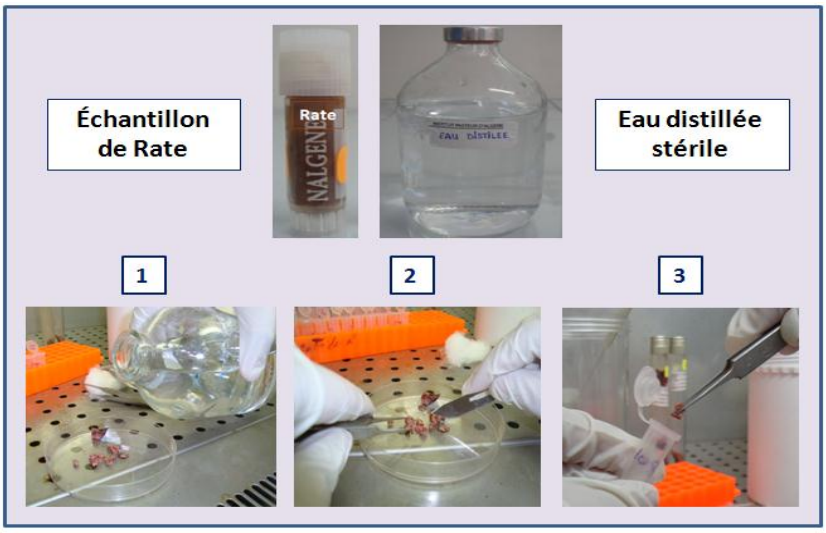


Fig. 18: Étapes de préparation des échantillons de rates avant l'ajout des réactifs d'extraction (Personnelle, 2011)

NB : le matériel utilisé est désinfecté (boite de pétrie, bistouri et pince) après chaque échantillon avec du coton imbibé d'alcool.

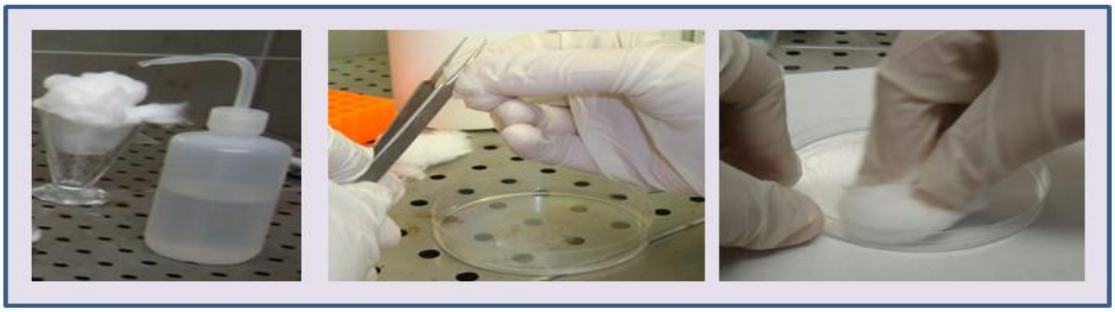


Fig. 19 : Désinfection du matériel avec l'alcool (Personnelle, 2011)

4. J'ajoute 180µl d'**ATL.**

NB : L'embout de la micropipette est changé à chaque fois pour éviter les contaminations entre les échantillons (même procédure pour toutes les étapes suivantes).

5. Je broie les échantillons en utilisant un broyeur pour chaque échantillon.

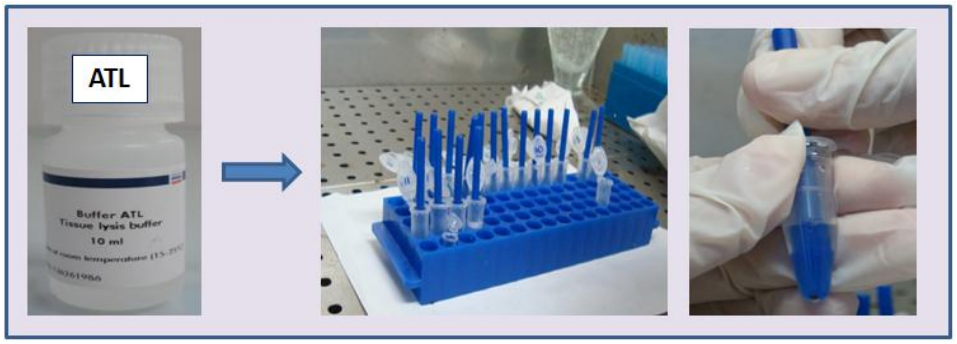


Fig. 20 : Ajout de l'ATL et broyage des échantillons (Personnelle, 2011)

6. J'ajoute 20µl de la **protéinase K**, puis j'effectue une agitation rapide à l'aide du vortex.

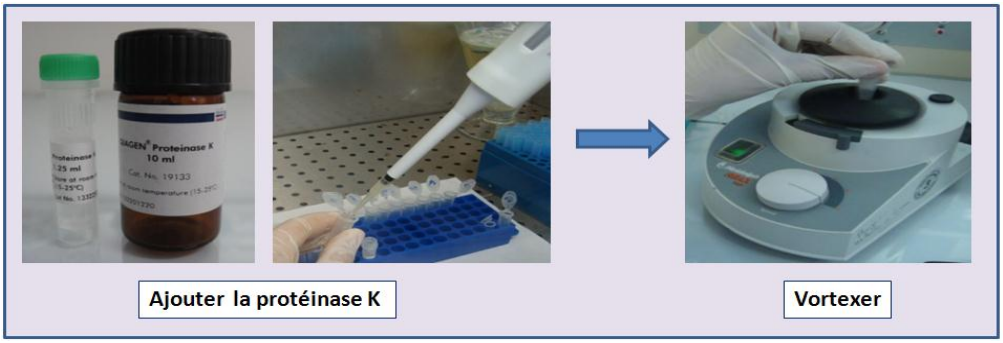


Fig. 21 : Ajout de la protéinase K (Personnelle, 2011)

7. Je mets les échantillons en incubation dans le bain à sec à 56°C pendant 2 heures, ou à 37°C pendant une nuit, conditions optimales pour l'activation de l'enzyme responsable de la dénaturation des protéines.

8. Je fais une centrifugation rapide pendant 30 secondes.

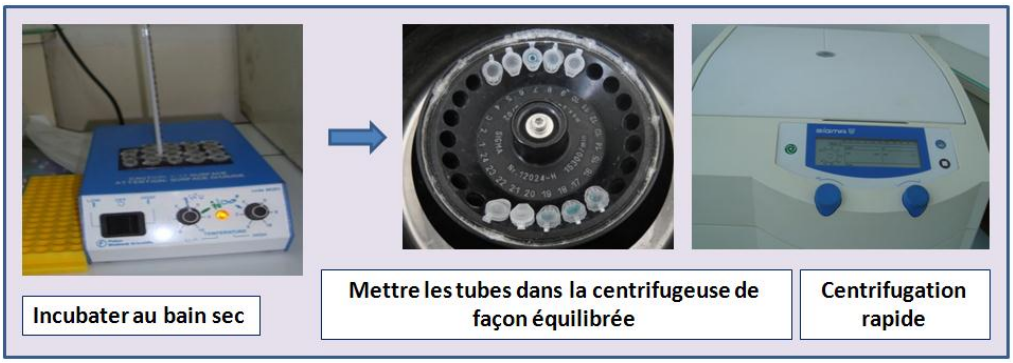


Fig. 22 : Incubation et centrifugation (Personnelle, 2011)

9. J'ajoute 200µl de **AL** puis j'agite au vortex pendant 15 secondes.

10. Je mets les échantillons au bain sec à 70°C pendant 10 minutes (cette incubation permet de finir l'étape de digestion), ensuite je centrifuge rapidement.

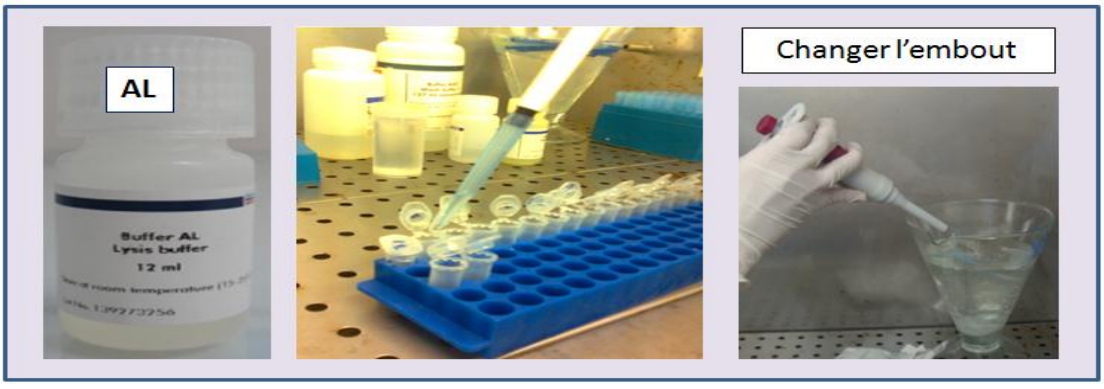


Fig. 23 : Ajout de AL (Personnelle, 2011)

11. J'ajoute 200µl d'éthanol (96 - 100%), puis j'agite au vortex pendant 10 à 15 secondes.

NB : A part l'éthanol, les autres types d'alcools ne sont pas utilisés, car ils peuvent entraîner une baisse de rendement d'ADN.

Fig. 24 : Ajout de l'éthanol (Personnelle, 2011)

12. Je verse le mix dans les tubes collecteurs à filtre préalablement numérotés, en évitant de verser les débris avec le contenu car cela peut bloquer le filtre.

- Je centrifuge à 8.000 tours/min pendant 1minute.
- Je jette l'éluât et je place le filtre dans un nouveau tube collecteur.

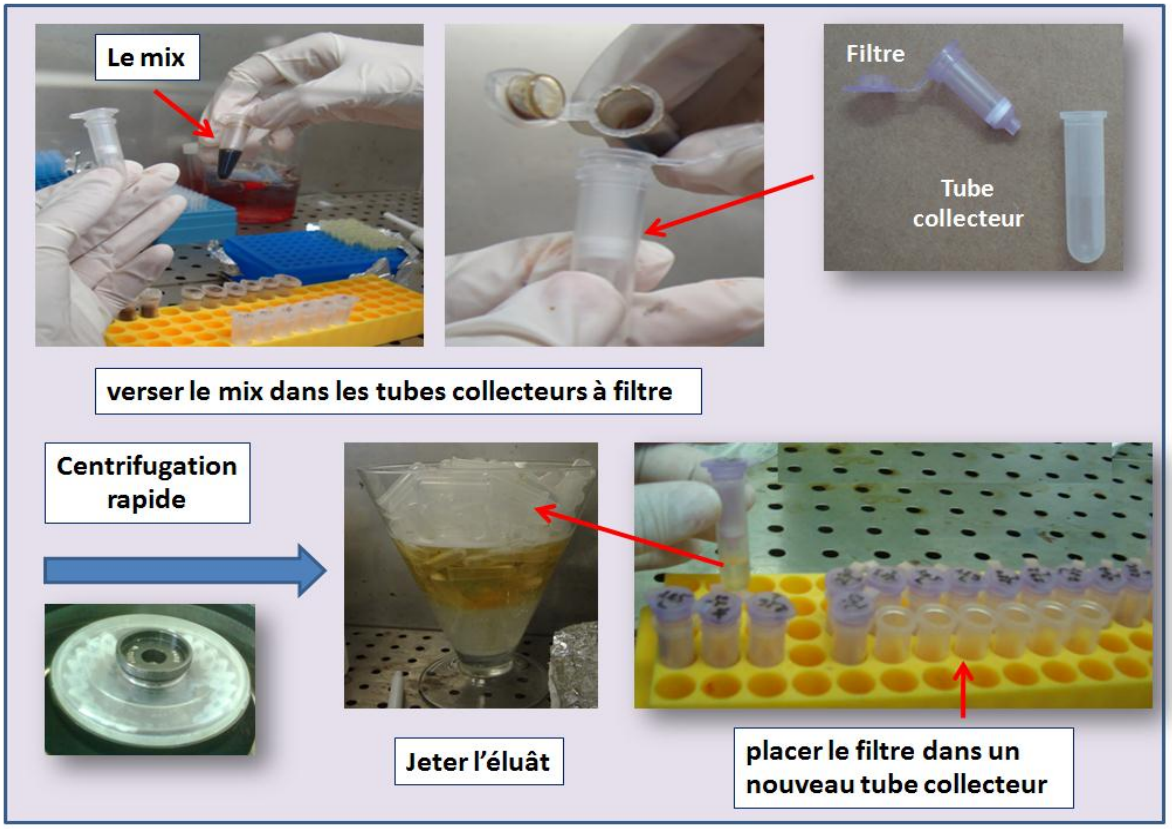


Fig. 25 : Versement dans le tube collecteur (Personnelle, 2011)

13. J'ajoute 500µl de **AW1** pour faire un premier lavage :

- Je centrifuge à 8.000 tours/min pendant 1minute.
- Je jette l'éluât et je place le filtre dans un nouveau tube collecteur.

14. J'ajoute 500µl de **AW2** pour faire un deuxième lavage :

- Je centrifuge à 14.000 tours/min pendant 3 minutes.
- Je jette l'éluât et je place le filtre dans un nouveau tube collecteur.
- Je centrifuge une nouvelle fois à 14.000 tours/min pendant 1 minute.

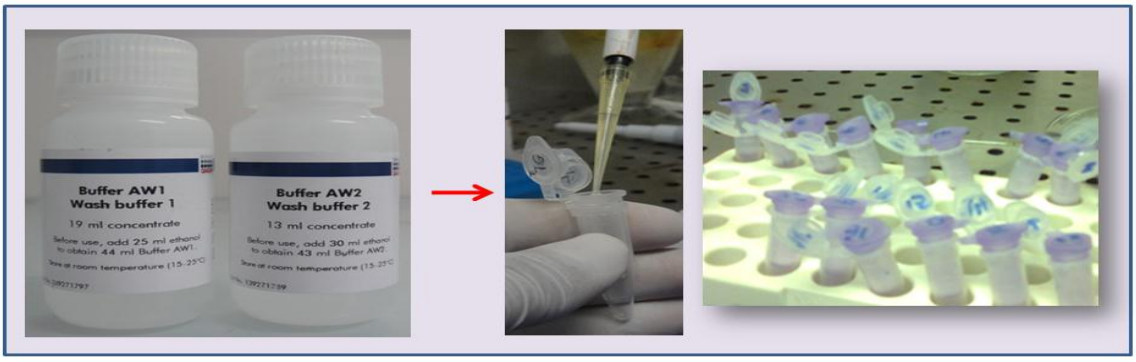


Fig. 26 : Ajout de AW1 et AW2 (Personnelle, 2011)

15. Je place le filtre dans un tube Eppendorf préalablement numéroté et j'ajoute entre 150 à 200µl de tampon **AE** :

- J'incube 1 à 5 minutes à température ambiante (pour augmenter le rendement de l'ADN).
- Je centrifuge une dernière fois à 8.000 tours/min pendant 1minute.

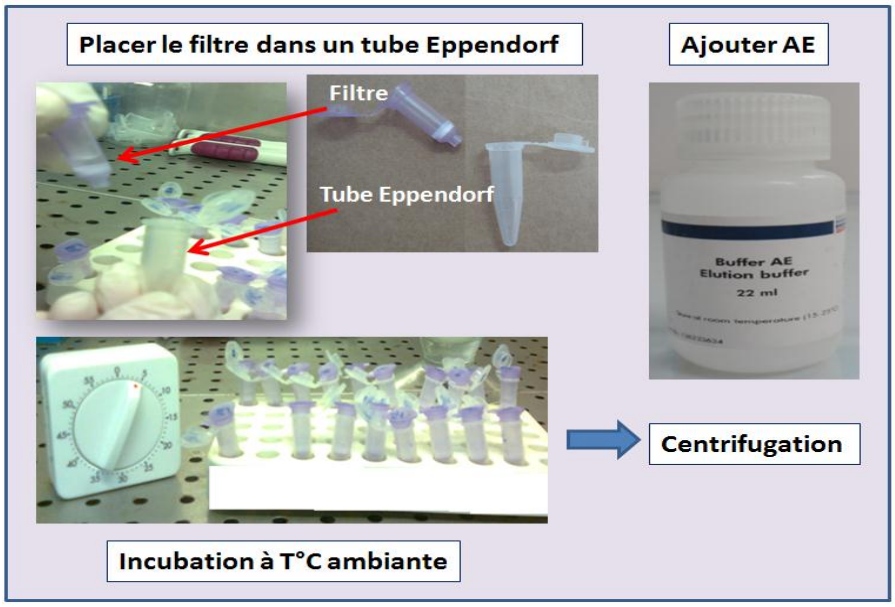


Fig. 27 : Ajout de AE (Personnelle, 2011)

16. Je récupère l'éluât qui contient l'échantillon d'ADN :

- Je conserve l'ADN obtenu à + 4°C.

Fig. 28 : Récupération et conservation des échantillons d'ADN (Personnelle, 2011)

V. LA PCR STANDARD

V.1. Principe

C'est une technique décrite en 1985 par Kary Mulis qui a reçu le prix Nobel de Chimie en 1993 pour cette invention (Etienne, 2000).

En résumé, La réaction de polymérisation en chaîne (P.C.R) est une technique de biologie moléculaire qui consiste à amplifier *in vitro* une partie spécifique du matériel génétique ARN ou ADN (par exemple dans notre cas : recherche de l'ADN de *Rickettsia* et celui de *Bartonella*), par répétition d'élongation, en présence d'amorces nucléotidique spécifiques et d'une ADN polymérase.

La découverte d'une eubactérie marine thermophile vivant dans les sources chaudes, *Thermus aquaticus*, et l'utilisation par la suite de sa polymérase, stable jusqu'à des températures proches de 100°C, est à l'origine du développement de cette technique (Etienne, 2000).

L'intérêt de la PCR est d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant (pauvre en matériel bactériologique) des millions de copies d'ADN recherché, en quelques heures, au point de le rendre visible à l'œil.

L'utilisation des techniques de détection moléculaire, spécialement la PCR couplée au séquençage est d'une importance capitale pour la caractérisation initiale des espèces de *Bartonella* et de *Rickettsia* ainsi que pour l'association de ces différentes espèces à une variété de maladies et à de nombreux réservoirs. Les chercheurs ont donc mis en place des promoteurs spécifiques d'espèces, ce qui facilite l'utilisation directe de la PCR sur les échantillons prélevés (Nedjma et *al*., 2005).

V.2. Première étape : « La PCR proprement dite »

V.2.1. Préparation du mix

1. Je stérilise le matériel sous hotte à UV pendant 30 minutes.

Fig. 29: Décontamination aux UV du matériel utilisé pour le mix (Personnelle, 2011)

2. Préparation du mix :

Cette opération doit être faite sous des conditions aseptiques dans une pièce isolée et sous une hotte à UV pour éviter toute contamination du mix, avec le port de gants stériles.

Le mix de PCR doit contenir :

- **Le tampon (Buffer)** : qui sert à stabiliser le pH du milieu réactionnel en vue d'optimiser l'activité de la Taq polymérase. Car il contient des cations (Mg^{2+}, K^{+} ou NH_4^{+}) qui vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN.
- **Des désoxynucléotides** : le mélange des dNTPS (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) doit être préparé avant la préparation du mix (Fig. 30).

NB : La concentration de chaque dNTP est de 100 mM.

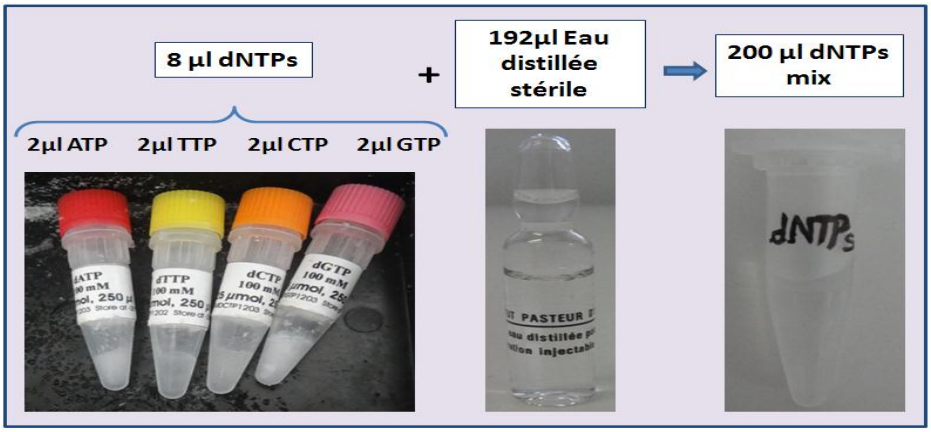


Fig. 30 : Préparation de la solution de dNTPs (Personnelle, 2011)

- **Du $MgCl_2$** : qui donne un pH et une concentration saline optimale au bon fonctionnement des amorces et de la Taq polymérase pour une hybridation spécifique.
- **Deux amorces** : aussi appelées « primers », contenant une courte chaîne de 20 à 30 oligonucléotides complémentaires des extrémités du fragment à amplifier. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire. Ces 2 amorces ont leur extrémité 3-prime (3') dirigée l'une vers l'autre encadrant ainsi la séquence d'ADN à amplifier (étape 2 du cycle de PCR). Les amorces hybridées servent de point de départ pour la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice car elles sont indispensables à l'accrochage de la Taq polymérase (étape 3 du cycle de PCR) (Denis et Ploy ,2007).
- **La Taq polymérase** : est capable d'amplifier l'ADN, avec des amorces différentes, en ajoutant des désoxynucléotides. Cette enzyme a la propriété de résister à de très hautes températures et de rester active pendant la réaction (Denis et Ploy ,2007).

  Dans notre mix, nous avons utilisé la « Hot Start » qui est une enzyme ayant un inhibiteur (protéine chaperonne ou molécule chimique). Cet inhibiteur est enlevé par le biais d'un chauffage de l'enzyme à 95°C pendant 10 ou 15 minutes (étape 1 du cycle de PCR). De ce fait la Taq polymérase n'est activée que pendant la réaction de PCR.

Tous les réactifs du mix doivent être préservés à - 20 °C pour en garantir leur bon fonctionnement.

Toutes les solutions doivent être décongelées à l'exception de la Taq polymérase qui doit restée dans le congélateur jusqu'à son utilisation pour évier la dégradation de cette enzyme.

Les produits du mix et leurs volumes nécessaires pour un seul échantillon sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Produits du mix (Bitam, 2008; Bitam et *al*., 2009a; 2009b)

Produits	Concentration	Volume pour un seul échantillon
Buffer	10x	2,5µl
dNTPs mix	Fig. 30	2,5µl
$MgCl_2$	2,5 mM	1µl
Primer 1	1/100	0,5µl
Primer 2	1/100	0,5µl
Taq Polymérase	5 Unité/ µl	0,125µl
Eau distillée stérile	----	13µl
Total du mix	**----**	**20µl**

La Taq polymérase, le Buffer, le $MgCl_2$ et les dNTPs (kit QIAGEN®, Hilden, Germany)

Les amorces (Eurogentec, Seraing, Belgium)

Remarque 1 :

L'eau distillée stérile est utilisée pour diluer les réactifs afin d'obtenir une certaine concentration et atteindre le volume voulu pour la réaction.

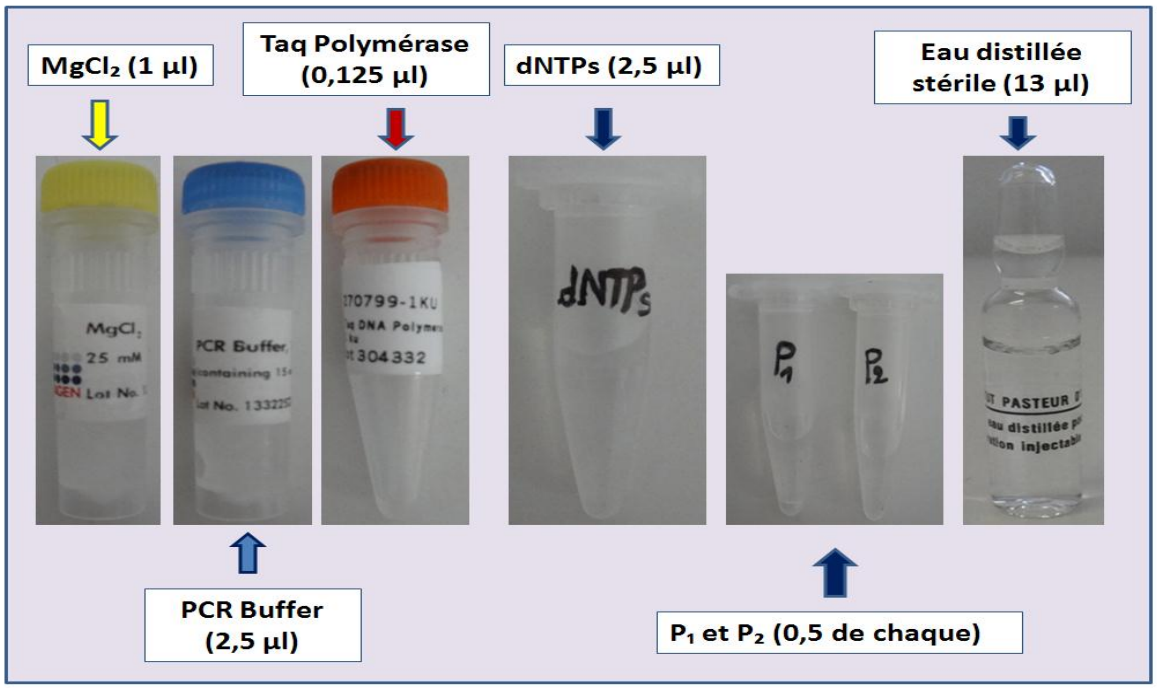


Fig. 31 : Réactifs du Mix pour la PCR (Personnelle, 2011)

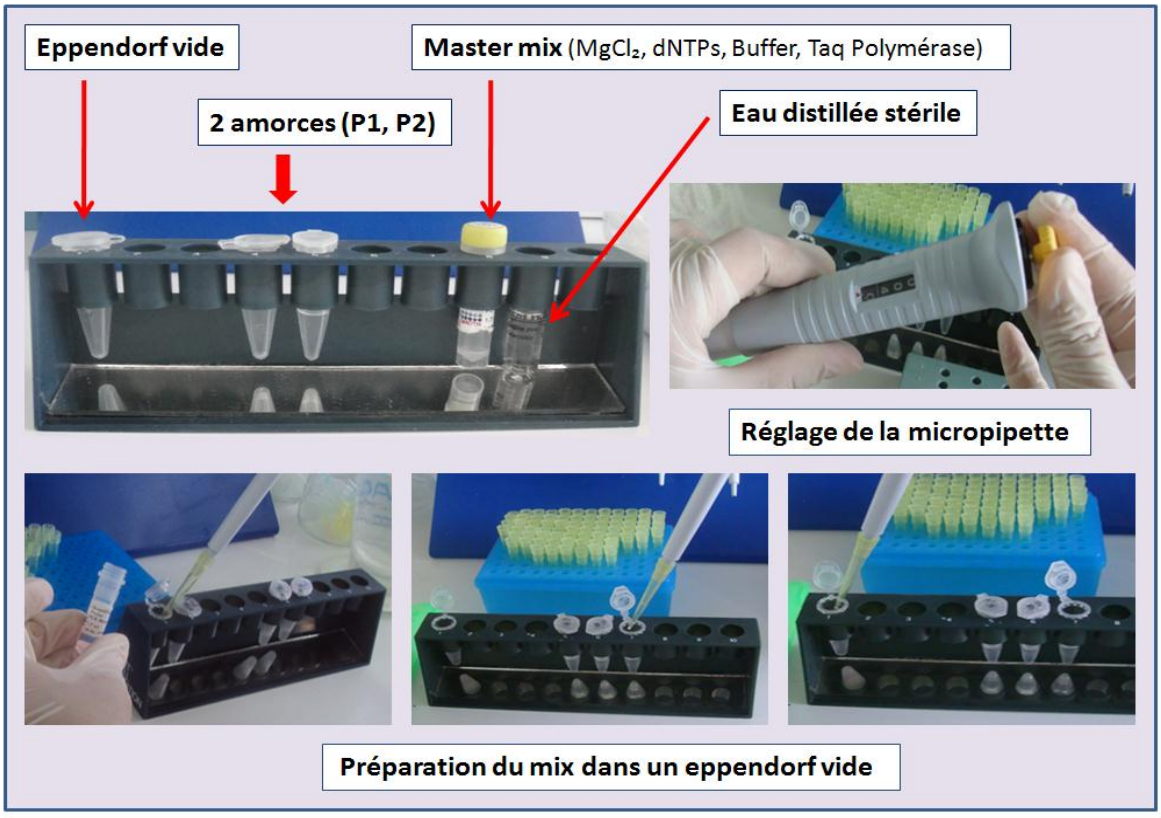


Fig. 32 : Étapes de préparation du mix (Personnelle, 2011)

Remarque 2 :

Le mix peut être préparé facilement et rapidement à partir du master mix qui contient les composants suivant : $MgCl_2$, dNTPs, Buffer, Taq Polymérase et l'eau distillé.

Dans cette méthode les volumes nécessaires pour un seul échantillon sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Volumes des produits du mix en utilisant le master mix (Bitam et *al*., 2011)

Produits	**Réaction pour un seul échantillon**
Master mix	12,5µl
Primer 1	0,5µl
Primer 2	0,5µl
Eau distillée stérile	6,5µl
Total du mix	**20µl**

Chaque constituant de ce mix est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés. Le témoin positif et le témoin négatif doivent être pris en compte dans les calculs. Tous les constituants sont mélangés dans un seul tube eppendorf pour garantir une distribution homogène de tous les réactifs de la PCR. Par la suite, 20µl de ce mélange est distribué dans chaque microtube stérile préalablement numéroté (Fig. 33, 34).

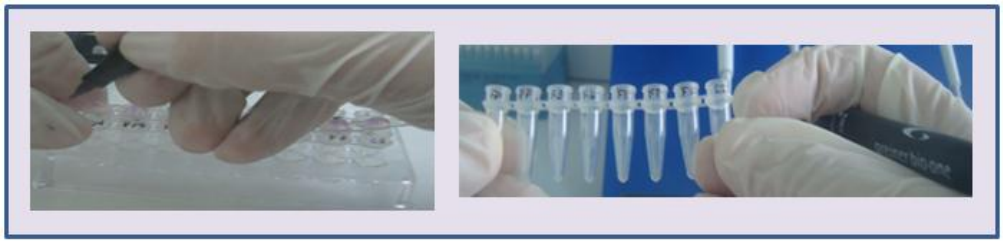


Fig. 33 : Codification des microtubes utilisés pour la PCR (Personnelle, 2011)

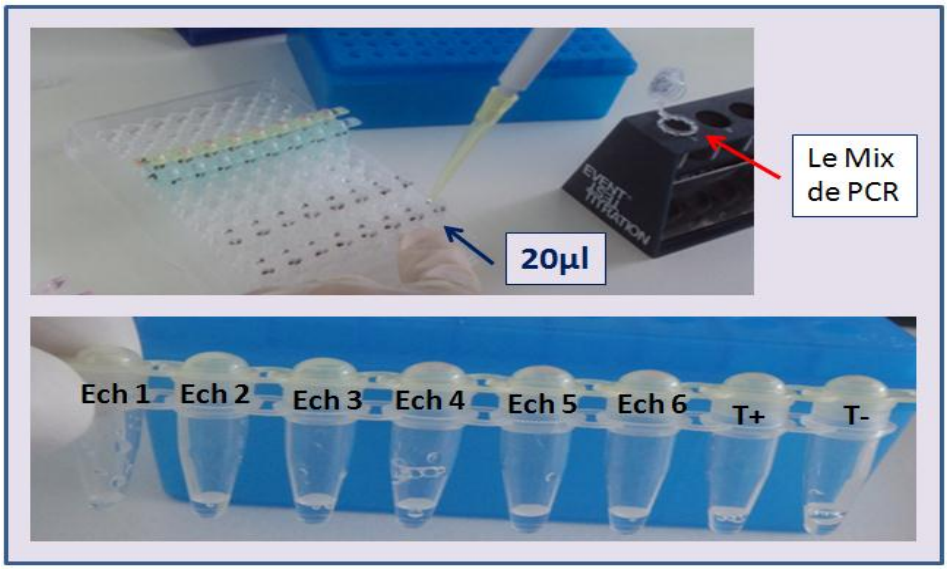


Fig. 34 : Distribution du mix dans les barrettes PCR (barrettes à 8) (Personnelle, 2011)

V.2.2. Ajout des échantillons d'ADN aux mix

J'ajoute les échantillons d'ADN ainsi que les Témoins dans les barrettes PCR contenant le mix (Fig. 35) :

- **le Témoin positif :** contient 5µl de l'ADN positif spécifique à la bactérie recherchée pour 20µl de mix.

Un contrôle positif sert à deux choses : montrer que l'ADN amplifié correspond bien à ce que l'on cherche et vérifier que les conditions expérimentales permettent une amplification correcte.

Les ADN positifs utilisés lors de la PCR pour rechercher *Rickettsia spp*. et *Bartonella spp*. sont ceux de ***R. montanensis*** **et** ***B. elizabethae*** respectivement.

- **le Témoin négatif** : comporte 5µl d'eau distillé stérile plus 20µl du mix.

Le contrôle négatif, qui ne doit pas être amplifié, est utilisé pour vérifier que les réactifs du mélange réactionnel (amorces et la Taq polymérase) ne sont pas contaminés et de détecter une amplification non spécifique dans la réaction de PCR.

- **les Échantillons à analyser:** 5µl d'ADN de notre échantillon (issu de l'extraction) est ajouté dans 20µl de mix.

Donc le volume total dans chaque tube sera de 25µl.

NB: Cette opération se fait dans la salle de préparation d'ADN.

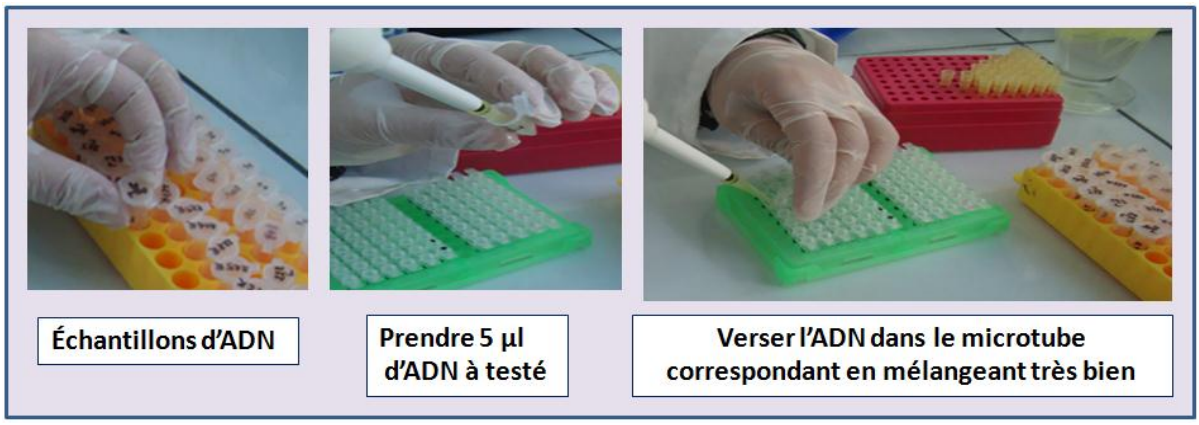


Fig. 35 : Ajout des échantillons d'ADN dans les tubes de barrettes PCR contenant le mix (Personnelle, 2011)

J'introduis le mix et les ADN, contenus dans les tubes de barrettes PCR, dans le thermocycleur. Ensuite je programme ce dernier selon l'espèce bactérienne.

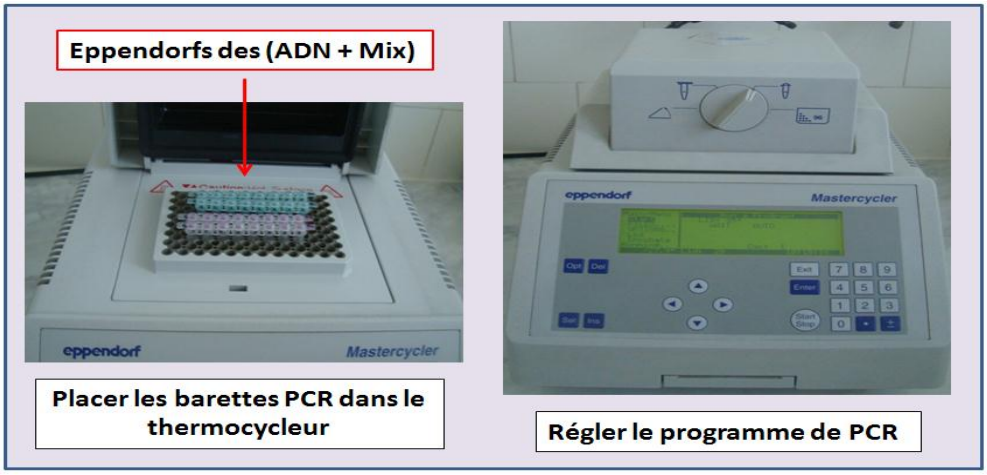


Fig. 36 : lancement de l'amplification dans le thermocycleur (Personnelle, 2011)

NB: Je vérifie que les tubes de barrettes PCR sont bien fermés pour éviter une éventuelle évaporation du contenu (le mélange réactionnel), lors de l'amplification dans le thermocycleur.

V.2.3. Programmation du thermocycleur

Le but de cette technique est de détecter de faibles quantités d'ADN. La réaction d'amplification en chaîne nécessite l'utilisation des amorces complémentaires à l'ADN cible. Le choix des amorces est d'importance cruciale dans la réussite de l'amplification. Dans notre cas les « primers» ajoutés sont spécifiques de : ***Rickettsia spp.*** et ***Bartonella spp.***

Tableau 6 : Les amorces (primers) de l'ADN des bactéries recherchées (La Scola et Raoult, 1997; Rolain et *al*., 2003)

Spécificité	Gène	Amorce	Séquence	Taille Amplicon	T°CD' HB
Toutes les espèces de ***Bartonella***	**ITS**	Urb 1 f Urb 2 r	5´-CTT-CGT-TTC-TCT-TTC-TTC-A-3 ´5-CTT-CTC-TTC-ACA-ATT-TCA-AT-3	732 pb	53°C
	FtsZ	FtsZ 1 f FtsZ 2 r	5´-CCG-TGA-ATA-ATA-TGA-TTA-ATG-C-3´ 5´-TTG-AAA-TGG-CTT-TGT-CAC-AAC-3´	333 pb	55°C
Toutes les espèces de ***Rickettsia***	**gltA (CS)**	409 f 1258 r	5´-CCT-ATG-GCT-ATT-ATG-CTT-GC-3´ 5´-ATT-GCA-AAA-AGT-ACA-GTG-AAC-A-3´	769 pb	59°C
	OmpA ou rOmpA	190-70 f 190-701 r	5´-ATG-GCG-AAT-ATT-TCT-CCA-AAA-3´ 5´-GTT-CCG-TTA-ATG-GCA-GCA-TCT-3´	630 pb	54°C

Les échantillons vont subir une PCR classique dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Ce dernier se contente de placer le tube aux températures voulues pendant les durées programmées et de recommencer en effectuant des cycles. Un cycle reproduit trois températures différentes pendant des durées différentes.

La réaction de polymérisation en chaîne s'effectue en 3 étapes (Nedjma et *al*., 2005) :

- **Dénaturation :** Cette étape consiste à séparer par la chaleur (95° C) les deux brins d'ADN en brisant les liaisons hydrogènes. Les brins d'ADN issues de cette dénaturation serviront de matrice au cours des cycles d'amplification.
- **Hybridation :** Une fois l'ADN séparé, un refroidissement rapide est appliqué pour que les amorces se fixent à chaque extrémité complémentaire de l'ADN à simple brin. L'étape d'hybridation se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C). La température d'hybridation va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.

- **La polymérisation ou élongation (extension des amorces) :** Cette étape est réalisée à une température de 72°C, qui correspond à la température optimale de l'activité de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée. Après la fixation des amorces, l'ajout de la Taq polymérase et de nucléotide permet la synthèse des nouveaux brins d'ADN.
- **Nouvelle amplification :** Au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

  Ce **cycle** dénaturation–amplification est effectué **39** fois dans notre étude. La durée totale de la PCR est entre 2 à 3h.

  Le thermocycleur doit être programmé selon l'espèce bactérienne recherchée. Le programme du thermocycleur pour ***Rickettsia spp*** et ***Bartonella spp*** est le suivant :

Tableau 7 : Programme du Thermocycleur des bactéries recherchées (Bitam, 2008)

	Température		**Temps** (**mn :** minute)	**Étapes**
	***Rickettsia spp* (CS)**	***Bartonella spp* (ITS)**		
Premier cycle	95°C	95°C	15 mn	**Dénaturation initiale**
39 cycles	94°C **59°C** 72°C	94°C **53°C** 72°C	1 mn 0.5 mn 1 mn	**Dénaturation** **Hybridation** **Élongation**
Dernier cycle	72°C	72°C	5 mn	**Élongation finale**
Conservation des échantillons	**4°C**	**4°C**		**Fin**

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes, seule la température d'hybridation devra être calculée pour chaque nouvelle PCR. Cette température d'hybridation est un paramètre important pour la réussite de l'amplification, elle doit être calculée en fonction de la composition en bases et de la Tm (température de fusion ou température de melting) des deux amorces. La température d'hybridation est légèrement inférieure (environ de 5°C) au Tm qui est le point critique de la séparation des brins d'ADN.

Pour calculer la Tm, il existe plusieurs formules. La relation suivante est la formule la plus simple et surtout valable pour des amorces de taille inferieure à 25 nucléotides (Nedjma et *al*., 2005) :

Tm1 (primer1) = 4 (C+G) + 2 (A+T)

Tm2 (primer1) = 4 (C+G) + 2 (A+T)

Tm = (Tm1 +Tm2) / 2 ° C

(A, T, G et C sont respectivement le nombre de chacune de ces bases dans l'oligonucléotide).

Température d'hybridation = Tm – 5°C (une température d'hybridation trop basse risque de donner des hybridations non spécifiques).

NB: la température de melting peut être calculée directement à partir d'un logiciel (Oligo calculator) disponible sur le net, il suffit juste de décrire la séquence des amorces choisies.

V.3. Deuxième étape : Électrophorèse

La technique de l'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode de séparation et de révélation des fragments d'ADN amplifiés, elle est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose en fonction des poids moléculaire des fragments d'ADN amplifiés (Nedjma et *al*., 2005). Cette étape est effectuée dans une salle destinée à l'électrophorèse.

V.3.1. Préparation du gel d'Agarose 1,5%

- Je pèse 1,5 g d'agarose, je la mets dans un Erlenmeyer de 500 ml de contenance,
- J'ajoute ensuite 100 ml de **TBE** 1X.
- Je fais chauffer le mélange dans un four à Micro-onde à 460 W, pendant 2 à 5 minutes jusqu'à ce que le liquide devient limpide.
- Je laisse le gel se refroidir à température ambiante.

Le **TBE** est un tampon de migration utilisé en électrophorèse pour préparer des gels d'agarose.

Il doit être préparé au laboratoire (Annexe 8).

Rôle du TBE : Le TBE (Tris-Borate-EDTA) fournit une solution ionique qui permet au courant de passer à travers l'eau. Il a aussi comme rôle de maintenir l'ADN sous forme soluble dans l'eau. Le TBE est composé de l'EDTA qui protège les acides nucléiques contre la dégradation enzymatique par l'inactivation des enzymes.

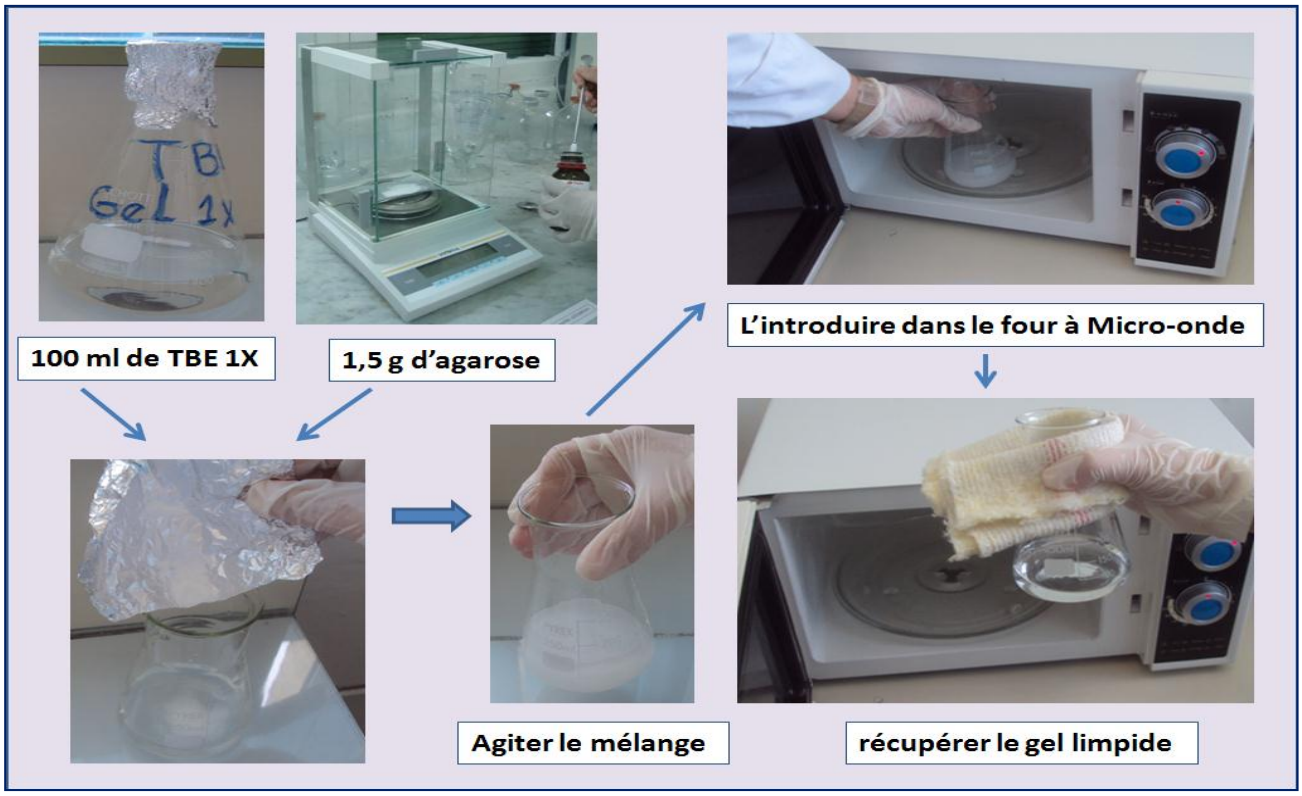


Fig. 37 : Préparation du gel d'agarose de 1,5% (Personnelle, 2011)

V.3.2. Coulage des gels dans la cuve à électrophorèse horizontale

- Je nettoie la cuve avec son peigne à l'eau courante.
- Après refroidissement du gel, j'ajoute 7µl de **BET** avec précaution.

La raison de laisser le gel se refroidir un peu avant cette étape est de minimiser la production de bromure d'éthidium sous forme de vapeur car ce dernier est un produit très cancérigène (mutagène) et doit être manipulé avec une extrême prudence.

Le BET doit être conservé à 4°C et enrobé avec du papier aluminium à l'abri de la lumière avec une étiquette TOXIQUE sur le tube.

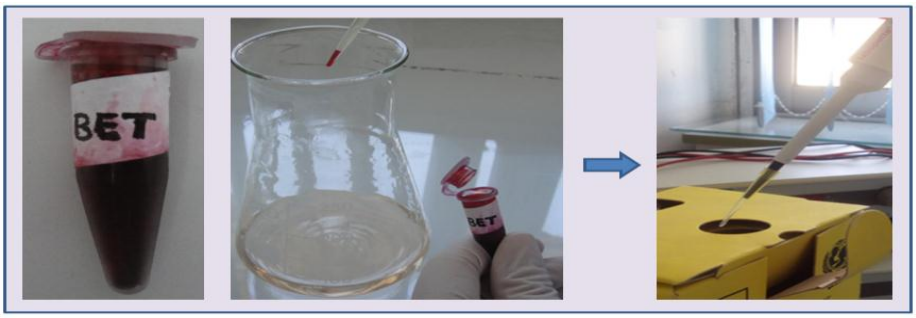


Fig. 38 : Ajout du BET (Personnelle, 2011)

Rôle du BET : Le bromure d'éthidium est un colorant couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Cette molécule s'intercale entre les bases de l'ADN double brin et Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée. Donc le BET permet la visualisation des bandes d'ADN, dans le gel placé sur la table à UV du transilluminateur (Chesnay et *al*., 2004).

- Le coulage du gel dans la cuvette se fait après avoir positionner le peigne de façon à former des puits complets.
- Après polymérisation du gel au bout de 20 à 30 minutes je retire soigneusement le peigne.
- Je mets ensuite le gel dans la cuve à migration contenant au préalable du **TBE** 0,5X.

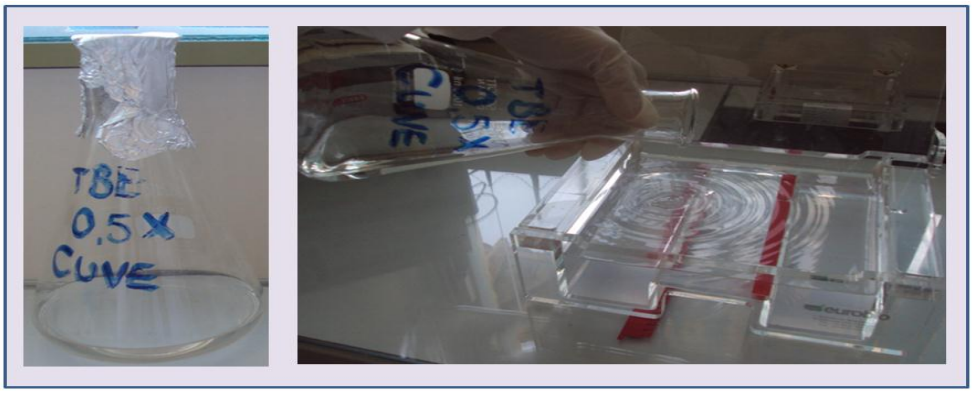


Fig. 39 : Coulage du TBE 0,5X dans la cuve à migration (Personnelle, 2011)

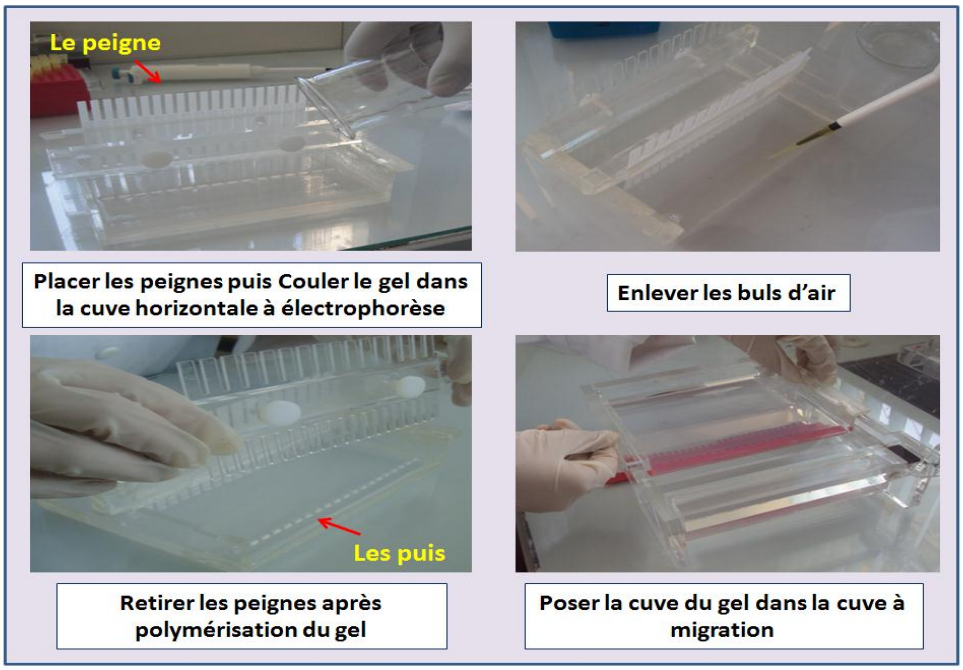


Fig. 40 : Coulage du gel d'Agarose et la pose de la cuve horizontale à électrophorèse dans la cuve à migration (Personnelle, 2011)

V.3.3. Dépôt des échantillons dans les puits du gel

1. Je prends un morceau de parafilm sur lequel je mets pour chaque échantillon à part : 7µl d'échantillon et 3µl de **tampon de charge** 10 x (Bleu de Bromophénol) qui assure le maintien du dépôt en immersion dans le puit.

Le bleu de bromophénol est également utilisé comme marqueur coloré afin de visualiser et vérifier le bon déroulement de la migration au cours d'une électrophorèse en gel d'agarose. Il est légèrement chargé négativement, à un pH modéré, il migre dans la même direction que l'ADN sur le gel.

NB: Je dois changer l'embout de la micropipette pour chaque échantillon.

2. Je mélange à l'aide d'une micropipette l'échantillon et le tampon de charge puis je mets le mélange dans un micro-puit du gel.

3. Les deux avant derniers puits du gel sont réservés pour le témoin positif et le témoin négatif.

4. Je dépose dans le dernier puit 4µl du marqueur de PM d'une concentration de 0.25µg/µl.

La détermination précise des tailles des fragments séparés est effectuée en faisant migrer le marqueur de poids moléculaire en parallèle avec les échantillons à analyser (Annexe 9).

Un marqueur de poids moléculaire est une solution de molécules d'ADN, il sert comme référence pour estimer le poids moléculaire des fragments d'ADN amplifiés, dont la taille est inconnue.

4. Je dépose les échantillons dans les autres puits.

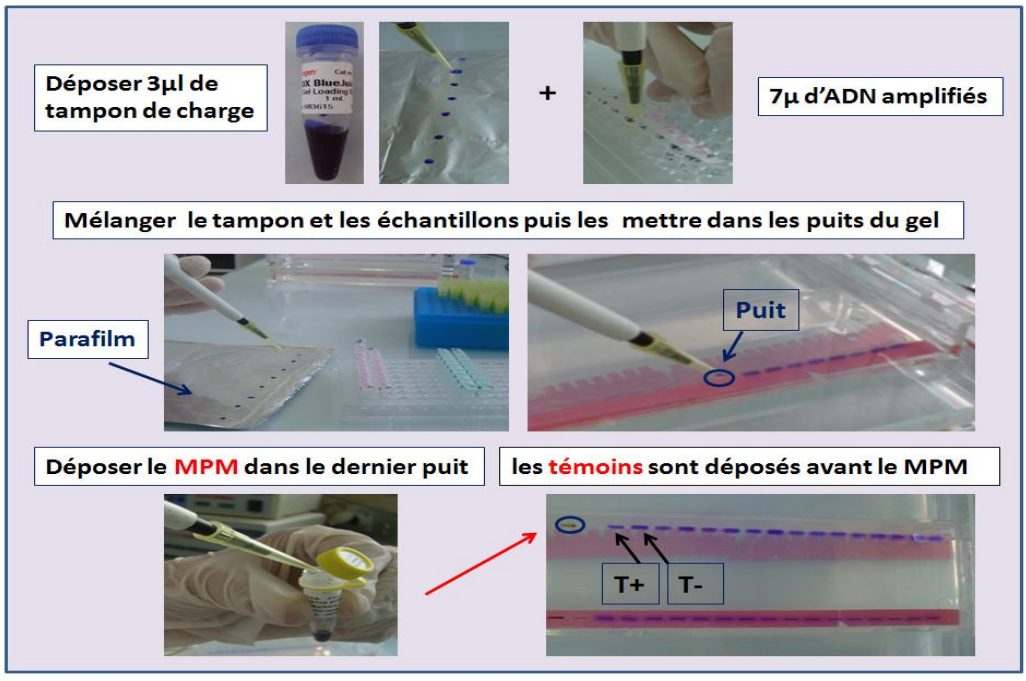


Fig. 41 : Le dépôt des échantillons d'ADN et du MPM dans les micropuits du gel (Personnelle, 2011)

V.3.4. Migration et visualisation de l'ADN

1. Je ferme la cuve. Je branche les cordons de la cuve à l'alimentation de manière à ce que les dépôts soient côté cathode (-).

La molécule d'ADN est chargée négativement, ce qui lui permet de migrer vers l'anode (+) une fois le champ électrique est appliqué.

2. J'applique une tension de 120 V pendant environ 1 heure de migration. Les baisses de tensions entraînent des migrations plus longues. Les migrations des fragments d'ADN dépendent de la taille du fragment plus que de la charge de celui-ci, les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

3. Je coupe l'alimentation quand le colorant parcours la distance requise ou bien je laisse la migration arriver jusqu'à 1 cm du bord de la cuve (cette ligne est appelée le front de migration).

4. Je débranche le générateur de la cuve et je récupère le gel dans son support.

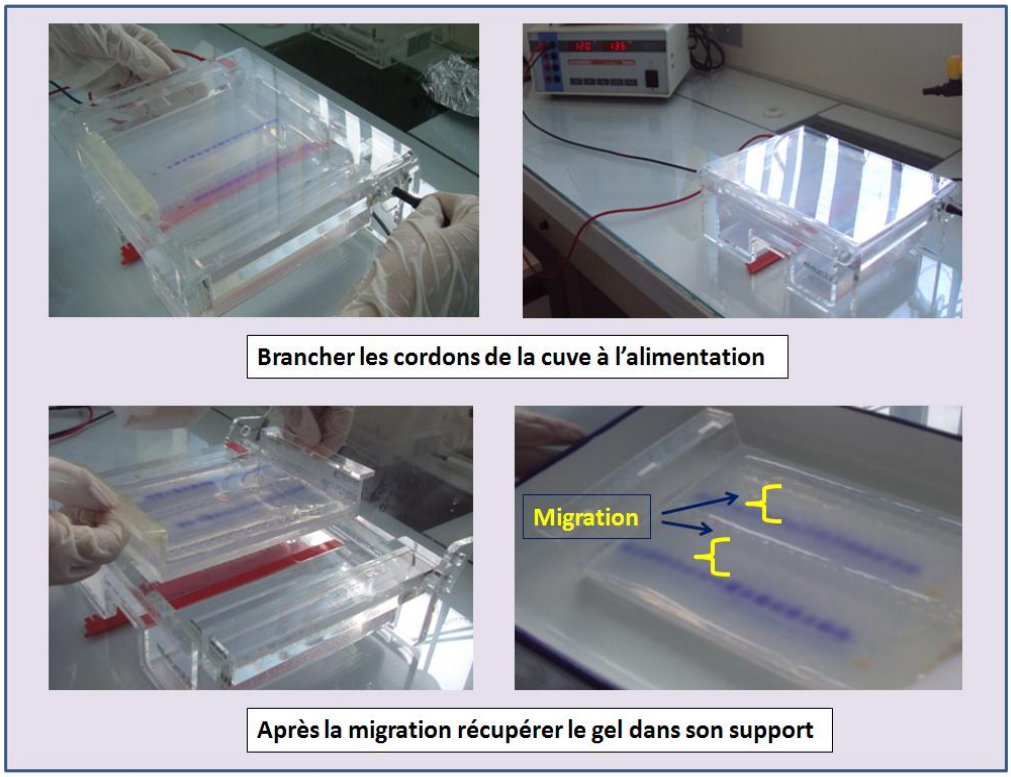


Fig. 42 : Migration des échantillons dans le gel (Personnelle, 2011)

5. Lecture par Transilluminateur :

Dans une chambre noire, La révélation du profil électrophorétique se fait sur la table UV à 312 ou 365 nm du transilluminateur (Fig. 43).

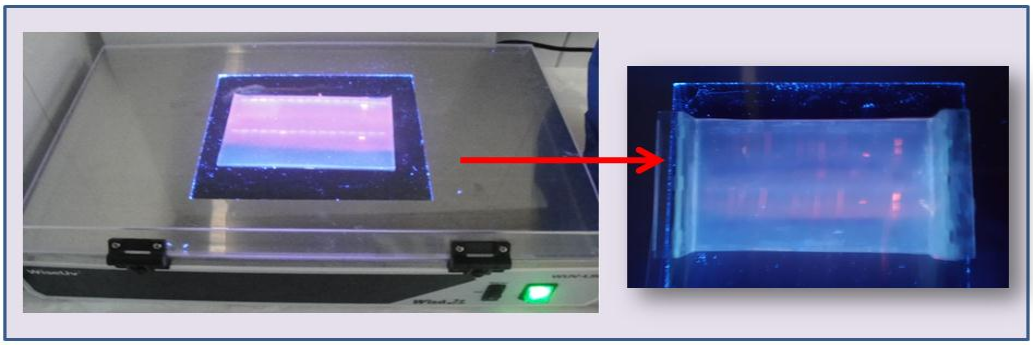


Fig. 43 : Visualisation des bandes d'ADN (Personnelle, 2011)

En fonction de la taille des fragments d'ADN étudiés, la bande et sa taille sont repérées respectivement par rapport au témoin positif et au marqueur de PM.

Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose représentent une analyse qualitative de l'échantillon.

VI. PCR EN TEMPS RÉEL

VI.1. Principe

La technologie de PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Étant donné qu'elle utilise généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation postamplification, le temps d'analyse et les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont significativement réduits. Le processus complet est automatisé du début à la fin rendant cette technologie très performante pour des applications d'analyses à grande échelle.

En 1992, Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR (polymerase Chain Reaction) en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. Ce système en « temps réel » utilise un thermocycleur modifié pour stimuler l'émission des échantillons par rayonnements UV. L'émission de la fluorescence est détectée à l'aide d'une caméra CCD (charge-coupled device). En traçant l'augmentation de l'émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles, le système produit des courbes d'amplification exhibant un schéma plus complet du processus de la PCR (Poitras et Houde, 2002).

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l' origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond (point d'intersection de la courbe avec la ligne seuil établie) (Fig. 44). Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaît en début de phase exponentielle (POITRAS et HOUDE, 2002)

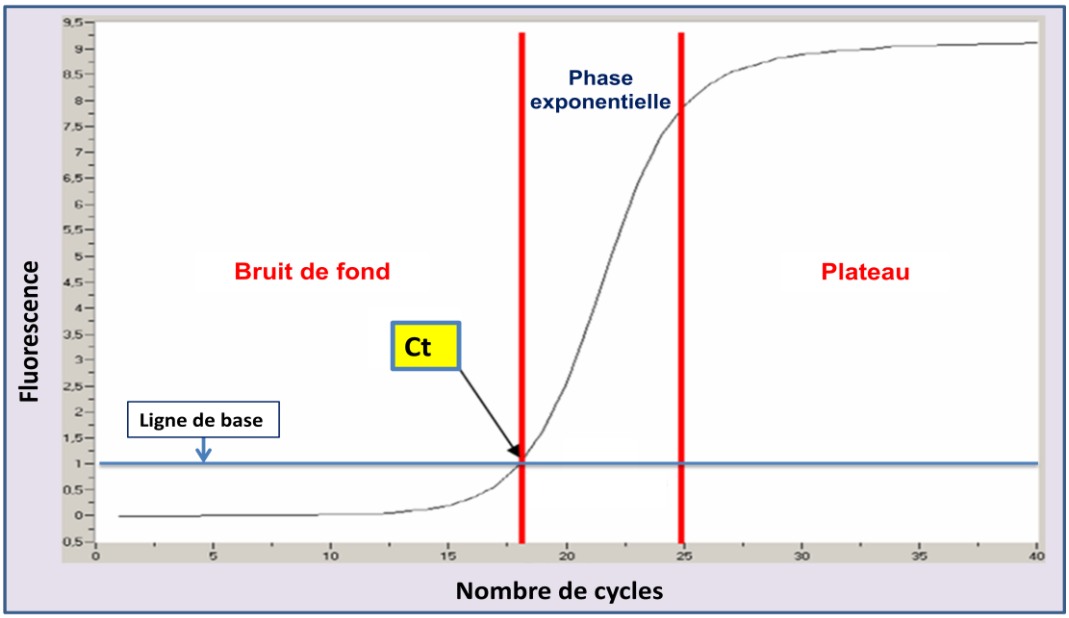


Fig. 44: les trois phases du signal fluorescent au cours d'une PCR en temps réel (POITRAS et HOUDE, 2002)

Le Ct obtenu à partir d'un échantillon de concentration inconnue va être traduit en concentration en molécules cibles, grâce à la droite standard.

La droite standard va représenter les valeurs de Ct obtenues expérimentalement d'un échantillon standard. La valeur de Ct est inversement proportionnelle au log de la concentration initiale en molécules cibles.

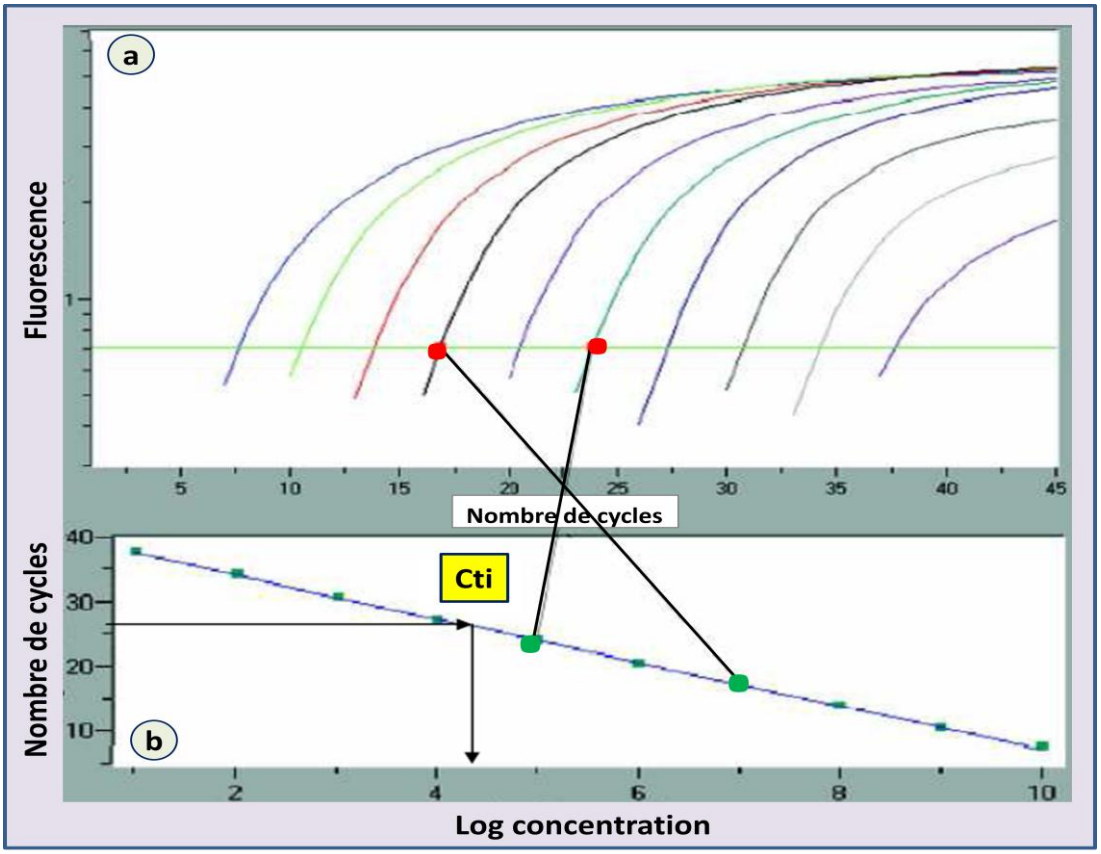


Fig. 45: Principe de quantification lors de la PCR en temps réel (POITRAS et HOUDE, 2002)

Un échantillon standard a été dilué en série. Les Ct obtenus (points rouges de la fig. a) sont reportés en fonction des logs des concentrations relatives du standard : on établit ainsi une droite standard (points verts de la fig. b). Le Ct obtenu à partir d'un échantillon inconnu (Cti) permettra, lorsqu'il sera reporté sur la droite, d'obtenir le log de la concentration en molécules cibles de cet échantillon.

La PCR en temps réel, à cause de sa capacité à produire des résultats rapides, spécifiques et quantitatifs, trouve de plus en plus d'applications dans différents domaines (Poitras et Houde, 2002).

VI.2. Protocole de la PCR en temps réel

Les échantillons d'ADN des prélèvements de rates qui ont subi une extraction sont envoyés au laboratoire de référence des rickettsies à Marseille en vue d'une deuxième analyse moléculaire.

Après la préparation du mélange réactionnel avec l'addition des sondes fluorescentes et des primers (Tableau 8), ainsi que l'ajout des ADN de nos échantillons et du témoin positif. Le mix est mis dans un appareil de PCR quantitative en temps réel (Fig. 46).

Il s'agit d'un Thermocycleur rapide (à air pulsé), couplé à un Spectrofluorimètre (système optique de détection de la fluorescence générée lors des réactions de PCR). Ce dernier est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement.

Tableau 8 : Amorces et sondes utilisées lors de la PCR en temps réel

Genre de Bactéries	Gène	Primers et sondes	Séquences
Rickettsia species	*gltA* gene	RKND03F	5'-GTG-AAT-GAA-AGA-TTA-CAC-TAT-TTA-T-3'
		RKND03R	5'-GTA-TCT-TAG-CAA-TCA-TTC-TAA-TAG-C-3'
		RKND03P	**6-FAM-CTA-TTA-TGC-TTG-CGG-CTGTCG-GTT-C-TAMRA**
Bartonella species	ITS gene	ITS2F	5'-GGG-GCC-GTA-GCT-CAG-CTG-3'
		ITS2R	5'-TGA-ATA-TAT-CTT-CTC-TTC-ACA-ATT-TC-3'
		ITS2P	**6-FAM-CGA-TCC-CGT-CCG-GCT-CCA-CCA-TAMRA**

F: Forward (sens), R: Reverse (antisens), P: probe (sonde).

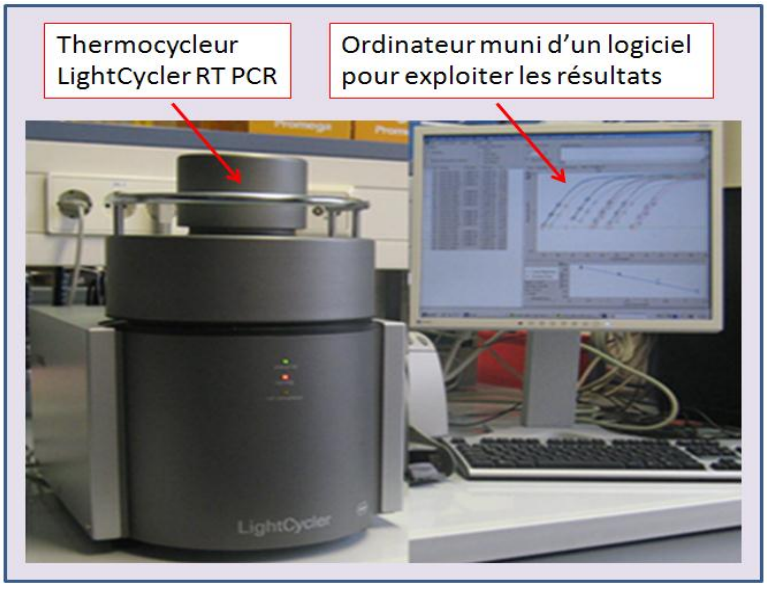


Fig. 46 : Équipement de PCR real time (Personnelle, 2011)

Remarque : Une comparaison directe entre la PCR standards et la PCR en temps réel est représentée dans un tableau dans l'annexe n° 10.

VII. ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel EXEL 2007. Nous avons utilisé le test de Fisher exacte pour comparer les pourcentages liés aux facteurs de risques qui peuvent influencer sur l'apparition de la maladie. La différence est considérée significative au risque d'erreur à 5 %.

2ème PARTIE
ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE II
Résultats

Le but de notre essai est la détection de l'ADN des rickettsies et des bartonelles (agents bactériens) dans les rates prélevées sur des chiens et des chats errants vivants dans la wilaya d'Alger, grâce à la technique d'amplification génique (PCR).

I. LES PRÉLÈVEMENTS ANALYSÉS

Les prélèvements de rates destinés à l'extraction-PCR ont été choisis de façon aléatoire. La recherche des *Rickettsia sp.* et *Bartonella sp.* par PCR a porté sur 60 rates sur un total de 100 prélèvements: 35/55 rates de chiens soit 63,63% et 25/45 rates de chats soit 55,55%. Car nous avons eu à notre disposition une quantité limitée de réactifs d'extraction et de primers de *Rickettsia sp* et de *Bartonella sp.* Chaque rate issue d'un chien ou d'un chat, a porté un numéro et un code afin de la distinguer sur le gel.

II. LE CONTRÔLE DE L'EXTRACTION

Avant de commencer la PCR, l'efficacité de l'extraction de l'ADN est vérifiée en faisant migrer les ADN par électrophorèse sur gel d'agarose. Après la préparation du gel d'agarose, 5 µl d'échantillon d'ADN non amplifié et 3µl de tampon de charge sont mélangés puis déposés dans les puits du gel.

Après leur migration, La visualisation des bandes d'ADN se fait sous UV dans une chambre noire.

Une extraction réussite se révèle par la présence de plusieurs bandes d'ADN sur le gel (Fig. 47).

NB : Le contrôle de l'extraction est réalisé sur un échantillon de 32 rates qui ont subis une extraction, l'échantillonnage est fait de façon au hasard.

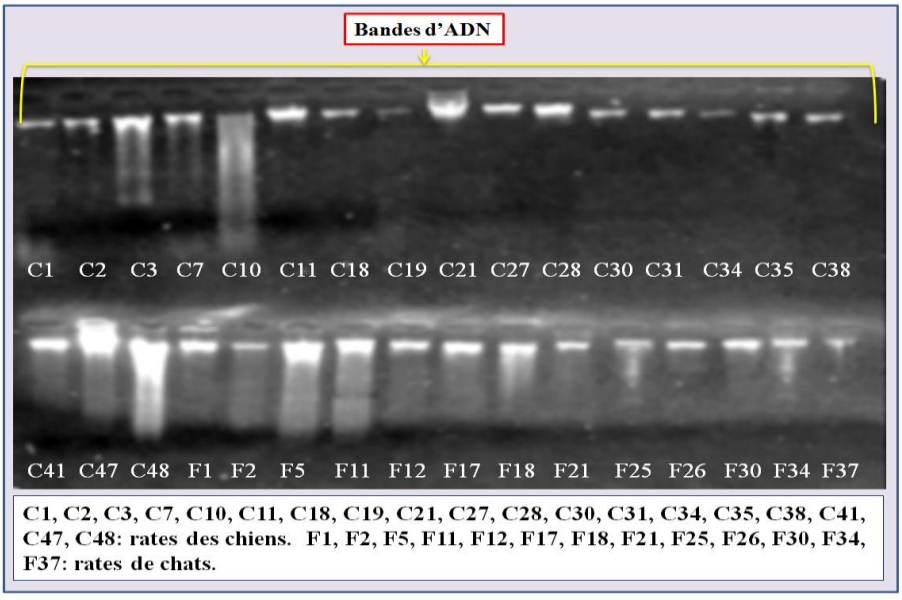


Fig. 47 : Gel d'électrophorèse pour le contrôle de l'extraction d'ADN (Personnelle, 2011)

III. RÉSULTATS DES ANALYSES DE LABORATOIRE

III.1. Résultats obtenus par la PCR standard

Les trois conditions suivantes sont indispensables pour considérer un gel de PCR en tant que résultat fiable :

- La bande du témoin positif doit être visible et correspond bien à la taille du gène amplifié. Ce contrôle positif qui possède une taille connue permet de vérifier les bonnes conditions de préparation du mélange réactionnel, d'amplification et de détection.
- Le témoin négatif ne doit pas être amplifié et donc invisible.
- Le marqueur du poids moléculaire doit être présent pour vérifier la taille des bandes d'ADN.

Il est très important de confirmer les résultats obtenus, par la recherche d'un deuxième gène différent du premier, exemples :

- Pour *Rickettsia sp.*, on utilise le gène ompA et un deuxième gène Citrate synthase « gltA ».
- Pour *Bartonella sp*., on utilise le gène ITS et Fts Z.

III.1.1. Chez l'espèce canine

L'analyse par PCR révèle un seul chien positif à *Rickettsia sp* après la visualisation des bandes d'ADN soit 2,86 % (1/35) de l'ensemble des chiens testés. Ce résultat positif correspond à la présence d'ADN amplifié du genre *Rickettsia*, avec une bande homogène, uniforme et de même poids moléculaire (630 pb) que le témoin positif, pour le gène ompA des amorces : Rompa 190-70f, Rompa 190-180f et Rompa 190-701r (Fig. 48). Les résultats négatifs se présentent par une absence totale de bandes d'ADN (Fig. 48 et 49).

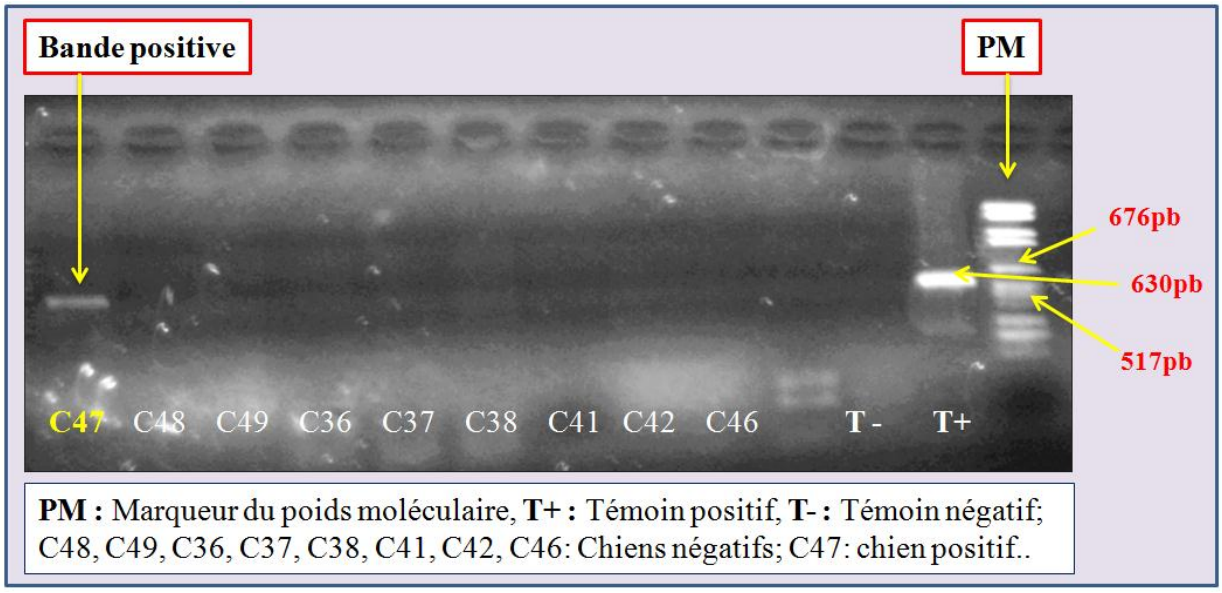


Fig. 48: Gel de PCR de *Rickettsia sp*. (gène OmpA) sur des rates de chiens (personnelle, 2011)

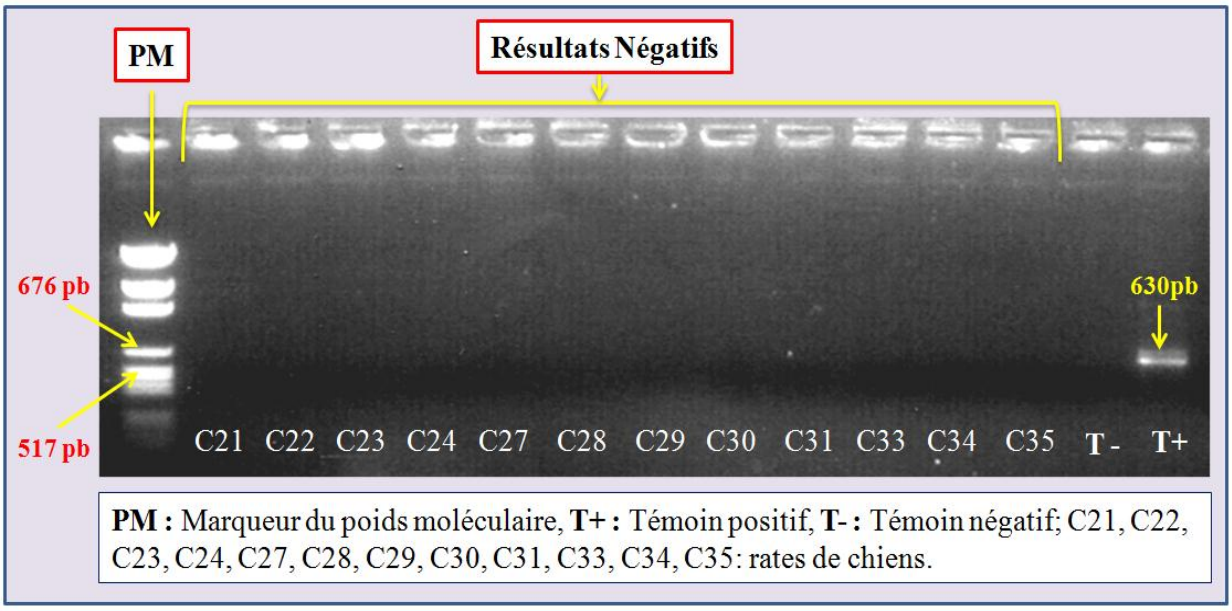


Fig. 49: Gel de PCR de *Rickettsia sp*. (gène OmpA) sur des rates de chiens (Personnelle, 2011)

L'ADN du genre *Bartonella*, n'est pas détecté par P.C.R. dans les 35 rates de chiens analysés. La seule bande visible est celle du témoin positif, comprise entre 730 à 732 pb du gène ITS (Fig. 50).

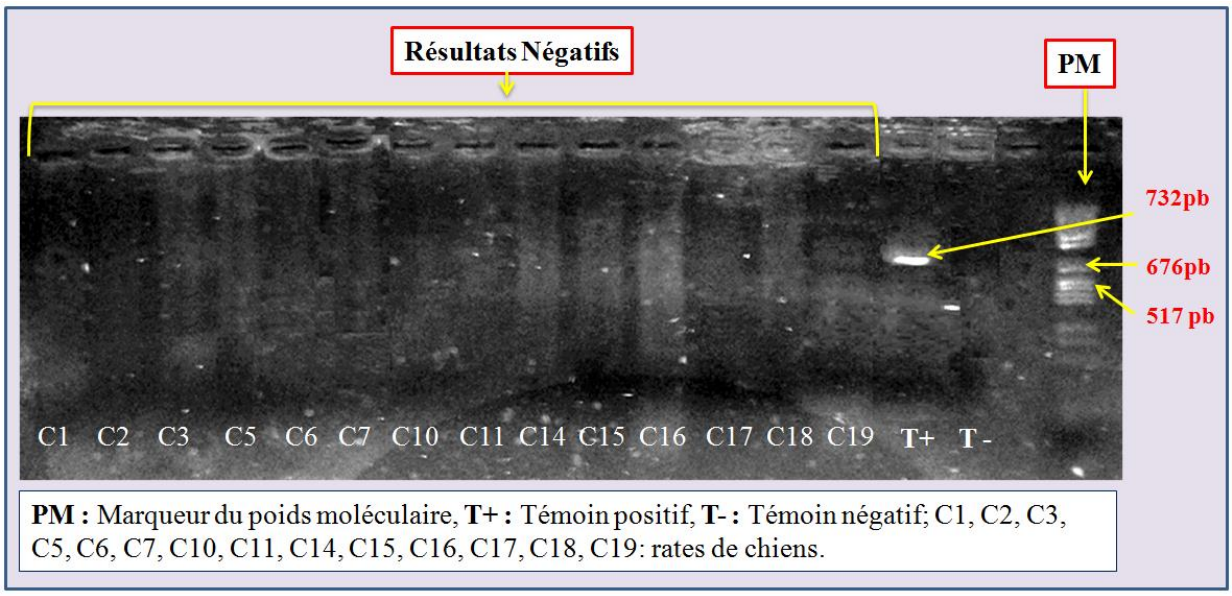


Fig. 50: Gel de PCR de *Bartonella sp*. (gène ITS) sur des rates de chiens (Personnelle, 2011)

III.1.2. Chez l'espèce féline

Le résultat de la PCR pour la recherche d'ADN de *Rickettsia sp.* sur les 25 échantillons de rates de chats, est négatif. La seule bande visible est celle du témoin positif, dont la taille est de 769 pb pour le gène gltA (Fig. 51).

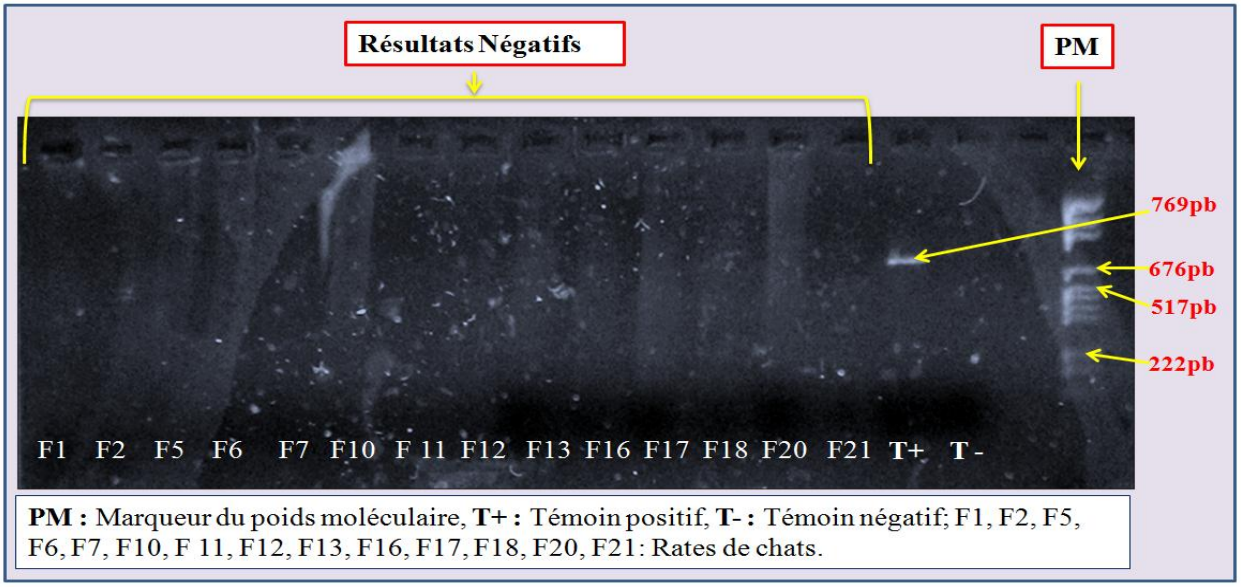


Fig. 51 : Gel de PCR de *Rickettsia sp.* (gène gltA) sur des rates de chats (Personnelle, 2011)

Par contre *Bartonella sp* est détectée chez 2 chats soit 8% (2/25) de l'ensemble des chats analysés. Le gel de PCR montre la présence de deux bandes d'ADN amplifiées. La taille de ces bandes correspond bien à celle du témoin positif de *Bartonella*, elle est comprise entre 330 et 333 pb pour le gène FtsZ (Fig. 52).

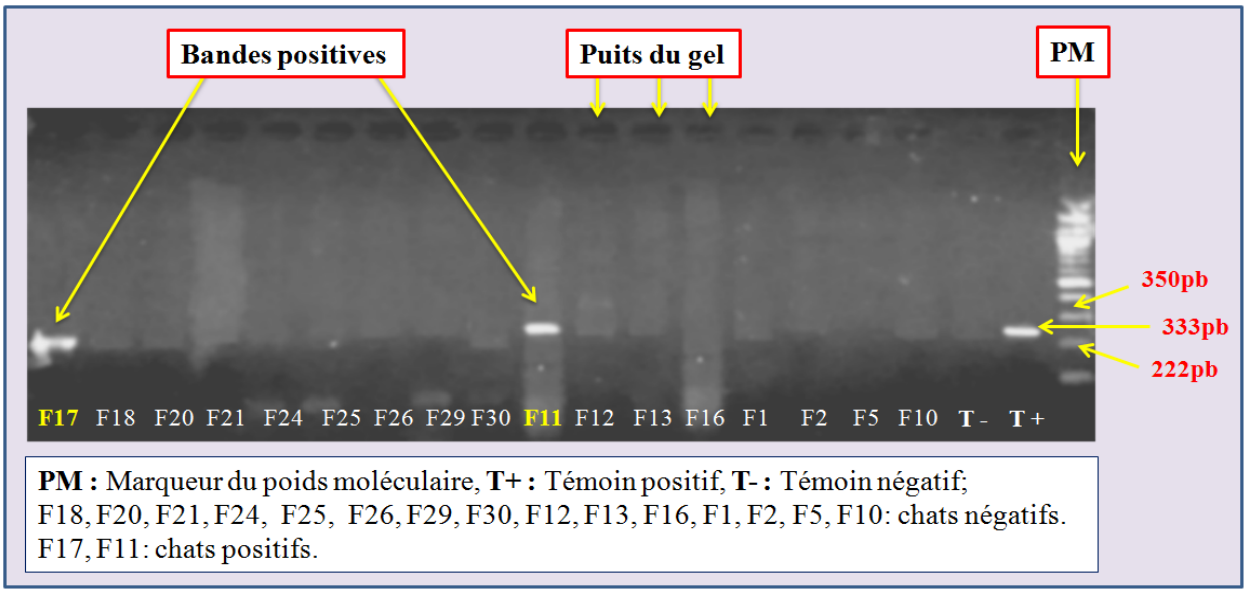


Fig. 52: Gel de PCR de *Bartonella sp.* (gène FtsZ) sur les rates de chats (Personnelle, 2011)

III.2. Résultats obtenus par la PCR real time

Une deuxième analyse moléculaire est réalisée sur les mêmes échantillons à l'unité de rickettsioses de Marseille par la technique de PCR en temps réel.

Le résultat d'une PCR en temps réel est représenté graphiquement sous forme de courbes sigmoïdes (Fig. 53, 54, 55, 56).

Chaque courbe correspond à un seul échantillon. Elle représente la mesure de la fluorescence de cet échantillon pour chaque cycle.

Le signal seuil (la ligne de base) calculé automatiquement est matérialisé sur le graphe par une ligne horizontale.

L'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles dans le modèle graphique de la PCR en temps réel représenté ici. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons (produits d'amplifications), le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.

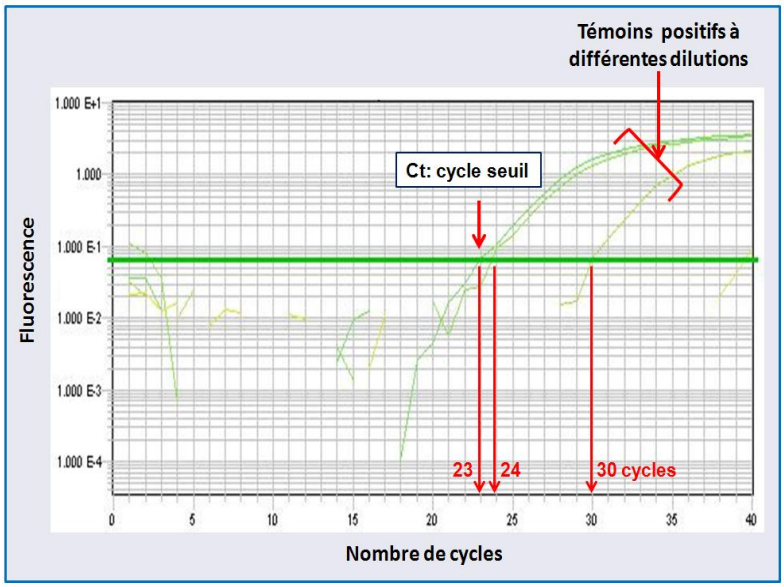


Fig. 53: Les courbes illustrant l'amplification de l'ADN des témoins positifs de *Bartonella spp.* à différentes concentrations (Personnelle, 2011)

N° des animaux positifs à *Bartonella spp.*	Résultats + en fonction des valeurs de Ct
Chien N°11	37.72051
Chien N°15	37.781715
Chien N°33	37.84187
Chat N°5	39.32274
Chat N°10	35.713806
Chat N°11	33.183052
Chat N°17	33.124462
Chat N°33	36.405064

Tableau 09: Résultats positives de *Bartonella spp.* chez les chiens et les chats par PCR real time

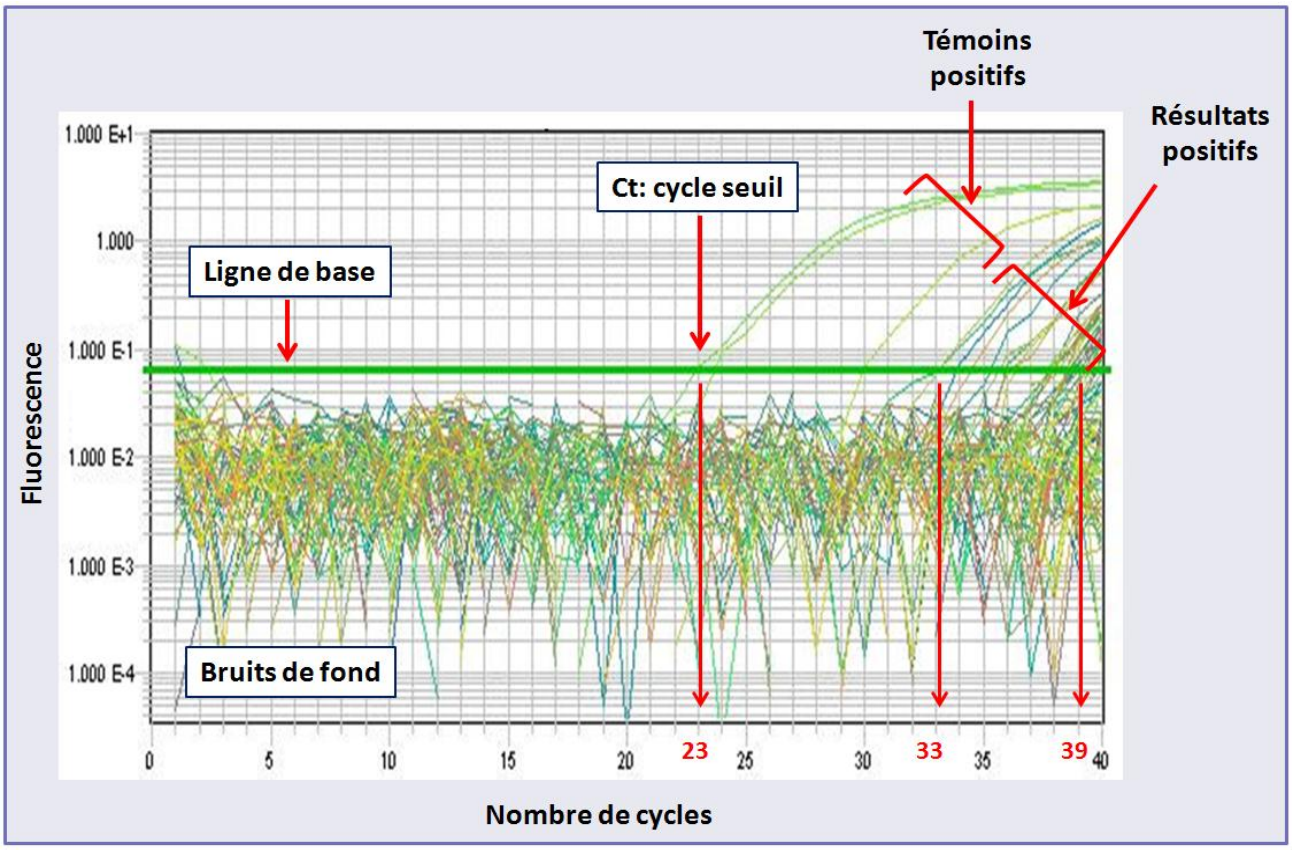


Fig. 54: Les courbes d'amplification obtenues par PCR real time des échantillons d'ADN positifs à *Bartonella spp.* qui correspondent aux résultats du tableau 09 (Personnelle, 2011)

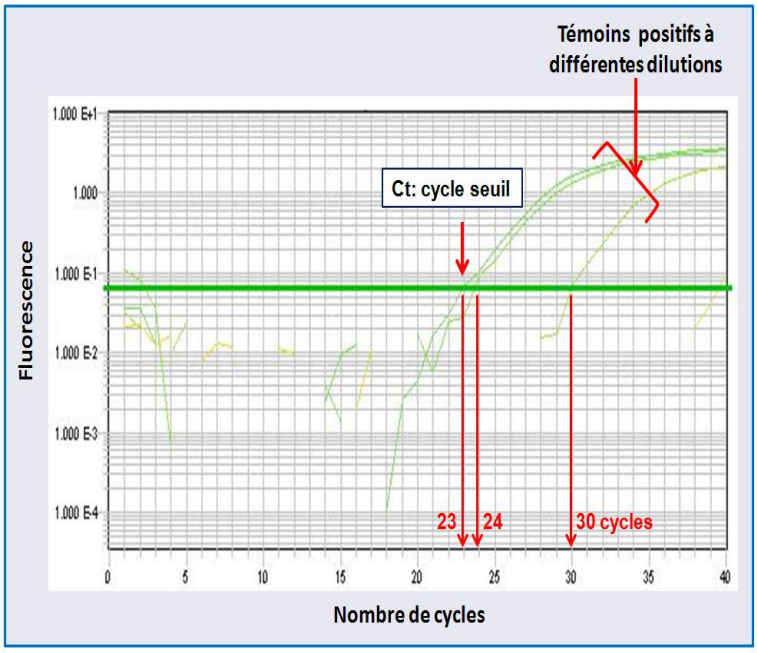


Fig. 55: La courbe illustrant l'amplification de l'ADN du témoin positif de *Rickettsia spp.* (Personnelle, 2011)

N° des animaux positifs à *Rickettsia spp.*	Résultats + en fonction des valeurs de Ct
Chien N°15	38.145638
Chien N°18	38.168686
Chien N°35	36.699097
Chien N°36	36.23647
Chien N°47	33.89022
Chat N°18	37.175224
Chat N°36	34.458115

Tableau 10: Résultats positives de *Rickettsia spp.* chez les chiens et les chats par PCR real time

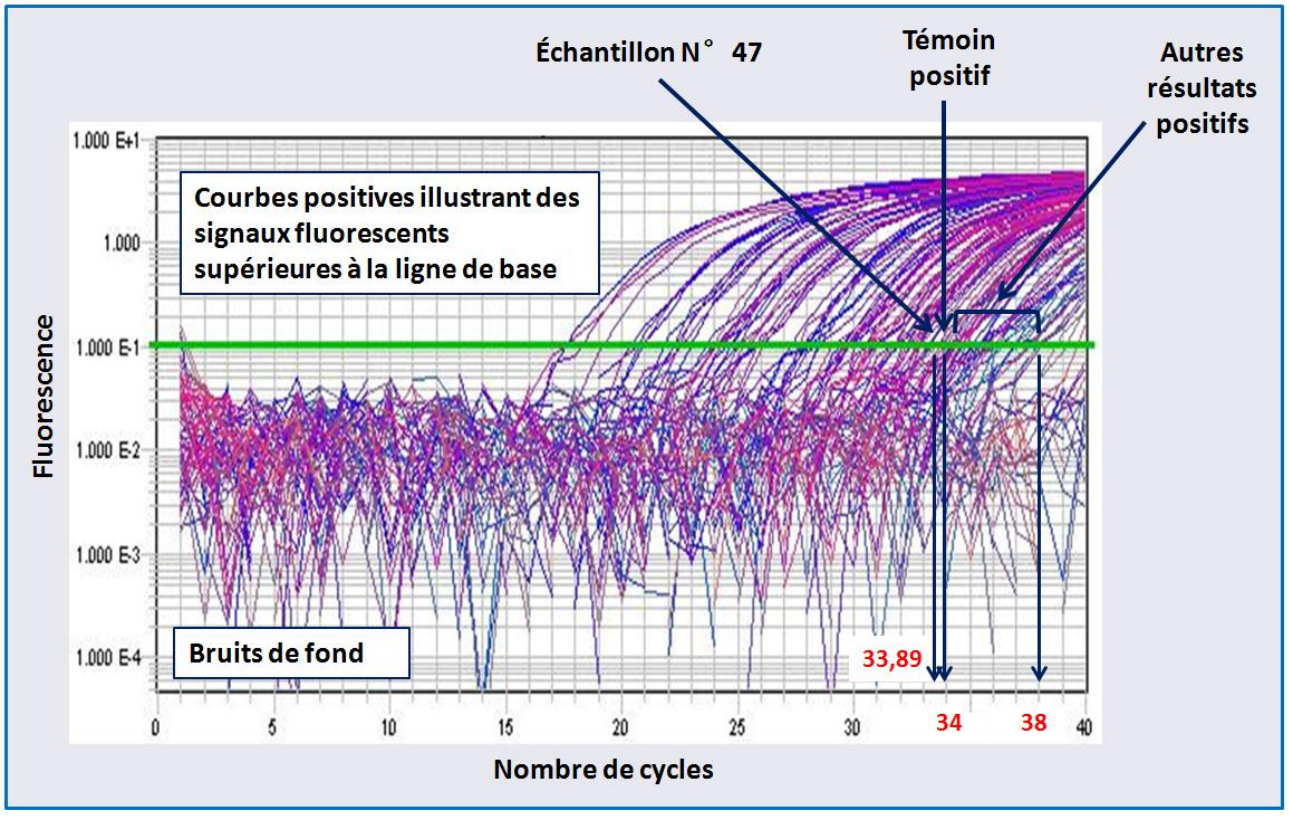


Fig. 56 : Les courbes d'amplification obtenues par PCR real time des échantillons d'ADN positifs à *Rickettsia spp.* qui correspondent aux résultats du tableau 10 (Personnelle, 2011)

Remarque : Un tableau récapitulatif des résultats positifs obtenus par les deux méthodes moléculaires est représenté dans l'annexe n° 11.

IV. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LA PCR EN TEMPS RÉEL

IV.1. Chez l'espèce canine

IV.1.1. Les résultats globaux

Au total, cinq (05) chiens se sont révélés positifs à *Rickettsia sp*, soit 14,28% des échantillons de rates testées et trois (03) chiens positifs à *Bartonella s*p, soit 8,57 %.

Il existe également une co-infection par les deux germes chez un seul chien.

Remarque : La totalité des chiens positifs sont de race croisée, car la majorité des chiens de la fourrière appartiennent à cette catégorie.

IV.1.2. Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction du sexe des chiens

Les échantillons analysés par PCR sont pris au hasard sur les 55 prélèvements effectués. Sur un total de 35 prélèvements de rates de chiens, 17 sont des femelles et 18 sont des mâles, soit des taux respectifs de 48,57% et de 51,43%.

Le taux d'infection par *Rickettsia sp* chez les femelles est de 17,64 % contre 11,11 % chez les mâles. Statistiquement, cette différence est non significative à $p < 0,05$. Ce qui veut dire que le sexe n'influence pas sur le taux d'infection par *Rickettsia sp.* chez les chiens.

Tableau 11: Récapitulatifs des infections à *Rickettsia sp* chez les chiens par sexe

Sexe	Nb de cas positifs	Nb de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
Femelles (17)	**03**	**14**	17,64	< 0,05
Mâles (18)	**02**	**16**	11,11	

L'ADN de *Bartonella sp* est détecté dans 11,11% chez les males et dans 5,88 % chez les femelles. La différence statistique en fonction du sexe est non significative à $p < 0,05$.

Tableau 12 : Récapitulatifs des infections à *Bartonella sp* chez les chiens par sexe

Sexe	Nb de cas Positifs	Nb de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
Femelles (17)	**01**	**16**	5,88	< 0,05
Mâles (18)	**02**	**16**	11,11	

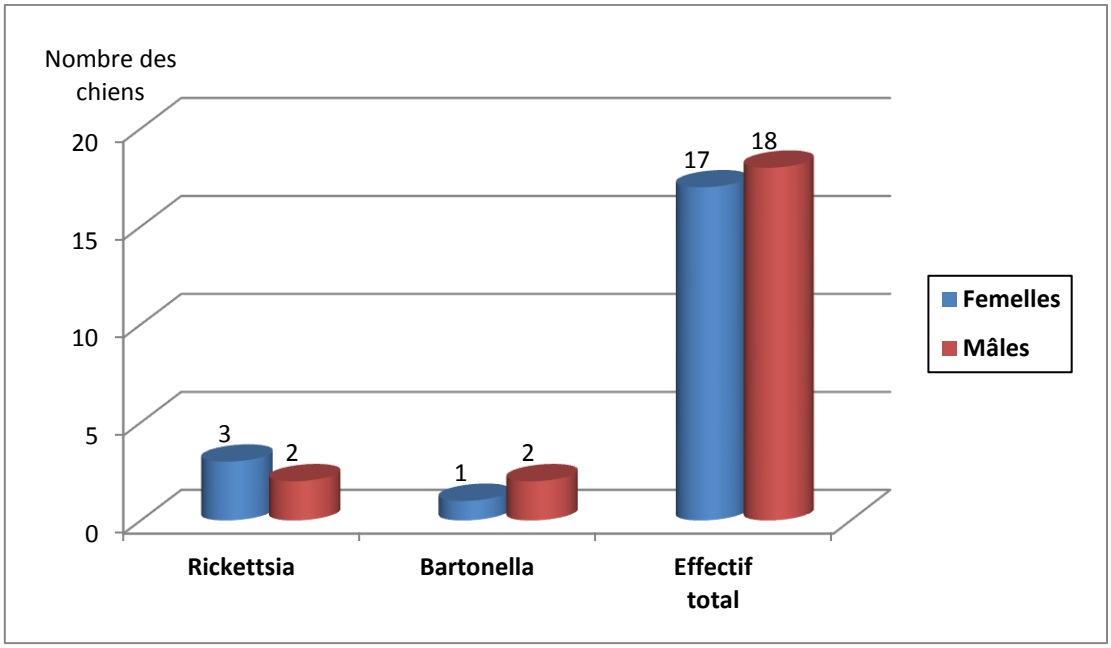


Fig. 57: Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction du sexe des chiens

IV.1.3. Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'âge des chiens

Les chiens prélevés sont répartis en deux tranches d'âge. Cette distribution donne lieu à une prédominance de la tranche d'âge de plus d'un 1 an avec 29 sujets (82,86%). Les jeunes chiens de moins d'1 an ne sont pas nombreux avec seulement 6 sujets, soit 17,14% des chiens analysés par PCR.

La répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'âge des chiens dépistés par la PCR en temps réel, est la suivante :

Tableau 13 : Récapitulatifs des infections à *Rickettsia sp* par tranches d'âges chez les chiens

Age	Nb de cas Positifs	Nb de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
< 1 an (06)	**01**	**05**	16,66	< 0,05
> 1 an (29)	**04**	**25**	13,97	

Tableau 14 : Récapitulatifs des infections à *Bartonella sp* par tranches d'âges chez les chiens

Age	Nb de cas Positifs	Nb de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
< 1 an (06)	**01**	**05**	16,66	< 0,05
> 1 an (29)	**02**	**27**	6,89	

La tranche la plus touchée est celle âgée de moins d'1 an. Ces différences de pourcentages par rapport à la tranche d'âge sont non significatives à $p < 0,05$. Donc le facteur « âge » n'influence pas sur le taux d'infection par les rickettsioses et les bartonelloses chez les chiens.

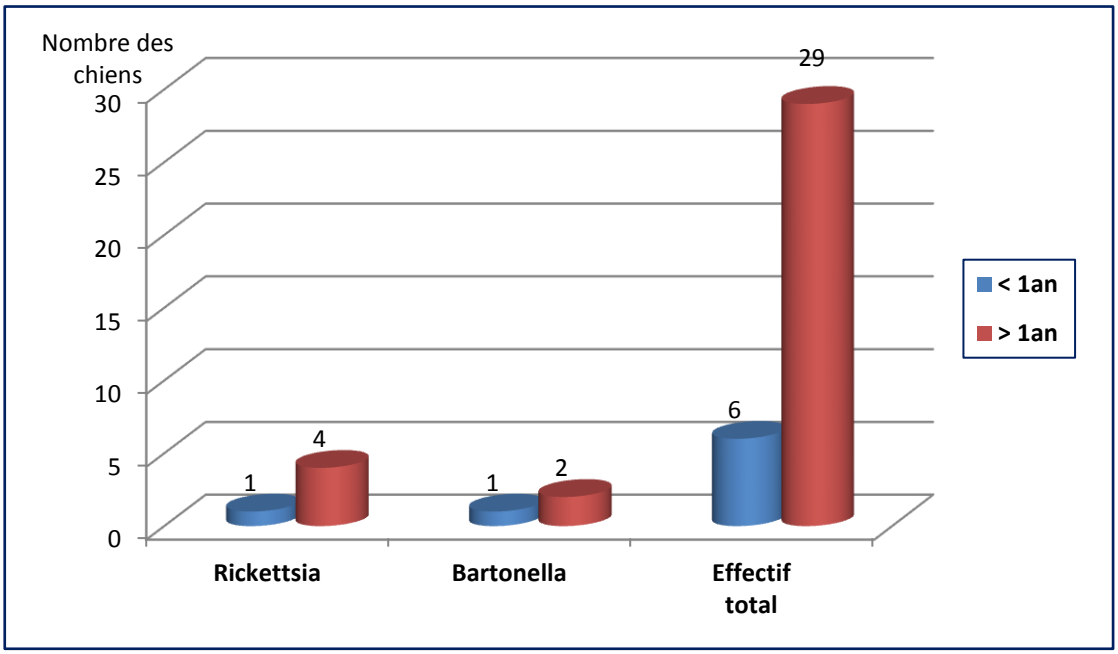


Fig. 58 : Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'âge des chiens

IV.1.4. Les observations cliniques sur les chiens

Deux (02) chiens sur les 07 positifs ont manifesté des signes cliniques non spécifiques (Tableau 15), soit 28,57%. Les deux chiens étaient en mauvais état général (cachexie et abattement) avec une infestation par des ectoparasites lors de l'examen. Notons aussi, que les signes ne sont pas constants pour toutes les rickettsioses et les bartonelloses. 71,43% des chiens positifs étaient asymptomatiques.

Tableau 15 : Les renseignements cliniques des chiens atteints de rickettsioses et de bartonelloses

Observations cliniques / N° des chiens	État général	TC°	Muqueuses	Tégument	Parasitisme externe	PCR real time	
						Rick	Barto
N°15	Mauvais	39,2°	Pâle	Croûtes	tiques + et puces+++	+	+
N°47	Mauvais	39,8°	Pâle	Croûtes et dépilation	tiques++ et puces+	+	-

Rick: *Rickettsia*, Barto: *Bartonella*.

IV.2. Chez l'espèce féline

IV.2.1. Les résultats globaux

Sur les 25 chats analysés, Cinq (05) chats se sont révélés positifs à *Bartonella sp*, soit 20 % des rates analysées par PCR real time et deux (02) chats positifs à *Rickettsia sp*, soit 8 %.

Il n'existe pas de co-infections chez les chats testés.

Remarque : Tous les chats positifs sont de race croisée.

IV.2.2. Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction du sexe des chats

Les échantillons analysés par PCR sont pris au hasard sur les 45 prélèvements effectués. Sur un total de 25 prélèvements de rates de chats, 16 sont des femelles et 9 sont des mâles, soit des taux respectifs de 64 % et de 36 %.

Le pourcentage de positivité des chats par *Rickettsia sp* est de 11,11 % chez les mâles contre 6,25 % chez les femelles. Cette différence entre les deux sexes est non significative à $p < 0,05$.

Tableau 16: Récapitulatifs des infections à *Rickettsia sp* chez les chats par sexe

Sexe	Nb de cas Positifs	Nb de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
Femelles (16)	**01**	**15**	6,25 %	< 0,05
Mâles (09)	**01**	**08**	11,11 %	

Nos résultats montrent que le taux d'infection par *Bartonella sp* chez les chats, est supérieur chez les femelles par apport aux males. Statistiquement cette différence est non significative à $p < 0,05$.

Cela indique que le niveau d'infection par les bartonelloses chez les chats de notre étude, n'est pas influencé par le sexe de ces animaux.

Tableau 17: Récapitulatifs des infections à *Bartonella sp* chez les chats par sexe

Sexe	Nb de cas Positifs	Nb de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
Femelles (16)	**04**	**12**	25 %	< 0,05
Mâles (09)	**01**	**08**	11,11 %	

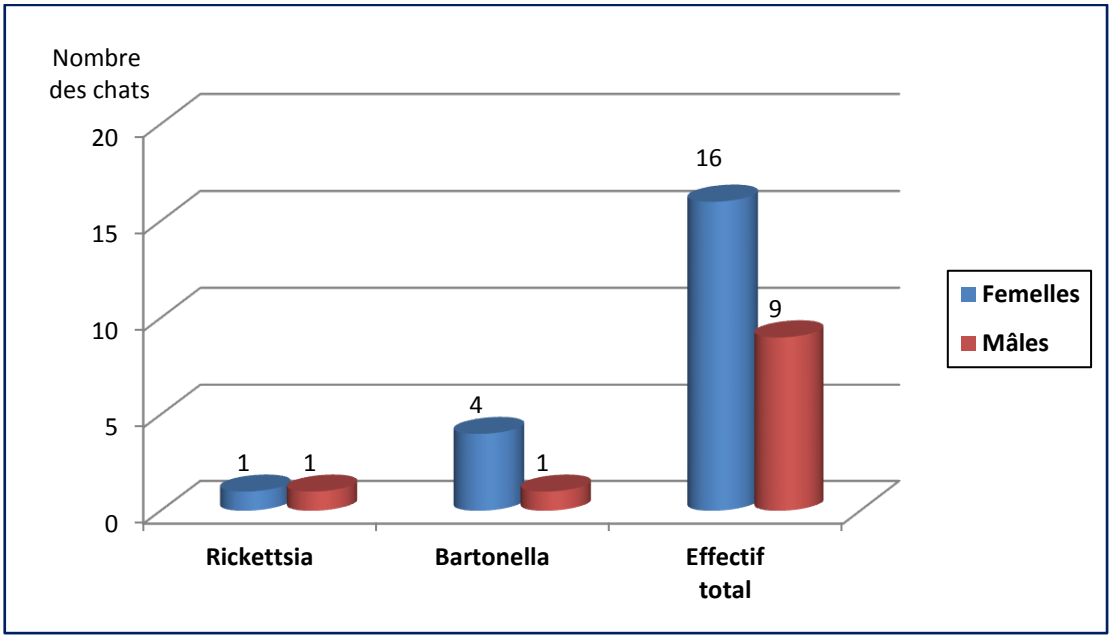


Fig. 59: Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction du sexe des chats

IV.2.3. Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'âge des chats

Sur les 25 chats testés par PCR, les adultes sont en grand nombre avec 21 cas (84 %), alors que les jeunes chats de moins d'1 an sont seulement 4 cas, soit 16 %. Ceci est dû au nombre élevés des chats adultes prélevés à la fourrière canine.

Sur le total des chats dépistés par PCR en temps réel, les deux chats positifs à *Rickettsia sp* sont âgés de plus de 1 an.

Tableau 18: Récapitulatifs des infections à *Rickettsia sp* par tranches d'âges chez les chats

Age	Nb de cas Positifs	Nb de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
< 1 an (04)	**0**	**04**	**0**	**< 0,05**
> 1 an (21)	**02**	**19**	**9,52**	

La tranche la plus touchée par *Bartonella sp.* est celle âgée de moins d'1 an avec 1 cas positif sur 4 chats testés par PCR real time, soit un taux de 25 %. La différence dans les pourcentages par rapport à la tranche d'âge est non significative à $p < 0,05$. Donc le facteur « âge » n'influence pas sur le taux d'infection par *Bartonella* chez les chats de notre étude.

Tableau 19 : Récapitulatifs des infections à *Bartonella sp* par tranches d'âges chez les chats

Age	Nb de cas Positifs	Nb de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
< 1 an (04)	**01**	**03**	**25**	**< 0,05**
> 1 an (21)	**04**	**17**	**19,05**	

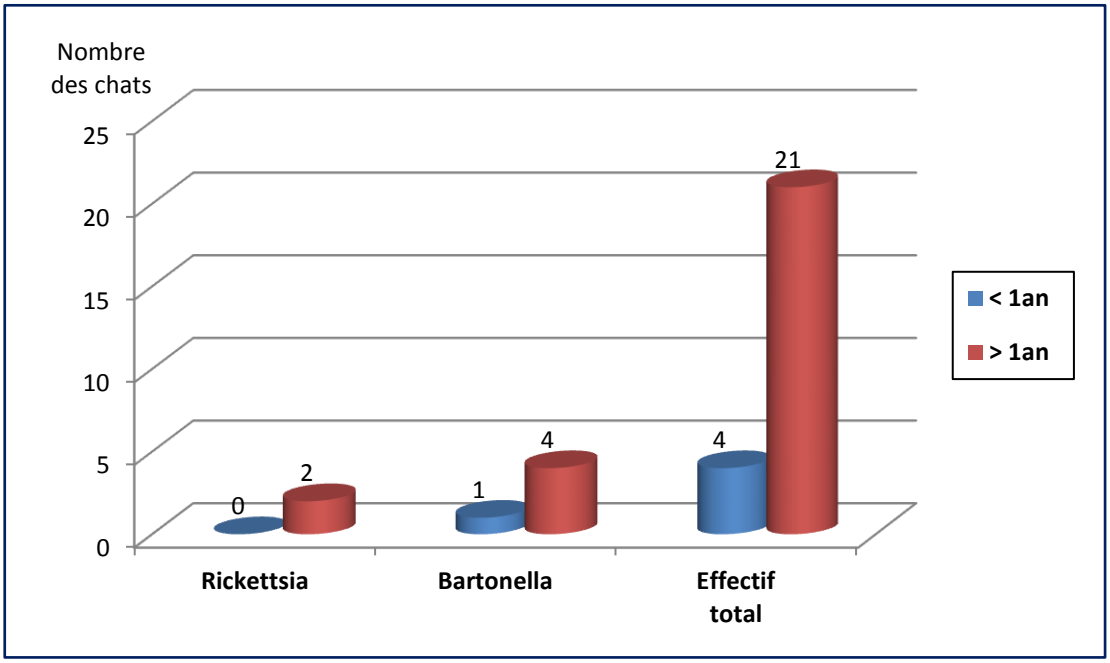


Fig. 60 : Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'âge des chats

IV.2.4. Les observations cliniques sur les chats

Parmi les 7 chats positifs, un chat était en mauvais état général (cachexie et poil terne) et un chat présentait une pâleur des muqueuse avec une infestation par des puces; Les cinq (05) autres ne présentaient aucun signe clinique ni infestation par les puces.

Tableau 20 : Les renseignements cliniques des chats atteints de rickettsioses et de bartonelloses

Observations cliniques / N° des chiens	État général	Muqueuses	Tégument	Parasitisme externe	PCR real time	
					Rick	Barto
N°15	Bon	Pale	Normal	Puces +	-	+
N°47	Mauvais	Pale	Terne	-	+	-

Rick: *Rickettsia*, Barto: *Bartonella*.

IV.3. Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'espèce animale

Dans la présente étude, Les chiens sont plus touchés par *Rickettsia spp.* avec un taux de 14,28%, par rapport aux chats qui présentent une positivité de 8 %.

Tableau 21: Récapitulatifs des infections à *Rickettsia sp* en fonction de l'espèce animale

Age	Nb de cas Positifs	Nb de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
Chiens (35)	**05**	**30**	**14.28**	**< 0,05**
Chats (25)	**02**	**23**	**8**	

Par contre, l'infection par *Bartonella spp.* est plus importante chez les chats par rapport aux chiens avec un taux 20 %.

Tableau 22: Récapitulatifs des infections à *Bartonella sp* en fonction de l'espèce animale

Age	Nb de cas Positifs	Nb de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
Chiens (35)	**03**	**32**	**8.57**	**< 0,05**
Chats (25)	**05**	**20**	**20**	

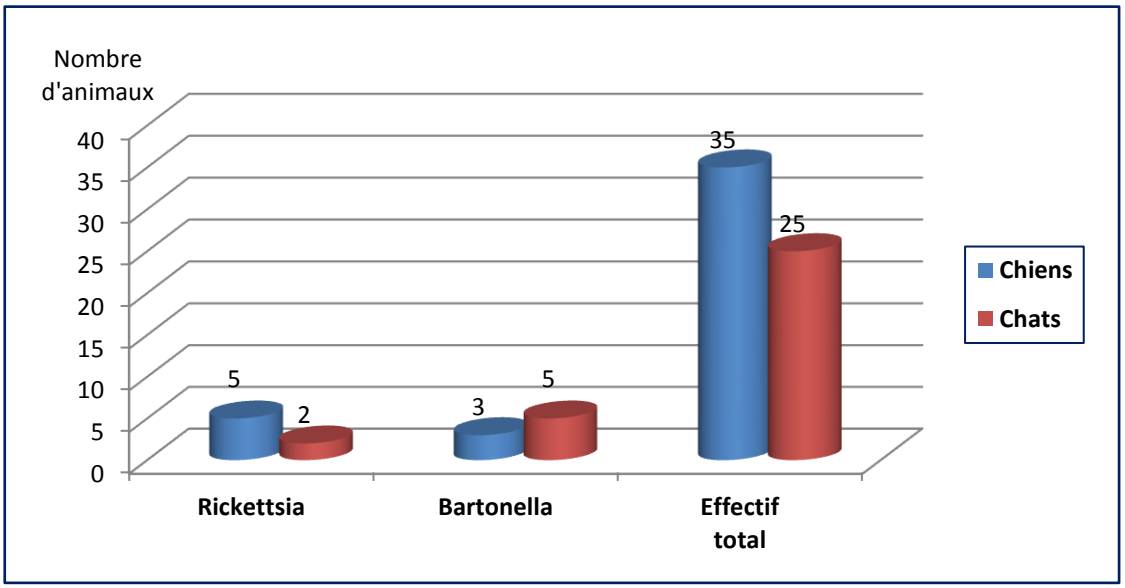


Fig. 61: Répartition des rickettsioses et des bartonelloses en fonction de l'espèce

La différence du degré d'infection par *Rickettsia* et *Bartonella* chez les chiens et les chats sont non significatives par les tests statistiques. Ceci est dû au nombre réduit des résultats positifs obtenus chez ces 2 espèces animales et au faible nombre des animaux analysés.

2ème PARTIE
ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III
Discussion

Nous rapportons la première enquête sur la recherche de *Rickettsia spp*. et de *Bartonella spp*. dans les échantillons de rates chez les animaux domestiques en Algérie.

Le tissu de rate est jugé apte à l'extraction et l'amplification de l'ADN de ces agents infectieux comme le montrent plusieurs recherches réalisées dans le monde et en Algérie (Morick et *al*., 2009; Bitam et *al*., 2009b; Ohad et *al*., 2010). En effet l'ADN de *Bartonella* a été récemment amplifié à partir du tissu splénique chez un chien en Espagne et un autre en Israël (Ohad et *al*., 2010; Tabar et *al*., 2011). En Algérie, l'ADN de *Bartonella* a été détecté dans des rates provenant des rongeurs et insectivores (Bitam et *al*., 2009b).

Tandis que *Rickettsia sp*. a été largement recherché dans les rates de rongeurs et plusieurs études expérimentales ont supposé que la rate peut représenter un organe cible pour les rickettsies chez les animaux réservoirs (Groves et Kelly, 1989; Rehácek et *al*., 1992).

Notre analyse moléculaire montre que la PCR en temps réel a détecté plus de résultats positifs par rapport à la PCR standard. L'échec de cette dernière à amplifier l'ADN dans certains échantillons de rates peut être expliqué par le fait que l'ADN de *Rickettsia* ou *Bartonella* était présent mais à un nombre de copies inférieures à la limite détectable de la PCR standard.

I. RÉSULTATS OBTENUS À PARTIR DU RÉSERVOIR CANIN

I.1. Résultats globaux

I.1.1. Recherche de *Rickettsia spp*.

L'exposition à *Rickettsia* chez les chiens de différentes régions géographiques du monde a déjà été largement évaluée par des tests sérologiques. Par ailleurs, il y'a plusieurs études qui n'ont pas permis d'identifier l'ADN de *Rickettsia sp*. dans le sang des chiens en Italie (Cocco et *al.*, 2003), en Pologne (Rymaszewska et Adamska, 2011), à Hong Kong (Wong et *al*., 2011) et en Californie (Beeler et *al*., 2011).

Sur les 35 rates de chiens analysées dans notre étude, un seul chien est positif à *Rickettsia sp* par la PCR standard soit 2,86 %, alors que cinq chiens se sont révélés porteurs de l'ADN de *Rickettsia sp* par la PCR en temps réel soit 14,28%.

Nos résultats montrent la présence de la bactérie au sein de la population canine, ceci a été prouvé dans peu d'études. La détection de *Rickettsia sp* dans le sang de ces animaux à l'aide de la PCR classique a été rapportée au japon par Satoh et *al*. (2002) avec une prévalence de 2,35 % (8/340) et au Pérou par Forshey et *al*. (2010) avec un taux d'atteinte de 1,26 % soit un seul chien sur les 79 testés par PCR.

Plus récemment, en Australie, Hii et *al*. (2011) ont montré la présence de *Rickettsia sp* dans le sang de 9 chiens sur 100 analysés par PCR (soit 9 %), alors qu'au Portugal, Alexandre et *al*. (2011) ont décelé 7 cas positifs parmi 51 chiens suspects de maladies transmises par les tiques (soit 13,72%).

Dans notre recherche, le pourcentage de chiens présentant une infection active à *Rickettsia* constaté lors de la PCR en temps réel est relativement élevé. Nous supposons que le diagnostic des rickettsioses à partir du tissu splénique peut contribuer à la recherche de rickettsies chez les animaux errants car en se basant sur les données moléculaires des recherches citées précédemment, il ya une rickettsémie rare chez les chiens.

En outre, la PCR en temps réel est potentiellement plus sensible et spécifique par rapport à la PCR standard. De plus, elle fournit des informations quantitatives et c'est un test très utile au diagnostic des rickettsioses (Richards, 2004).

I.1.2. Recherche de *Bartonella spp*.

Concernant la recherche de *Bartonella sp.* chez les chiens, tout les résultats sont négatifs par la PCR standard alors que 8,57 % (soit 3/35) des échantillons de rates de chiens analysés par PCR en temps réel, sont retrouvés positifs.

La bartonellose chez le chien a été étudiée en Algérie par Kernif et *al.* (2010) en utilisant la PCR standard, ces derniers ont rapporté une positivité de 6.25% (soit 5/80) par la détection de trois espèces de *Bartonella* : *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *Bartonella clarridgeiae* et *Bartonella elizabethae*, à partir des prélèvements sanguins des chiens domestiques provenant de la wilaya d'Alger.

Comparativement à notre résultat positif, la différence dans le pourcentage par rapport à cette étude, peut être expliquée par la méthode moléculaire utilisée ou bien par le type de prélèvement effectué.

En effet, la prévalence de l'ADN de *Bartonella* dans le sang des chiens est faible. Récemment trois études ont montré que moins de 2 % des chiens analysés par PCR, étaient positifs à *Bartonella*, aux États-Unis (Tsai et *al*., 2010; Levy et *al*., 2011) et en Pologne (Rymaszewska et Adamska, 2011). De plus, *Bartonella* a été amplifié dans seulement 1 sur 198 échantillons de sang à partir d'une population de chiens présentant des anomalies clinico-compatible avec les infections transmises par les tiques (Diniz et *al*., 2007).

Le taux d'infection à *Bartonella* chez les chiens décelé dans notre recherche est relativement important par rapport au nombre faible des sujets testés. Ce constat affirme la présence de ces agents pathogènes chez les chiens errants de la région d'Alger. Ces derniers peuvent, par

conséquent, présenter une source de propagation de l'infection chez les humains ou d'autres animaux.

Grâce à l'utilisation de pré-enrichissement en milieu de culture suivie par l'amplification par PCR, Bai et *al*. (2010) ont fourni des preuves d'infections à *Bartonella* dans le sang des chiens errants en Thaïlande avec une prévalence importante de 31,3% (60/192) par rapport à celle décrite dans notre cas. En effet cette méthode a amélioré le taux de détection de *Bartonella* chez les chiens.

I.2. Résultats en fonction du sexe et de l'âge

Breitschwerdt et *al.* (1998) aux USA n'ont constaté aucune prédisposition de sexe ou de l'âge des chiens vis-à-vis des agents de *Bartonella*. Également, Baneth et *al.* (1998) en Israël, ont fait la même constatation sur 40 chiens étudiés pour la recherche de *Bartonella* et *Rickettsia.*

Dans notre cas, la répartition des rickettsioses en fonction du sexe et de l'âge des chiens est non significative. Donc nos résultats concordent avec ceux des auteurs cités précédemment.

En Algérie, kernif (2007) a établi l'inexistence d'une prédisposition du sexe vis-à-vis des rickettsioses (*Bartonella* et *Rickettia*). Toutefois pour l'âge, la proportion était importante pour les chiens adultes.

I.3. Résultats en fonction des signes cliniques

Sur les sept (07) chiens atteints de rickettsioses, deux (02) ont présenté des signes cliniques, peu évidents**.** Cela démontre la limite de l'examen clinique dans la détection des rickettsioses. Le diagnostic clinique n'est pas suffisant pour suspecter ces pathologies.

Dans notre cas, deux chiens atteints de rickettsioses soit 28,57 %, présentaient un mauvais état général avec une légère fièvre ainsi qu'une infestation par des ectoparasites.

Dans une étude menée au Brésil, 2 cas d'infections naturelles par *Rickettsia* chez des chiens ont été confirmés par des analyses moléculaires. Les deux chiens présentaient un état fébrile accompagné d'une léthargie et anorexie avec infestation de tiques (Labruna et *al*., 2009). En outre, trois cas de fièvre chez des chiens ont été attribués à *Rickettsia* par PCR en Sicile (Solano-Gallego et *al.*, 2008).

Les autres chiens positifs (soit 5/7) de la présente étude étaient en bon état général lors de l'examen clinique. Ceci concorde avec une étude expérimentale où Kelly et *al*. (1992) ont montré que les chiens avaient tous une infection asymptomatique associée à une séroconversion avec rickettsémie intermittente. D'autre part, l'ADN de *Bartonella* a été détecté par PCR en temps réel dans une ponction de rate provenant d'une chienne asymptomatique en Israël (Ohad et *al*., 2010).

Par contre en Espagne, la détection de *Bartonella sp*. dans la rate était associée a une maladie granulomateuse généralisée diagnostiquée chez une chienne de trois ans (Tabar et *al*., 2011).
Les espèces de *Bartonella* affectant le chien ont été associées à une large variété de manifestations cliniques incluant principalement les atteintes cardiaques ainsi qu'une léthargie, anémie et perte de poids comme le montre plusieurs études (Chomel et *al.*, 2001; Mexas et *al*., 2002; Sykes et *al.*, 2006).

Dans notre cas, deux parmi les 3 chiens infectés par *Bartonella* étaient en bonne santé à l'examen physique. Cependant, nous ne pouvons pas établir un diagnostic définitif, sans avoir exclu une atteinte cardiaque.

Dans la présente étude nous rapportons un cas de co-infection par *Rickettsia* et *Bartonella* chez un chien infesté par des tiques et des puces. Une étude sérologique et moléculaire menée aux états unis a montré que les chiens exposés aux ectoparasites ont présenté un taux de co-infection élevé par *Bartonella* et *Rickettsia* (Kordick et *al*., 1999b).

II. RÉSULTATS OBTENUS À PARTIR DU RÉSERVOIR FÉLIN

II.1. Résultats globaux

II.1.1. Recherche de *Bartonella spp*.

Les chats sont considérés comme le principal réservoir d'espèces de *Bartonella* zoonotiques (Staggemeier et *al*., 2010).

Nos résultats montrent que 8 % (2/25) des chats errants sont positifs à *Bartonella sp*. par la PCR standard, alors que 20 % (soit 5/25) se sont révélés porteurs de l'ADN de *Bartonella sp.* par la PCR en temps réel.

Les prévalences moléculaires obtenues dans notre recherche restent inferieures à celle (70,6%) rapportée par Pennisi et *al*. (2009) dans le sang d'une population de chats d'Italie, à celle (58%) rapportée par Kamrani et *al*. (2008) à partir d'un petit échantillon de sang (n = 45) chez les chats errants de Canada et à celle déclarée par Kim et *al*. (2009) chez les chats domestiques (33,3%) de la Corée du Sud.

Le taux d'infection à *Bartonella* chez les chats errants, obtenu dans notre essai est relativement faible. Cela est dû au faible nombre de rates analysées et d'animaux prélevés.

Cependant, les pourcentages de positivité obtenus ici sont plus élevés que ceux indiqués dans d'autres rapports, y compris les rapports d'Écosse ou seulement 3 chats domestiques parmi les 52 testés (5,8%), ont présenté une PCR positive sur les échantillons de sang (Bennett et *al*., 2011). La différence dans le pourcentage avec cette étude peut être liée au type de la population féline. Effectivement, la prévalence de la bartonellose chez les chats errants est plus élevée par rapport aux chats domestiques, étant donné qu'ils sont en contact étroit avec d'autres animaux et qu'ils sont fréquemment infestés par des puces infectées (Chesnay, 2004).

Comparativement au taux d'infection obtenu par la PCR en temps réel dans notre étude, *Bartonella spp* a été détecté dans les échantillons de sang des chats, avec une prévalence de 17,02% (8/47) au Brésil (Staggemeier et *al*., 2010), de 19,4% (20/103) aux États-Unis (Tsai et *al*., 2010) et de 17% (8/47) en Espagne (Solano-Gallego et *al*., 2006b).

Très récemment, dans le but de déterminer le taux de détection de *Bartonella sp*. chez les chats par PCR en temps réel. 169 échantillons de sang ont été analysés en Allemagne, les résultats ont montré une positivité de 16,6% soit 28 sur 169 chats (Mietze et *al*., 2011). Les données moléculaires de cette étude corrobent avec notre prévalence obtenue par la PCR real time et illustrent l'avantage de cette dernière dans la détection de *Bartonella sp*. chez les chats.

Il est difficile de faire des comparaisons directes avec d'autres études car les variables telles que le climat, les infestations par les puces, l'âge et le statut immunitaire des chats semblent tous influencer sur la prévalence de la bartonellose.

II.1.2. Recherche de *Rickettsia spp*.

En ce qui concerne la recherche de *Rickettsia*, très peu de chats ont été prouvés atteints d'une infection active, ceci a été constaté uniquement par Wedincamp et Foil (2000) par la détection moléculaire de la bactérie chez des chats infectés expérimentalement. En effet plusieurs études ont montré une séropositivité à *Rickettsia* chez les chats mais ces derniers n'ont pas été évalués par PCR ou culture (Sorvillo et *al*., 1993; Breitschwerdt et *al*., 2005b; Case et *al*., 2006; Labruna et *al.*, 2007).

Dans une étude menée aux États-Unis, la PCR a été utilisée pour tenter d'amplifier l'ADN de *Rickettsia* à partir de 92 prélèvements sanguins de chats et 92 puces provenant des mêmes chats : 62 des 92 (67,4%) puces étaient positives par contre tout les échantillons de sang était négatifs à la PCR (Hawley et *al*., 2007). En outre aucune infection active par *Rickettsia sp.* n'a été observée sur 47 chats diagnostiqués par PCR en Espagne (Solano-Gallego et *al*., 2006b).

Plus récemment, trois autres enquêtes moléculaires ont échoué à amplifier l'ADN de la bactérie à partir des prélèvements sanguins des chats aux États-Unis (Bayliss et *al.*, 2009), au Pérou (Forshey et *al*., 2010) et en Écosse (Bennett et *al*., 2011). Ce qui suggère que la rickettsémie est rare chez les chats (Kamrani et *al*., 2008).

À notre connaissance, aucun rapport n'a été publié sur des preuves moléculaires de la présence de *Rickettsia* chez les chats infectés naturellement. Ceci peut s'expliquer par le caractère transitoire de l'infection sanguine par *Rickettsia sp*. chez les chats, comme cela a été prouvé expérimentalement par Wedincamp et Foil (2000).

Dans notre étude nous avons réussi à détecter l'ADN de *Rickettsia* dans la rate de deux chats parmi les 25 analysés (8%) grâce à la PCR en temps réel. Ce résultat suggère que les rickettsies peuvent être séquestrées dans la rate. D'autre part, l'ADN de *Rickettsia* a été amplifié à partir des rates d'opossums par PCR (Williams et *al*., 1992).

II.2. Résultats en fonction du sexe et de l'âge

Les chatons et les jeunes chats apparaissent comme la source principale de *Bartonella sp.* et semblent plus fréquemment infectés que les chats adultes (Heller et *al*., 1997; Chomel et *al*., 1995; Pennisi et *al*., 2009). Notre population féline compte 25% de chats positifs de moins de 1 an soit un jeune chat sur 4 analysés. L'influence de l'âge sur la prévalence de l'infection à *Bartonella* n'est pas significative dans notre cas. Ceci s'explique par le fait que nous avons obtenu un faible nombre de résultats positifs, et la taille réduite des effectifs analysés est une limite à l'interprétation des résultats.

Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé une association significative entre l'infection par *Bartonella* et le sexe des chats, ce constat concorde avec une étude faite en Italie par Pennisi et *al*. (2009). De plus, Solano-Gallego et *al*. (2006b) ont constaté qu'il n'y avait aucune relation entre l'âge ou le sexe des chats et les résultats positifs de *Bartonella*.

II.3. Résultats en fonction des signes cliniques

Les chats infectés naturellement par *Bartonella sp* semblent ne pas développer des signes cliniques et sont considérés comme des réservoirs asymptomatiques (Chomel et *al*., 2004; Boulouis et *al*., 2005b; Breitschwerdt et Kordick, 2000). Ce constat concorde avec nos résultats, la majorité des chats positifs étaient en bon état général lors de l'examen clinique.

L'infestation par les puces est décrite comme étant un facteur d'exposition à une infection par *Bartonella sp* (Chomel et *al*., 1995; Chesnay, 2004).

Les chats de notre étude n'étaient pas très exposés au parasitisme par les puces car la période de prélèvements était en hivers où l'importance et l'activité des parasites externe diminuent.

Les caractéristiques et les critères définissant les populations animales étudiés lors de ces enquêtes moléculaires sont très diverses et les données rapportées ne sont pas toujours précises. De plus le nombre des animaux analysés dans notre étude est très faible. Donc parfois délicates à comparer et à interpréter.

Le nombre élevé des résultats négatifs obtenus dans notre recherche peut être expliqué :

- Soit par la présence des smears d'ADN sur le gel de contrôle de qualité d'extraction, ce qui témoigne d'une éventuelle dégradation de nos échantillons d'ADN.
- Soit par la présence d'hémoglobine et/ou d'hémine dans le tissu splénique, qui sont des inhibiteurs puissants de la réaction de PCR.

Les conditions écologiques locales, la composition des communautés biotiques, y compris les rongeurs et les arthropodes, et de nombreux autres facteurs environnementaux qui aboutissent au changement climatique, pourraient avoir contribué aux résultats positifs obtenus dans la présente recherche. Étant donné que les chats et les chiens errants sont en contact permanent avec les rongeurs et leurs ectoparasites qui représentent un réservoir important de plusieurs espèces de *Bartonella* et de *Rickettsia* en Algérie (Bitam et *al*., 2006; Bitam, 2008; Bitam et *al*., 2009a; 2009b; 2010; 2011).

La détection de l'ADN des agents de rickettsioses dans les échantillons de rates des chiens et des chats errants suggère que ces derniers peuvent jouer un rôle de réservoir et hôte sentinelle aidant à évaluer et à caractériser la distribution des souches circulantes dans la wilaya d'Alger.

Ces animaux errants jouent certainement un rôle dans la transmission de *Rickettsia* et *Bartonella* aux animaux de compagnie et, par conséquent, aux humains dans notre pays.

Nos résultats montrent aussi l'intérêt des techniques moléculaires et particulièrement la PCR en temps réel dans le diagnostic de ces infections ainsi que la découverte de nouveaux réservoirs abritant ces agents zoonotiques.

CONCLUSION

Conclusion générale

L'objectif de ce travail est de rechercher les agents de rickettsioses et de bartonelloses chez les chiens et les chats errants dans la région d'Alger par des méthodes moléculaires. Et de mettre en évidence le rôle de ces animaux dans l'épidémiologie de ce groupe de maladies qui présentent un risque de zoonoses.

Les chiens et les chats de notre étude étaient une population errante provenant des différentes communes de la wilaya d'Alger. Des prélèvements de rates ont été réalisés à partir de ces animaux au niveau de la fourrière canine d'El Harrach.

Les résultats obtenus par la PCR standard ont montré que 2,86 % des chiens étaient infectés par *Rickettsia sp.* et 8 % des chats étaient positifs à *Bartonella sp*.

Alors que l'analyse moléculaire par la PCR en temps réel a décelé :

- Des taux d'infection à *Rickettsia sp.* de : 14,28% chez les chien et 8 % chez les chats.
- Ainsi que des taux de positivité à *Bartonella sp.* de : 20 % chez les chats et 8,57 % chez les chiens.

Le présent travail a permis de conclure que :

- Les carnivores domestiques peuvent jouer un rôle de sentinelle et réservoir potentiels de rickettsioses et bartonelloses en Algérie.
- La découverte de ces bactéries chez le chien et le chat suggère que ces agents pourraient être responsables de maladies infectieuses humaines d'étiologie inconnue dans notre pays.
- La PCR en temps réel est beaucoup plus sensible et spécifique que la PCR standard dans la détection de ces agents pathogènes chez les animaux réservoirs.

En conclusion, ces résultats préliminaires nécessitent des investigations complémentaires en vue de connaître et caractériser les espèces de *Rickettsia* et de *Bartonella* qui infectent les chiens et les chats en Algérie par le séquençage moléculaire et de préciser les différents modes de transmission de ces deux pathogènes émergents. Ceci sera l'objet de mon doctorat.

Perspectives

L'étude de ces agents intracellulaires est la voie de nombreux champs de recherches :

- Des enquêtes de séroprévalences des rickettsioses et des bartonelloses chez les chiens et les chats, sont nécessaires pour préciser le rôle de ces animaux en tant que sentinelles épidémiologique de ces infections en Algérie.

- Des études ultérieures devraient êtres réalisées pour une meilleure compréhension du rôle de réservoir joué par les vertébrés (les animaux de compagnie ainsi que les animaux sauvages) dans l'épidémiologie des rickettsioses et des bartonelloses. Ceci est une priorité pour la mise en œuvre appropriée des mesures de contrôle prophylactique.

- Des recherches en vue d'une surveillance entomologique des vecteurs sont nécessaires, souvent de nouvelles rickettsies ont été détectées dans des tiques ou des puces recueillies sur des animaux avant qu'elles soient considérées comme des agents de maladies humaines. Cette stratégie de détection, des rickettsies, symbiontes des arthropodes, est indispensable à l'identification de maladies émergentes.

- D'autres investigations complémentaires sont justifiées en vue d'isoler ces espèces de bactéries, de déterminer leurs facteurs de virulence et d'approfondir les connaissances sur la pathogénie des infections qui causent.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ABOUDHARAM G., VU D.L., DAVOUST B., DRANCOURT M., RAOULT D. (2005):** Molecular detection of *Bartonella spp*. in the dental pulp of stray cats buried for a year. *Microb Pathog*. 38(1), p: 47-51.

2. **ALEXANDRE N., SANTOS A.S., BACELLAR F., BOINAS F.J., NÚNCIO M.S., DE SOUSA R. (2011):** Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). *Ticks Tick Borne Dis*. 2(2), p: 119-122.

3. **AZAD A.F., RADULOVIC S., HIGGINS J.A., NODEN B.H., TROYER J.M. (1997):** Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerg Infect Dis*. 3(3), p: 319-327.

4. **BACELLAR F., DAWSON J.E., SILVEIRA C.A., FILIPE A.R. (1995):** Antibodies against *Rickettsiaceae* in dogs of Setubal, Portugal. *Cent Eur J Public Health*. 3(2), p: 100-102.

5. **BAI Y., KOSOY M.Y., BOONMAR S., SAWATWONG P., SANGMANEEDET S., PERUSKI L.F. (2010):** Enrichment culture and molecular identification of diverse *Bartonella* species in stray dogs. *Vet Microbiol*. 146(3-4), p: 314-319.

6. **BANETH G., BREITSCHWERDT E.B., HEGARTY B.C., PAPPALARDO B., RAYAN J. (1998):** A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. *Veterinary Parasitology*. 74 (2-4), p: 133-142.

7. **BATISTA F.G., SILVA D.M., GREEN K.T., TEZZA L.B., VASCONCELOS S.P., CARVALHO S.G., SILVEIRA I., MORAES-FILHO J., LABRUNA M.B., FORTES F.S., MOLENTO M.B. (2010):** Serological survey of *Rickettsia sp*. in horses and dogs in a non-endemic area in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 19(4), p: 205-209.

8. **BAYLISS D.B., MORRIS A.K., HORTA M.C., LABRUNA M.B., RADECKI S.V., HAWLEY J.R., BREWER M.M., LAPPIN M.R. (2009):** Prevalence of *Rickettsia* species antibodies and *Rickettsia* species DNA in the blood of cats with and without fever. *J Feline Med Surg*. 11(4), p: 266-270.

9. **BEELER E., ABRAMOWICZ K.F., ZAMBRANO M.L., STURGEON M.M., KHALAF N., HU R., DASCH G.A., EREMEEVA M.E. (2011):** A focus of dogs and *Rickettsia* massiliae-infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. *Am J Trop Med Hyg*. 84(2), p: 244-249.

10. **BENABDELLAH A., MOUFFOK N., BENSAAD M., BELKADI KOUIED A., RAZIK F. (2007):** Mediterranean-spotted fever: clinical and laboratory characteristics of 34 children in Oran (Algeria). *Pathol Biol* (Paris). 55(10), p: 539-542.

11. **Benjaballah M. (2006):** Rôle prophylactique de la fourrière canine. Journée de formation sur les MTH et les zoonoses. EL-Harrach : secteur sanitaire.

12. **BENNETT A.D., GUNN-MOORE D.A., BREWER M., LAPPIN M.R. (2011):** Prevalence of *Bartonella* species, *haemoplasmas* and *Toxoplasma gondii* in cats in Scotland. *J Feline Med Surg.* 13(8), p: 553-557.

13. **BENSLIMANI A., FENOLLAR F., LEPIDI H., BOUREZAG S.E., BOUGHERBAL R., ISSAD M.S., CHENTIR M.T., MERAD K., REDJIMI M., AMRANE M.O., DJENAS M., KEZZAL K. and RAOULT D. (2007):** Role of *Bartonella quintana* in infective endocarditis in Algeria. *Revue Francophone des Laboratoires*. Vol 2007, Issue 396, Supplément 1, P: 11-16.

14. **BENSLIMANI A., FENOLLAR F., LEPIDI H., RAOULT D. (2005):** Bacterial zoonoses and infective endocarditis, Algeria. *Emerg Infect Dis*. 11(2), p: 216-224.

15. **BERMÚDEZ C.S., ZALDÍVAR A.Y., SPOLIDORIO M.G., MORAES-FILHO J., MIRANDA R.J., CABALLERO C.M., MENDOZA Y., LABRUNA M.B. (2011):** Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá. *Vet Parasitol*. 177(1-2), p: 134-138.

16. **BERRICH M., KIEDA C., GRILLON C., MONTEIL M., LAMERANT N., GAVARD J., BOULOUIS H.J., HADDAD N. (2011):** Differential Effects of *Bartonella henselae* on Human and Feline Macro- and Micro-Vascular Endothelial Cells. *PLoS One*. 6(5): e20204.

17. **BILLETER S.A., LEVY M.G., CHOMEL B.B. and BREITSCHWERDT E.B. (2008):** Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol*. 22, p: 1-15.

18. **BIRTLES R.J., HARRISON T.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*. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 45(1), p: 1-8.

19. **BITAM I., BAZIZ B., KERNIF T., HARRAT Z., PAROLA P., RAOULT D. (2009a):** Molecular detection of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in fleas from Algeria. *Clin Microbiol Infect*. 15 (2), p: 255-256.

20. **BITAM I., DITTMAR K., PAROLA P., WHITING M.F., RAOULT D. (2010):** Fleas and flea-borne diseases. *Int J Infect Dis*., 14(8), p: 667-676.

21. **BITAM I., PAROLA P., DE LA CRUZ K.D., MATSUMOTO K., BAZIZ B., ROLAIN J-M., BELKAID M. and RAOULT D. (2006):** First Molecular detection of *Rickettia felis* in fleas from Algeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74(4), p: 532-535.

22. **BITAM I., PAROLA P., GUNDI V.A.K.B., ROLAIN J. M. and RAOULT D.** Identification of *Bartonella* species including human pathogens and new species ('*Candidatus Bartonella eldjazairii*') in fleas from Algeria. *vect borne zoonotic dis.* (Submitted for publication in 2007, unpublished). Cited in **BITAM I. (2008) :** Approche moléculaire de l'épidémiologie des bactéries transmises par les puces en Algérie. Thèse de doctorat. Université de la Méditerranée, Unité des Rickettsies. 180 Pages.

23. **BITAM I., ROLAIN J.M., KERNIF T., BAZIZ B., PAROLA P., RAOULT D. (2009b):** *Bartonella* species detected in rodents and hedgehogs from Algeria. *Clin Microbiol Infect*. 15 (2), p: 102-103.

24. **BITAM I., ROLAIN J.M., NICOLAS V., TSAI Y.L., PAROLA P., GUNDI V.A., CHOMEL B.B., RAOULT D. (2011):** A multi-gene analysis of diversity of *Bartonella* detected in fleas from Algeria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*.

25. **BITAN E.C. (2002) :** Les bactéries hémotropes : aspects bactériologique, épidémiologique, clinique chez le chien et pathologie comparée chez l'homme. Thèse pour le doctorat vétérinaire. L'école nationale vétérinaire de Toulouse, 126 pages.

26. **BLAGBURN B.L., DRYDEN M.W. (2009):** Biology, treatment, and control of flea and tick infestations. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 39(6), p: 1173-1200.

27. **BOOSTROM A., BEIER M.S., MACALUSO J.A., MACALUSO K.R., SPRENGER D., HAYES J., RADULOVIC S., AZAD A.F. (2002):** Geographic association of *Rickettsia felis*-infected opossums with human murine typhus, Texas. *Emerg Infect Dis*. 8(6), p: 549-554.

28. **BOULOUIS H.J., CHANG C.C., HENN J.B., KASTEN R.W., CHOMEL B.B. (2005a):** Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet. Res*. Volume 36 (3), p: 383-410.

29. **BOULOUIS H.J., HADDAD N., MAILLARD R., MARIGNAC G., VAYSSIER-TAUSSAT M. (2007):** les infections à *Bartonella* chez l'homme et l'animal : aspects diagnostiques et thérapeutiques. *Revue francophone des laboratoires*, N : 391, p : 33-40.

30. **BOULOUIS H.J., MAILLARD R., HALOS L., VAYSSIER- TAUSSAT M., CHOMEL B. (2005b):** Les infections à *Bartonella* chez les mammifères. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*. 298, p: 30 - 34.

31. **BOULOUIS H.J., MARIGNAC G., HADDAD N., MAILLARD R., CHOMEL B. (2008):** les animaux réservoirs et victimes des *Bartonella*. Mémoire, *Bull. Acad. Vét.* France - Tome 161 - N°3, pages 211-220.

32. **BREITSCHWERDT E.B et KORDICK D.L. (2000):** *Bartonella* infection in animals: carrier ship, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev*. 13, p: 428 - 438.

33. **BREITSCHWERDT E.B. (2008):** Feline bartonellosis and cat scratch disease. *Vet Immunol Immunopathol*.123, p: 167-171.

34. **BREITSCHWERDT E.B., BLANN K.R., STEBBINS M.E., MUNANA K.R., DAVIDSON M.G., JACKSON H.A., WILLARD M.D. (2004):** Clinicopathological abnormalities and treatment response in 24 dogs seroreactive to *Bartonella vinsonii (berkhoffii*) Antigens. *J Am Anim Hosp Assoc*. 40, p: 92 – 10.

35. **BREITSCHWERDT E.B., DAVIDSON M.G., AUCOIN D.P., LEVY M.G., SZABADOS N.S., HEGARTY B.C., KUEHNE A.L., JAMES R.L. (1991):** Efficacy of chloramphenicol, enrofloxacin, and tetracycline for treatment of experimental Rocky Mountain spotted fever in dogs. *Antimicrob Agents Chemother*. 35(11), p: 2375-2381.

36. **BREITSCHWERDT E.B., HEGARTY B.C. et HANCOCK S.I. (1998):** Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii* and *Bartonella vinsonii. J. Clin. Microbiol*. 36(9), p: 2645-2651.

37. **BREITSCHWERDT E.B., HEGARTY B.C., MAGGI R., HAWKINS E., DYER P. (2005a):** *Bartonella* species as a potential cause of epistaxis in dogs. *J Clin Microbiol*. 43, p: 2529 - 2533.

38. **BREITSCHWERDT E.B., KORDICK D.L., MALARKEY D.E., KEENE B., HADFIELD T.L., WILSON K. (1995):** Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. *J Clin Microbiol*. 33, p: 154 – 160.

39. **BREITSCHWERDT E.B., LEVINE J.F., RADULOVIC S., HANBY S.B., KORDICK D.L., LA PERLE K.M.D. (2005b):** *Bartonella henselae* and *Rickettsia* seroreactivity in a sick cat population from North Carolina. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine***.** 3 (4), p: 287-302**.**

40. **BREITSCHWERDT E.B., MAGGI R.G., DUNCAN A.W., NICHOLSON W.L., HEGARTY B.C. and WOODS C.W. (2007a):** *Bartonella* species in blood of immunocompetent persons with animal and arthropod contact. *Emerg Infect Di*. 13, p: 938–941.

41. **BREITSCHWERDT E.B., MAGGI R.G., SIGMON B. and NICHOLSON W.L. (2007b):** Isolation of *Bartonella quintana* from a woman and a cat following putative bite transmission. *J Clin Microbiol*.45, p: 270–272.

42. **BREITSCHWERDT, E. B., MEUTEN D. J., WALKER D. H., LEVY M. G., KENNEDY K., KING M. and CURTIS B. C. (1985):** Canine Rocky Mountain spotted fever: a kennel epizootic. *Am. J. Vet. Res.* 46 (10), p: 2124-2128.

43. **BRENNER D. J., KRIEG N. R., GARRITY G. M., STALEY J. T. (2005):** Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria, Part 3. *Edition 2 by springer*. Volume 2, page: 138.

44. **BRENNER D.J., O'CONNOR S.P., WINKLER H.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. *Int J Syst Bacteriol*. 43(4), p: 777-786.

45. **BRUMPT E. (1932):** Longévité du virus de la fièvre boutonneuse (*Rickettsia conorii* n. sp.) chez la tique *Rhipicephalus sanguineus*. *C R Soc Biol*. 110, p: 1119.

46. **BURGDORFER W., NEWHOUSE V.F., PICKENS E.G., LACKMAN D.B. (1962):** Ecology of Rocky Mountain spotted fever in Western Montana. *Am J Hyg*. 76, p: 293-301.

47. **CAPITTA P., ZOBBA R., MASALA G., COCCO R., TOLA S., PARPAGLIA M.L. (2010):** Isolation and characterization of *Bartonella* strains in cats in Italy. *Transbound Emerg Dis*. 57(3), p: 201-204.

48. **CASE J.B., CHOMEL B., NICHOLSON W., FOLEY J.E. (2006):** Serological survey of vector-borne zoonotic pathogens in pet cats and cats from animal shelters and feral colonies. *J Feline Med Surg*. 8(2), p: 111-117.

49. **CHANG C.C., CHOMEL B.B., KASTEN R.W., ROMANO V and TIETZE N. (2001):** Molecular Evidence of *Bartonella* spp. in Questing Adult *Ixodes pacificus* Ticks in California. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 39, N° 4, p: 1221-1226.

50. **CHANG C.C., KASTEN R.W., CHOMEL B.B., SIMPSON D.C., HEW C.M., KORDICK D.L., HELLER R., PIEMONT Y., BREITSCHWERDT E.B. (2000):** Coyotes (*Canis latrans*) as the reservoir for a human pathogenic *Bartonella sp*.: molecular epidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* infection in coyotes from central coastal California. *J clin Microbiol*. 38, p: 4193- 4200.

51. **CHESNAY A. M. C.S. (2004):** Évaluation des zoonoses et gestion de populations de chats errants dans 4 unités militaires du sud-ouest. Mémoire de PFE. L'école nationale vétérinaire de Toulouse, 103 pages.

52. **CHOMEL B. B., ABBOTT R.C., KASTEN R. W., FLOYD-HAWKINS K.A., KASS P. H., GLASER C.A., PEDERSEN N. C., KOEHLER J.E. (1995):** *Bartonella henselae* Prevalence in Domestic Cats in California: Risk Factors and Association between Bacteremia and Antibody Titers. *Journal of clinical microbiology*. 33 (9), p: 2445-2450.

53. **CHOMEL B.B. ET KASTEN R.W. (2010):** Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 109, issue 3, p: 743-750.

54. **CHOMEL B.B., BOULOUIS H.J. et BREITSCHWERDT E.B. (2004):** Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *J Am Vet Med Assoc*. 224, p: 1270-1279.

55. **CHOMEL B.B., BOULOUIS H.J., BREITSCHWERDT E.B., KASTEN R.W., VAYSSIER-TAUSSAT M., BIRTLES R.J., KOEHLER J.E., DEHIO C. (2009):** Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella species* to their hosts and vectors. *Vet Res*. 40(2), p: 29.

56. **CHOMEL B.B., BOULOUIS H.J., MARUYAMA S., BREITSCHWERDT E.B. (2006):** *Bartonella spp*. in pets and effect on human health. *Emerg Infect Dis*. 12(3), p: 389-394.

57. **CHOMEL B.B., KASTEN R.W., FLOYD- HAWKINS K., CHI B., YAMAMOTO K., ROBERTS-WILSON J., GURFIELD A.N., ABBOTT R.C., PEDERSEN N.C., KOEHLER J.E. (1996):** Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol*. 34, p: 1952 - 1956.

58. **CHOMEL B.B., MAC DONALD K.A., KASTEN R.W., CHANG C.C., WEY A.C., FOLEY J.E., THOMAS W.P., KITTLESON M.D. (2001):** Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*. *J Clin Microbiol*. 39, p: 3548 - 3554.

59. **CHOMEL B.B., WEY A.C., KASTEN R.W. (2003b):** Isolation of *Bartonella washoensis* from a dog with mitral valve endocarditis. *J Clin Microbiol*. 41, p: 5327 - 5332.

60. **CHOMEL B.B., WEY A.C., KASTEN R.W., STACY B.A., LABELLE P. (2003a):** a case of endocarditis associated with *Bartonella henselae* type I infection in a domestic cat. *J Clin Microbiol*. 1, p: 5337 - 5339.

61. **CIVEN R. et NGO V. (2008):** Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease. *Clin Infect Dis*. 46(6), p: 913-918.

62. **COCCO R., SANNA G., CILLARA M.G., TOLA S., XIMENES L., PINNAPARPAGLIA M.L., MASALA G. (2003):** Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. *Ann N Y Acad Sci*. 990, p: 126-130.

63. **CONOR A et BRUCH A. (1910):** Une fièvre éruptive observée en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot Filial*. 8, p:492-496.

64. **COTTÉ V., BONNET S., LE RHUN D., LE NAOUR E., CHAUVIN A., BOULOUIS H.J., LECUELLE B., LILIN T., VAYSSIER-TAUSSAT M. (2008):** Transmission of *Bartonella henselae* by Ixodes ricinus. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 14, No. 7, P: 1074- 1080.

65. **DAVOUST B., MEDIANNIKOV O., MARIÉ J.L., SOCOLOVSCHI C., PAROLA P. et RAOULT D. (2010):** Les animaux vertébrés sont-ils réservoirs de rickettsies? Mémoire. *Bull. Acad. Vét.* France .Tome 163, N°4/5, p: 291- 302.

66. **DEHIO C. (2005):** *Bartonella*–host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nature Reviews Microbiology*. 3, p: 621-631.

67. **DENIS F. et PLOY M.C. (2007):** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson, 573 pages.

68. **DINIZ P.P., MAGGI R.G., SCHWARTZ D.S., CADENAS M.B., BRADLEY J.M., HEGARTY B., BREITSCHWERDT E.B. (2007):** Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet Res*. 38(5), p: 697-710.

69. **DUNCAN A.W., MAGGI R.G., BREITSCHWERDT E.B. (2007):** *Bartonella* DNA in dog saliva. *Emerg Infect Dis*. 13, p: 1948 - 5190.

70. **DUNCAN A.W., MARR H.S., BIRKENHEUER A.J., MAGGI R.G., WILLIAMS L.E., CORREA M.T., BREITSCHWERDT E.B. (2008):** *Bartonella* DNA in the blood and lymph nodes of Golden Retrievers with lymphoma and in healthy controls. *J Vet Intern Med*. 22(1), p: 89-95.

71. **EDOUARD S. and RAOULT D. (2009):** *Bartonella henselae*, un agent d'infections biquitaires. *Médecine et Maladies Infectieuses*. Volume 40, Issue 6, P: 319-330.

72. **ELCHOS B.N. et GODDARD J. (2003):** Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs and their owner. *J Am Vet Med. Assoc*. 223 (10), pages: 1450-1452.

73. **ETIENNE J. (2000):** Biochimie, génétique et biologie moléculaire. 6ème édition MASSON, Paris, 505p.

74. **EUZÉBY J.P. (2002):** *Bartonella henselae*. *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire*. Sur le site : http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/henselae.html

75. **EUZÉBY J.P. (2010):** *BARTONELLA. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.* Sur le site : http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/bartonella.html

76. **FAVACHO A.R., ROZENTAL T., CALIC S.B., SCOFIELD M.A., LEMOS E.R. (2011):** Fatal Brazilian spotless fever caused by *Rickettsia rickettsii* in a dark-skinned patient. *Rev Soc Bras Med Trop*. 44(3), p: 395-396.

77. **FOIL L., ANDRESS E., FREELAND R.L., ROY A.F., RUTLEDGE R., TRICHE P.C., O'REILLY K.L. (1998):** Experimental infection of domestic cats with *Bartonella* henselae by inoculation of Ctenocephalides felis (*Siphonaptera : Pulicidae*) feces. *J Med Entomol*. 35, p: 625 - 628.

78. **FORSHEY B.M., STEWART A., MORRISON A.C., GÁLVEZ H., ROCHA C., ASTETE H., EZA D., CHEN H.W., CHAO C.C., MONTGOMERY J.M., BENTZEL D.E., CHING W.M., KOCHEL T.J. (2010):** Epidemiology of spotted fever group and typhus group rickettsial infection in the Amazon basin of Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 82(4), p: 683-690.

79. **FOUCAULT C., BROUQUI P., RAOULT D. (2006):** *Bartonella quintana* characteristics and clinical management. *Emerg Infect Dis*. 12(2), p: 217-223.

80. **FOURNIER P.E., DUMLER J.S., GREUB G., ZHANG J., WU Y., RAOULT D. (2003):** Gene sequence-based criteria for identification of new *rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis sp*. nov. *J Clin Microbiol*. 41(12), p: 5456-5465.

81. **FOURNIER P.E., TAYLOR C., ROLAIN J.M., BARRASSI L., SMITH G., RAOULT D. (2007):** *Bartonella australis sp*. nov. from kangaroos, Australia. *Emerg Infect Dis*. 13, p: 1961 - 1962.

82. **GARNIER J.-M., JURQUET A.-L., RETORNAZ K., FOURNIER P.-E. and MINODIER P. (2008):** La fièvre boutonneuse méditerranéenne chez l'enfant. *Archives de Pédiatrie*. 16 (2), p: S93-S95.

83. **GASSER A.M., BIRKENHEUER A.J., BREITSCHWERDT E.B. (2001):** Canine Rocky Mountain Spotted fever: a retrospective study of 30 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*. 37(1), p: 41-48.

84. **GILLESPIE T.N., WASHABAU R.J., GOLDSCHMIDT M.H., CULLEN J.M., ROGALA A.R., BREITSCHWERDT E.B. (2003):** Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* DNA in hepatic specimens from two dogs with hepatic disease. *J Am Vet Med Assoc*. 222, p: 47 - 51.

85. **GLAUS T., HOFMANN-LEHMANN R., GREENE C., GLAUS B., WOLFENSBERGER C., LUTZ H. (1997):** Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol*. 35, p: 2883 – 2885.

86. **GOODMAN R.A. et BREITSCHWERDT E.B. (2005):** Clinicopathologic findings in dogs seroreactive to *Bartonella henselae* antigens. *Am J Vet Res*. 66, p: 2060 - 2064.

87. **GREENE C.E. et BREITSCHWERDT E.B. (2006):** Rocky Mountain spotted fever, murine typhuslike disease, rickettsialpox, typhus, and Q fever. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd ed. Saunders Elsevier, St Louis. P: 232-245.

88. **GRINDEM C.B., BREITSCHWERDT E.B., PERKINS P.C., CULLINS L.D., THOMAS T.J., HEGARTY B.C. (1999):** Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc*. 35(1), p: 56-61.

89. **GROVES M.G. et KELLY D.J. (1989):** Characterization of factors determining *Rickettsia tsutsugamushi* pathogenicity for mice. *Infect Immun*. 57(5), p: 1476-1482.

90. **GUNDI V.A., BOURRY O., DAVOUST B., RAOULT D., LA SCOLA B. (2004):** *Bartonella clarridgeiae* and *B. henselae* in dogs, Gabon . *Emerg Infect Dis*. 10, p: 2261 - 2262.

91. **GUPTILL L. (2010):** Bartonellosis. *Veterinary Microbiology*. Volume 140, Issues 3-4, Pages 347-359.

92. **GUPTILL L., SLATER L.N., WU C.C., LIN T.L., GLICKMAN L.T., WELCH D.F., TOBOLSKI J., HOGENESCH H. (1998):** Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of *Bartonella henselae* in experimentally infected cats. *Vet Immunol Immunopathol*. 65, p: 177 - 189.

93. **GURFIELD A.N., BOULOUIS H.J., CHOMEL B.B., HELLER R., KASTEN R.W., YAMAMOTO K., PIEMONT Y. (1997):** Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cats. *J Clin Microbiol*. 35(8), p: 2120-2123.

94. **GURFIELD A.N., BOULOUIS H.J., CHOMEL B.B., KASTEN R.W., HELLER R., BOUILLIN C., GANDOIN C., THIBAULT D., CHANG C.C., BARRAT F., PIEMONT Y. (2001):** Epidemiology of *Bartonella* infection in domestic cats in France. *Vet Microbiol*. 80, p: 185 - 198.

95. **GYLES C. L., PRESCOTT J. F., SONGER G., THOEN C. O., D.V.M., PH.D., THOEN C. O. (2011):** Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. *John Wiley and Sons*, p: 607.

96. **HALOS L., JAMAL T., MAILLARD R., GIRARD B., GUILLOT J., CHOMEL B., VAYSSIER-TAUSSAT M., BOULOUIS H.J. (2004):** Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of *Bartonella spp*. infecting wild and domestic ruminants. *Appl Environ Microbiol*. 70, p: 6302 - 6305.

97. **HARRUS S., LIOR Y., EPHROS M., GRISARU-SOEN G., KEYSARY A., STRENGER C., JONGEJAN F., WANER T., BANETH G. (2007):** *Rickettsia conorii* in humans and dogs: seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel. *Am J Trop Med Hyg*. 77(1), p: 133-135.

98. **HAWLEY J.R., SHAW S.E., LAPPIN M.R. (2007):** Prevalence of *Rickettsia felis* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J Feline Med Surg*. 9(3), p: 258-262.

99. **HELLER R., ARTOIS M., XEMAR V., DE BRIEL D., GEHIN H., JAULHAC B., MONTEIL H., PIEMONT Y. (1997):** Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J Clin Microbiol*. 35, p: 1327 - 1331.

100. **HENN J. B., GABRIEL M.W., KASTEN R. W., BROWN R. N., KOEHLER J.E., MACDONALD K. A., KITTLESON M. D., THOMAS W.P., CHOMEL B. B. (2009):** Infective Endocarditis in a Dog and the Phylogenetic Relationship of the Associated "*Bartonella rochalimae*" Strain with Isolates from Dogs, Gray Foxes, and a Human. *J Clin Microbiol*. 47(3), p: 787-790.

101. **HENN J.B., LIU C.H., KASTEN R.W., VANHORN B.A., BECKETT L.A., KASS P.H., CHOMEL B.B. (2005):** Seroprevalence of antibodies against *Bartonella* species and evaluation of risk factors and clinical signs associated with seropositivity in dogs from northern California. *Am J Vet Res*. 66, p: 688 - 694.

102. **HENN J.B., VANHORN B.A., KASTEN R.W., KACHANI M., CHOMEL B.B. (2006):** Antibodies to *Bartonella vinsonii* subsp*. berkhoffii* in Moroccan dogs. *Am J Trop Med Hyg*. 74, p: 222 - 223.

103. **HERRERO C., PELAZ C., ALVAR J., MOLINA R., VÁZQUEZ J., ANDA P., CASAL J., MARTIN-BOURGON C. (1992):** Evidence of the presence of spotted fever group *rickettsiae* in dogs and dog ticks of the central provinces in Spain. *Eur J Epidemiol*. 8(4), p: 575-579.

104. **HIDALGO M., VESGA J.F., LIZARAZO D., VALBUENA G. (2009):** À survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 80 (6), p: 1029-1030.

105. **HII S.F., KOPP S.R., ABDAD M.Y., THOMPSON M.F., O'LEARY C.A., REES R.L., TRAUB R.J. (2011):** Molecular Evidence Supports the Role of Dogs as Potential Reservoirs for *Rickettsia felis*. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 11(8), p: 1007-1012.

106. **HORTA M.C., LABRUNA M.B., SANGIONI L.A., VIANNA M.C., GENNARI S.M., GALVÃO M.A., MAFRA C.L., VIDOTTO O., SCHUMAKER T.T., WALKER D.H. (2006):** Prevalence of antibodies to spotted fever group *rickettsiae* in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. *Ann N Y Acad Sci*. 1078, p: 180-184.

107. **HOUPIKIAN P. et RAOULT D. (2003):** Western immunoblotting for *Bartonella* endocarditis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 10(1), p: 95-102.

108. **IFR48. (2006b):** Autres bactéries du genre *Bartonella*. Unité des Rickettsies de Marseille, France. (Sur le site http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Autres_bartonella.html)

109. IFR48. (2006c): *Rickettsia conorii* subspecies conorii. (Sur le site http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/FBM.html)

110. IFR48. (Institut Fédératif de Recherche 48) (2006a): *Bartonella henselae* et maladie des griffes du chat - Sérologie. (Sur le site http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Bartonella_henselae.html)

111. JONES S.L., MAGGI R., SHULER J., ALWARD A., BREITSCHWERDT E.B. (2008): Detection of *Bartonella henselae* in the Blood of 2 Adult Horses. *J Vet Intern Med*. 22, p: 495 - 498.

112. KAMRANI A., PARREIRA V. R., GREENWOOD J. et PRESCOTT J. F. (2008): The prevalence of *Bartonella, hemoplasma*, and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 72 (5), p: 411-419.

113. KARPATHY S.E., HAYES E.K., WILLIAMS A.M., HU R., KRUEGER L., BENNETT S., TILZER A., VELTEN R.K., KERR N., MOORE W., EREMEEVA M.E. (2009): Detection of *Rickettsia felis* and *Rickettsia typhi* in an area of California endemic for murine typhus. *Clin Microbiol Infect*. 15s2, p: 218-219.

114. KELLY P., ROLAIN J.M., MAGGI R., SONTAKKE S., KEENE B., HUNTER S., LEPIDI H., BREITSCHWERDT K.T., BREITSCHWERDT E.B. (2006): *Bartonella quintana* endocarditis in dogs. *Emerg Infect Dis*. 12(12), p: 1869-1872.

115. KELLY P.J. et MASON P.R. (1991): Tick-bite fever in Zimbabwe. Survey of antibodies to *Rickettsia* conorii in man and dogs, and of *rickettsia*-like organisms in dog ticks. *S Afr Med J*. 80(5), p: 233-236.

116. KELLY P.J., MATTHEWMAN L.A., MASON P.R., COURTNEY S., KATSANDE C., RUKWAVA J. (1992): Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*. *J Trop Med Hyg*. 95(5), p: 322-326.

117. KERNIF T. (2007): Contribution à l'étude des réservoirs et des vecteurs des agents des rickettsioses (par des techniques moléculaires) et des piroplasmoses dans la région d'Alger. Mémoire de magister. École nationale vétérinaire d'Alger, 138 pages.

118. KERNIF T., AISSI M., DOUMANDJI S.E., CHOMEL B.B., RAOULT D., BITAM I. (2010): Molecular Evidence of *Bartonella* Infection in Domestic Dogs from Algeria, North Africa, by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 83(2), p: 298-300.

119. KIDD L., MAGGI R., DINIZ P.P., HEGARTY B., TUCKER M., BREITSCHWERDT E. (2008): Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group *Rickettsia* in dog blood. *Vet Microbiol*. 129(3-4), p: 294-303.

120. KIM Y.S., SEO K.W., LEE J.H., CHOI E.W., LEE H.W., HWANG C.Y., SHIN N.S., YOUN H.J., YOUN H.Y. (2009): Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea. *J Vet Sci.* 10, p: 85-87.

121. KOEHLER J.E., GLASER C.A., TAPPERO J.W. (1994): *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA*. 271, p: 531- 535.

122. KORDICK D.L. et BREITSCHWERDT E.B. (1997): Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. *Am J Vet Res*. 58 (5), p: 492-497.

123. KORDICK D.L., BROWN T.T., SHIN K., BREITSCHWERDT E.B. (1999a): Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J Clin Microbiol.* 37, p: 1536-1547.

124. KORDICK S.K., BREITSCHWERDT E.B., HEGARTY B.C., SOUTHWICK K.L., COLITZ C.M., HANCOCK S.I., BRADLEY J.M., RUMBOUGH R., MCPHERSON J.T., MACCORMACK J.N. (1999b): Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol*. 37(8), p: 2631-2638.

125. LA SCOLA B. et RAOULT D. (1996): Serological cross-reactions between *Bartonella quintana, Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol*. 34(9), p: 2270-2274.

126. LA SCOLA B. et RAOULT D. (1997): Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol*. 35(11), p: 2715-2727.

127. LABRUNA M.B., KAMAKURA O., MORAES-FILHO J., HORTA M.C., PACHECO R.C. (2009): Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 15(3), p: 458-460.

128. LABRUNA M.B., OGRZEWALSKA M., MORAES- FILHO J., LEPE, P., GALLEGOS J.L., LÓPEZ J. (2007): *Rickettsia felis* in Chile. *Emerg Infect Dis*. 13(11), p: 1794-1795.

129. LAPPIN M.R., KORDICK D.L., BREITSCHWERDT E.B. (2000): *Bartonella spp*. antibodies and DNA in aqueous humour of cats. *J Feline Med Surg*. 2, p: 61 - 68.

130. LEVIN M.L., KILLMASTER L.F., ZEMTSOVA G.E. (2011): Domestic Dogs (*Canis familiaris*) as Reservoir Hosts for *Rickettsia* conorii. *Vector Borne Zoonotic Dis*. PMID: 21923270.

131. LEVY J.K., LAPPIN M.R., GLASER A.L., BIRKENHEUER A.J., ANDERSON T.C., EDINBORO C.H. (2011): Prevalence of infectious diseases in cats and dogs rescued following Hurricane Katrina. *J Am Vet Med Assoc*. 238(3), p: 311-317.

132. LOCATELLI C. (2003): les bactéries du genre *Bartonella* infectant le chat : prévalence de *Bartonella henselae* et *Bartonella clarridgeiae*. détection par immunofluorescence de *Bartonella clarridgeiae* dans les érythrocytes. *Th. Med. Vet*., Lyon, ENVL. 191 pages.

133. MACALUSO K.R., PORNWIROON W., POPOV V.L., FOIL L.D. (2008): Identification of *Rickettsia felis* in the salivary glands of cat fleas. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 8(3), p: 391-396.

134. MAGGI R.G., DUNCAN A.W. et BREITSCHWERDT E.B. (2005a): Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *Bartonella* species. *J Clin Microbiol* 43, p: 2651-2655.

135. MAGGI R.G., HARMS C.A., HOHN A.A., PABST D.A., MCLELLAN W.A., WALTON W.J., ROTSTEIN D.S., BREITSCHWERDT E.B. (2005b): *Bartonella henselae* in porpoise blood. *Emerg Infect Dis*. 11 (12), p: 1894 - 1898.

136. MAILLARD R., PETIT E., CHOMEL B., LACROUX C., SCHELCHER F., VAYSSIER-TAUSSAT M., HADDAD N., BOULOUIS H.J. (2007): Endocarditis in cattle caused by *Bartonella bovis*. *Emerg Infect Dis*. 13, p: 1383 - 1385.

137. MATTHEWMAN L., KELLY P., HAYTER D., DOWNIE S., WRAY K., BRYSON N., RYCROFT A., RAOULT D. (1997): Domestic cats as indicators of the presence of spotted fever and typhus group *rickettsiae*. *Eur J Epidemiol*. 13(1), p: 109-111.

138. MAURIN M. (2003): *Rickettsia*. Cours de Bactériologie Médicale. Faculté de Médecine de Grenoble, France. Sur le site : http://www.microbe-edu.org/etudiant/rickettsie.html

139. MAURIN M., EB F., ETIENNE J., RAOULT D. (1997): Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol*. 35(9), p: 2283-2287.

140. MAURIN M., GASQUET S., DUCCO C., RAOULT D. (1995): MICs of 28 antibiotic compounds for 14 *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 39, p: 2387 - 2391.

141. MCELROY K. M., BLAGBURN B. L., BREITSCHWERDT E. B., MEAD P. S. and MCQUISTON J. H. (2010): Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. *Trends in Parasitology*.Vol 26, Issue 4, Pages: 197-204.

142. MCQUISTON J.H., GUERRA M.A., WATTS M.R., LAWACZECK E., LEVY C., NICHOLSON W.L., ADJEMIAN J., SWERDLOW D.L. (2011): Evidence of exposure to spotted fever group *rickettsiae* among Arizona dogs outside a previously documented outbreak area. *Zoonoses Public Health*. 58(2), p: 85-92.

143. MEXAS A.M., HANCOCK S.I., BREITSCHWERDT E.B. (2002): *Bartonella henselae* and *Bartonella elizabethae* as potential canine pathogens. *J. Clin. Microbiol*. 40, p: 4670-4674.

144. MICHAU T.M., BREITSCHWERDT E.B., GILGER B.C., DAVIDSON M.G. (2003): *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffi* as a possible cause of anterior uveitis and choroiditis in a dog. *Vet Ophthalmol*. 6, p: 299 - 304.

145. MIETZE A., MORICK D., KÖHLER H., HARRUS S., DEHIO C., NOLTE I., GOETHE R. (2011): Combined MLST and AFLP typing of *Bartonella henselae* isolated from cats reveals new sequence types and suggests clonal evolution. *Vet Microbiol*. 148(2-4), p: 238-245.

146. MIKSZEWSKI J.S. et VITE C.H. (2005): Central nervous system dysfunction associated with Rocky Mountain spotted fever infection in five dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 41, p: 259-266.

147. MILAGRES B.S., PADILHA A.F., BARCELOS R.M., GOMES G.G., MONTANDON C.E., PENA D.C., NIERI BASTOS F.A., SILVEIRA I., PACHECO R., LABRUNA M.B., BOUYER D.H., FREITAS R.N., WALKER D.H., MAFRA C.L., GALVAO M.A. (2010): *Rickettsia* in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 83(6), p: 1305-1307.

148. MORICK D., OSINGA N., GRUYS E., HARRUS S. (2009): Identification of a *Bartonella* species in the harbor seal (*Phoca vitulina*) and in seal lice (*Echinophtirius horridus*). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 9(6), p: 751-753.

149. MOUFFOK N., BENABDELLAH A., RICHET H., ROLAIN J.M., RAZIK F., BELAMADANI D., ABIDI S., BELLAL R., GOURIET F., MIDOUN N., BROUQUI P., RAOULT D. (2006): Reemergence of rickettsiosis in Oran, Algeria. *Ann N Y Acad Sci*. 1078, p: 180-184.

150. MOUFFOK N., PAROLA P., LEPIDI H., RAOULT D. (2009): Mediterranean spotted fever in Algeria - new trends. *International Journal of Infectious Diseases*. 13 (2), p: 227-235.

151. MOUFFOK N., PAROLA P., RAOULT D. (2008): Murine typhus, Algeria. *Emerg Infect Dis*. 14(4), p: 676-678.

152. MUMCUOGLU K.Y., FRISH K., SAROV B., MANOR E., GROSS E., GAT Z., GALUN R. (1993): Ecological studies on the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in southern Israel and its relationship to spotted fever group *rickettsiae*. *J Med Entomol*. 30(1), p: 114-121.

153. MURANO I., TSUNEOKA H., IINO H., KAMEI T., NAKAMURA I., TSUKAHARA M. (2001): Two patients with *Bartonella henselae* infection from a dog. *Kansenshogaku Zasshi*. 75(9), p: 808-811.

154. NEDJMA A., LAMORIL J., BOGARD M. (2005): Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris : Elsevier, 705 p.

155. NOGUERAS M.M., PONS I., ORTUÑO A., SEGURA F. (2009): Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in dogs from north-eastern Spain. *Clin Microbiol Infect*. 15s2, p: 237-238.

156. NOROY B. (2003): les conséquences de la splénectomie totale chez le chien. Thèse pour obtention de grade de docteur vétérinaire ENV de Lyon, 128 pages.

157. NOZAIS J.P., DATRY A. et DANIS M. (1996): Traité de parasitologie médicale. *Editions Paradel*, p : 44-46 ; 53-66.

158. O'REILLY K.L., BAUER R.W., FREELAND R.L., FOIL L.D., HUGHES K.J., ROHDE K.R., ROY A.F., STOUT R.W., TRICHE P.C. (1999): Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of *Bartonella henselae* (LSU16). *Infect Immun*. 67, p: 3066 - 3072.

159. OHAD D.G., MORICK D., AVIDOR B. and HARRUS S. (2009): Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella koehlerae* from aortic valves of Boxer dogs with infective endocarditis. *Vet Microbiol*. 141, p: 182-185.

160. OHAD D.G., MORICK D., AVIDOR B., HARRUS S. (2010): Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella koehlerae* from aortic valves of Boxer dogs with infective endocarditis. *Vet Microbiol*. 141(1-2), p: 182-185.

161. ORTUÑO A., CASTELLÀ J., NOGUERAS M.M., PONS I., SEGURA F. (2009): Dog as epidemiological marker of *R. conorii* infection. *Clin Microbiol Infect*. 15s2, p: 241-242.

162. OTEO, J.A., PORTILLO, A., SANTIBÁÑEZ, S., BLANCO, J.R., PÉREZ-MARTÍNEZ, L., IBARRA, V. (2006): Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from Southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. *J Clin Microbiol*. 44(7), p: 2669-2671.

163. PACHECO R.C., MORAES-FILHO J., GUEDES E., SILVEIRA I., RICHTZENHAIN L.J., LEITE R.C., LABRUNA M.B. (2011): Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Med Vet Entomol*. 25(2), p: 148-155.

164. PAROLA P. et RAOULT D. (2001): Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*. 32(6), p: 897-928.

165. PAROLA P. et RAOULT D. (2006): Tropical rickettsioses. *Clinics in Dermatology*. 24 (3), P: 191-200.

166. PARZY D., DAVOUST B., HADDAD S., VIDOR E., LECAMUS J.L. (1991): Séroprévalence de l'ehrlichiose humaine et canine. *Etude en milieu militaire dans le nord tunisien. Médecine et armées*. 19(4), p: 215-219.

167. PENNISI M.G., LA CAMERA E., GIACOBBE L., ORLANDELLA B.M., LENTINI V., ZUMMO S., FERA M.T. (2009): Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. *Res Vet Sci*. 88(3), p: 379-384.

168. PERLMAN S.J., HUNTER M.S., ZEHORI-FEIN E. (2006): The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc R Soc B*. 273, p: 2097-2106.

169. PINTER A., HORTA M.C., PACHECO R.C., MORAES-FILHO J., LABRUNA, M.B. (2008): Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica*. 24 (2), p: 247-252.

170. PIRANDA E.M., FACCINI J.L., PINTER A., PACHECO R.C., CANÇADO P.H., LABRUNA M.B. (2011): Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 11(1), p: 29-36.

171. PIRANDA E.M., FACCINI J.L., PINTER A., SAITO T. B., PACHECO R.C., HAGIWARA M.K., LABRUNA M.B. (2008): Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103 (7), p: 696-701.

172. Poitras E. et Houde A. (2002): La PCR en temps réel: principes et applications**.** *Reviews in Biology and Biotechnology.* 2(2). P: 2-11.

173. PUNDA-POLIC V., BRADARIC N., KLISMANIC- NUBER Z., MRLJAK V., GILJANOVIC M. (1995): Antibodies to spotted fever group *rickettsiae* in dogs in Croatia. *Eur J Epidemiol*. 11(4), p: 389-392.

174. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (2007): Second Edition, Sample & Assay Technologies. Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit), pages : 33-36.

175. RAOULT D. et BROUQUI P. (1998): Les rickettsioses. *Éditions Elsevier. Encyclopédie Médico-chirurgicale*: Paris, France. p: 60-86, 146-162.

176. RAOULT D. et PAROLA P. (2007): Rickettsial diseases. *Informa Healthcare USA, Inc*. p: (1-46, 87-111, 125-128).

177. RAOULT D. et RICHET H. (2010): Rapport d'activité 2009. *Unité des Rickettsies Centre National de Référence.* P : 1- 68. Sur le site : http://www.ifr48.com/IMG/pdf/Rapport_final_CNR-bilan_2009.pdf

178. RAOULT D. et ROUX V. (1997): Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 10(4), p: 694-719.

179. RAOULT D., LA SCOLA B., ENEA M., FOURNIER P.E., ROUX V., FENOLLAR F., DE LAMBALLERIE X. (2001): A flea associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg. Infect. Dis*. 7, p: 73-81.

180. RAOULT D., TOGA I., DUNAN S., DAVOUST B., QUILICI M. (1985): Mediterranean Spotted Fever in the South of France: Serosurvey of Dogs. *Trop Geogr Med*. 37, p: 258-260.

181. REHÁCEK J., URVÖLGYI J., KOCIANOVÁ E., JEDLICKA L. (1992): Susceptibility of some species of rodents to *rickettsiae*. *Folia Parasitol (Praha*. 39(3), p: 265-284.

182. REIF K.E. et MACALUSO K.R. (2009): Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *J Med Entomol*. 46(4), p: 723-736.

183. REIF K.E., KEARNEY M.T., FOIL L.D., MACALUSO K.R. (2011): Acquisition of *Rickettsia felis* by cat fleas during Feeding. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 11(7), p: 963-968.

184. RENVOISÉ and RAOULT D. (2009): L'actualité des rickettsioses. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 39 (2), p: 71-81.

185. RICHARDS A. L. (2004): Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays for Rickettsial Diseases. *RTO-MP-HFM-108.* p: 1-12.

186. RICHTER, J., FOURNIER, P.E., PETRIDOU, J., HÄUSSINGER, D., RAOULT, D. (2002): *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis*. 8, p: 207-208.

187. RODHAIN F. et PEREZ C. (1985): Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. *Edition Maloine, Paris*. Chapitre 19, p : 415- 426.

188. ROLAIN J. M., LA SCOLA B., LIANG Z., DAVOUST B., RAOULT D. (2001): Immunofluorescent Detection of Intraerythrocytic *Bartonella henselae* in Naturally Infected Cats. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 39, No. 8, p: 2978-2980.

189. ROLAIN J.M., BOUREAU-VOULTOURY A., RAOULT D. (2009): Serological evidence of *Bartonella* vinsonii lymphadenopathies in a child bitten by a dog. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2, p: 122-123.

190. ROLAIN J.M., FRANC M., DAVOUST B., RAOULT D. (2003): Molecular detection of *Bartonella quintana, B. koehlerae, B. henselae, B. clarridgeiae, Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerg Infect Dis*. 9(3), p: 338-342.

191. ROLAIN J.M., LOCATELLI C., CHABANNE L., DAVOUST B., RAOULT D. (2004): Prevalence of *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* in domestic cats from France and detection of the organisms in erythrocytes by immunofluorescence. *Clin Diagn Lab Immunol*. 11(2), p: 423-425.

192. ROVERY C., BROUQUI P., RAOULT D. (2008): Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Emerg Infect Dis*. 14(9), p: 1360-1367.

193. RYMASZEWSKA A. et ADAMSKA M. (2011): Molecular evidence of vector-borne pathogens coinfecting dogs from Poland. *Acta Vet Hung*. 59(2), p: 215-223.

194. SAISONGKORH W., ROLAIN J.M., SUPUTTAMONGKOL Y., RAOULT D. (2009): Emerging *Bartonella* in humans and animals in Asia and Australia. *J Med Assoc Thai*. 92(5), p: 707-731.

195. SAUNDERS G.K. et MONROE W.E. (2006): Systemic granulomatous disease and sialometaplasia in a dog with *Bartonella* infection. *Vet Pathol*. 43, p: 391 - 392.

196. SCHULEIN R., SEUBERT A., GILLLE C., LANZ C., HANSMANN Y., PIEMONT Y. et DEHIO C. (2001): Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes: a unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J. Exp. Med.*193, p: 1077-1086.

197. SCHWARTZMAN W. (1996): *Bartonella* (*Rochalimaea*) infections: beyond cat scratch. *Annu Rev Med*. 47, p: 355-364.

198. SEGURA-PORTA F., DIESTRE-ORTIN G., ORTUÑO- ROMERO A., SANFELIU-SALA I., FONT-CREUS B., MUÑOZ-ESPIN T., DE ANTONIO E.M., CASAL- FÁBREGA J. (1998): Prevalence of antibodies to spotted fever Group *rickettsiae* in human beings and dogs from and endemic area of mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *Eur J Epidemiol*. 14(4), p: 395-398.

199. SENNEVILLE, E., AJANA, F., LECOCQ, P., CHIDIAC, C., MOUTON, Y. (1991): *Rickettsia conorii* isolated from ticks introduced to northern France by a dog. *Lancet*. 337, p: 676.

200. SHAW S.E., DAY M.J., BIRTLES J.R. et BREITSCHWERDT B.E. (2001): Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology Review*. 17 (2), p: 74-80.

201. SMITH, R.C., GORDON, J.C., GORDON, S.W., PHILIP, R.N. (1983): Rocky Mountain spotted fever in an urban canine population. *J Am Vet Med Assoc*. 183 (12), p: 1451-1453.

202. SOLANO-GALLEGO L., HEGARTY B., ESPADA Y., LLULL J., BREITSCHWERDT E. (2006b): Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain. *Vet Microbiol*. 118(3-4), p: 274-277.

203. SOLANO-GALLEGO L., LLULL J., OSSO M., HEGARTY B., BREITSCHWERDT E. (2006a): À serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet Res*. 37, p: 231-244.

204. SOLANO-GALLEGO L., TROTTA M., CALDIN M., FURLANELLO T. (2008): Molecular survey of *Rickettsia spp.* in sick dogs in Italy. *Zoonoses Public Health*. 55(8-10), p: 521-525.

205. SORVILLO F.J., GONDO B., EMMONS R., RYAN P., WATERMAN S.H., TILZER A., ANDERSEN E.M., MURRAY R.A., BARR R. (1993): A suburban focus of endemic typhus in Los Angeles County: association with seropositive domestic cats and opossums. *Am J Trop Med Hyg*. 48(2), p: 269-273.

206. STAGGEMEIER R., VENKER C.A., KLEIN D.H., PETRY M., SPILKI F.R., CANTARELLI V.V. (2010): Prevalence of *Bartonella* henselae and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 105(7), p: 873-878.

207. SYKES J. E., KITTLESON M.D., PESAVENTO P.A., BYRNE B.A., MACDONALD K.A., CHOMEL B.B. (2006): Evaluation of the relationship between causative organisms and clinical characteristics of infective endocarditis in dogs: 71 cases (1992-2005). *J Am Vet Med Assoc*. 228, p: 1723 - 1734.

208. SYKES JE, WESTROPP JL, KASTEN RW, CHOMEL BB. (2010): Association between *Bartonella* species infection and disease in pet cats as determined using serology and culture. *J Feline Med Surg*. 12(8):631-636.

209. TABAR M. D., MAGGI R. G., ALTET L., VILAFRANCA M., FRANCINO O., ROURA X. (2011): Gammopathy in a Spanish dog infected with *Bartonella henselae. Journal of Small Animal Practice*. 52(4), p: 209-212.

210. TIJSSE-KLASEN E., FONVILLE M., GASSNER F., NIJHOF A.M., HOVIUS E.K., JONGEJAN F., TAKKEN W., REIMERINK J.R., OVERGAAUW P.A., SPRONG H. (2011): Absence of zoonotic *Bartonella* species in questing ticks: first detection of *Bartonella clarridg*eiae and *Rickettsia felis* in cat fleas in the Netherlands. *Parasit Vectors*. 18(4), p: 61.

211. TORINA A. et CARACAPPA S. (2006): Dog tickborne diseases in Silicy. *Parassitologia*. 48(1-2), p: 145-147.

212. TSAI Y.L., LIN C.C., CHOMEL B.B., CHUANG S.T., TSAI K.H., WU W.J., HUANG C.G., YU J.C., SUNG M.H., KASS P.H., CHANG C.C. (2010): *Bartonella* Infection in Shelter Cats and Dogs and Their Ectoparasites. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 11(8), p: 1023-1030.

213. VALENTINE K.H., HARMS C.A., CADENAS M.B., BIRKENHEUER A.J., MARR H.S., BRAUN-MCNEILL J., MAGGI R.G., BREITSCHWERDT E.B. (2007): *Bartonella* DNA in loggerhead sea turtles. *Emerg Infect Dis*. 13, p: 949 - 950.

214. WEDINCAMP J. J.R., FOIL L.D. (2000): Infection and seroconversion of cats exposed to cat fleas (*Ctenocephalides felis Bouché*) infected with *Rickettsia felis*. *J Vector Ecol*. 25(1), p: 123-126.

215. WEDINCAMP J. J.R., FOIL L.D. (2002): Vertical transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis Bouché*). *J Vector Ecol*. 27(1), p: 96-101.

216. WEISER I.B. et GREENE C.E. (1989): Dermal necrosis associated with Rocky Mountain spotted fever in four dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195(12), p: 1756-1758.

217. WILLIAMS S.G., SACCI JB J.R., SCHRIEFER M.E., ANDERSEN E.M., FUJIOKA K.K., SORVILLO F.J., BARR A.R., AZAD A.F. (1992): Typhus and typhus like *rickettsiae* associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol*. 30(7), p: 1758-1762.

218. WONG S.S., TENG J.L., POON R.W., CHOI G.K., CHAN K.H., YEUNG M.L., HUI J.J., YUEN K.Y. (2011): Comparative Evaluation of a Point-of-Care Immunochromatographic Test SNAP 4Dx with Molecular Detection Tests for Vector-Borne Canine Pathogens in Hong Kong. Vector *Borne Zoonotic Dis*. 11(9), p: 1269-1277.

219. YAMAMOTO K., CHOMEL B.B., KASTEN R.W., HEW C.M., WEBER D.K., LEE W.I. (2002): Experimental infection of specific pathogen free (SPF) cats with two different strains of *Bartonella henselae* type I: a comparative study. *Vet Res*. 33, p: 669 - 684.

Sources Internet

(Vérifiées le 15/12/2011)

Source Internet n° 1:

http://www.ncagr.gov/oep/oneMedicine/noms/2010/Breitschwerdt_Edward_Spotted_Fever_Group_Rickettsioses.pdf

Source Internet n° 2 :

http://www.ecosociosystemes.fr/rockymountainsfever.jpg

Source Internet n° 3 :

http://www.microbe-edu.org/professionel/diag/imgbar/bar15.jpg

Source Internet n° 4 :

http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/12/10-0647-f1.htm

http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Bartonella_henselae.html

Source Internet n° 5 :

http://www.vetmed.wsu.edu/cliented/anatomy/

Source Internet n° 6 :

http://www.promega.com/en-gb/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight-markers/benchtop-dna-markers/

Source Internet n° 7 :

http://www.ilm.pf/PCRtempsreel

ANNEXES

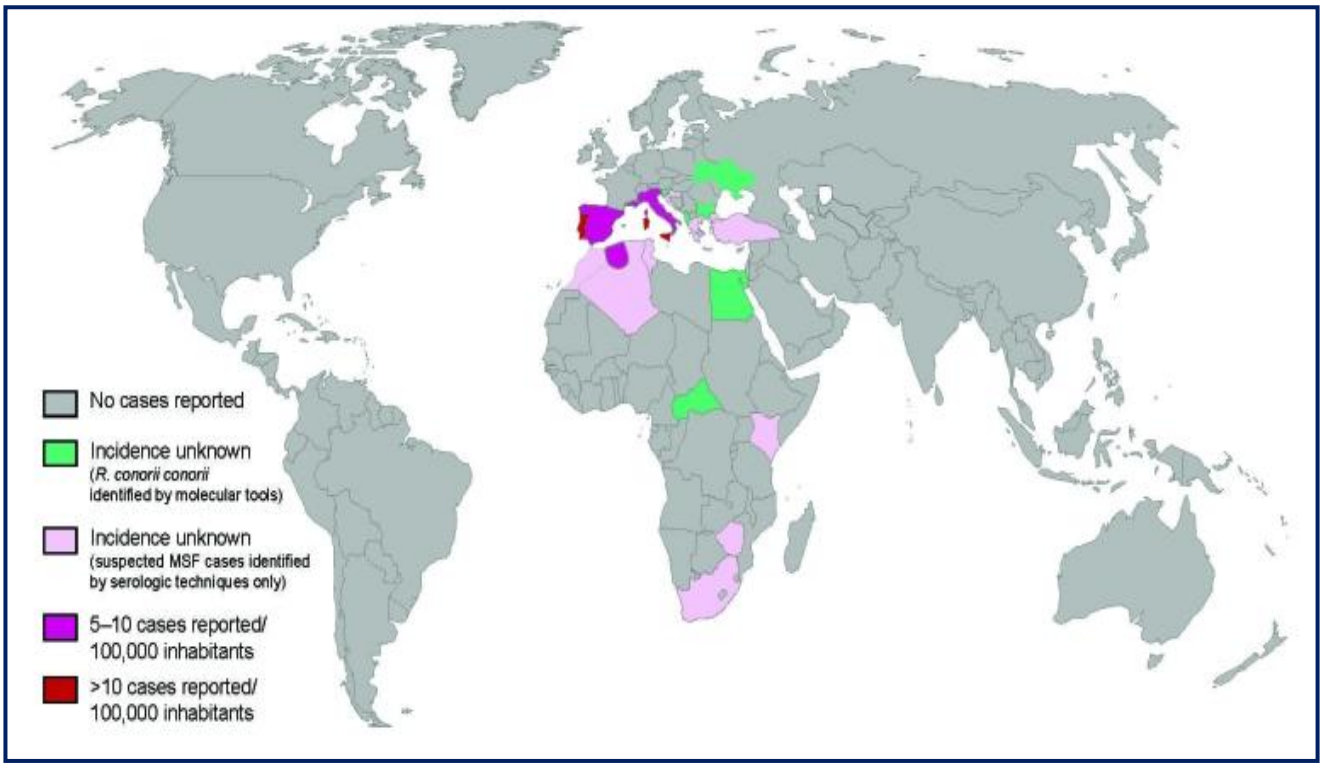
<u>ANNEXE 01</u> : Caractéristiques épidémiologiques des rickettsioses (Davoust et *al*., 2010)

	Espèce	Maladie	Répartition géographique	Vecteurs	Transmission transovarienne chez le vecteur (%)	Animaux vertébrés potentiellement réservoirs
Génogroupe Typhus	***R. typhi***	Typhus murin	Ubiquitaire	Puce *(Xenopsylla cheopis)*	Oui	*Rattus rattus, R. norvegicus,* Souris, Opossum, Musaraigne, **Chat**
	R. prowazekii	Typhus épidémique	Afrique (Éthiopie, Burundi) Amérique centrale Amérique du Sud États-Unis, Asie	Poux *(Pediculus humanus corporis* *P.h. humanus)*	Non	Écureuil volant (Glaucomys volans) États-Unis
Géno-groupe Boutonneux	***R.conorii conorii***	Fièvre boutonneuse méditerranéenne	Sud de l'Europe Afrique**,** Moyen Orient	*Rhipicephalus sanguineus*	100	**Chien?** Rongeurs ? Lagomorphes ?
	R. conorii indica	Typhus indien à tique	Inde	*R. sanguineus*		
	R.conorii israelensis	Fièvre boutonneuse d'Israël	Israël	*R. sanguineus*	Oui	
	R. conorii caspia	Fièvre boutonneuse d'Astrakan	Astrakan Tchad	*R. sanguineus* *R. pumilio*	Oui	**Chien?** Hérisson
	R. rickettsii	Fièvre pourprée des montagnes rocheuses	États-Unis Amérique du Sud	*Dermacentor andersoni* *D. variabilis* *R. sanguineus* *Amblyomma cajennense* *A. aureolatum*	D.a. 100 D.v. 30-40	**Chien?**, Lapin, Campagnol, Rats, Écureuil, Opossum, Capybara
	R.sibirica sibirica	Typhus à tiques de Sibérie	Russie Chine	*Dermacentor nuttalli* *D. marginatus* *D. silvarum* *Haemaphysalis concinna*	D.n. 100	Rongeurs *(Microtus arvalis* *Lagurus lagurus)*
	R. sibirica mongolitimonae	LAR *(Lymphangitisassociated rickettsiosis)*	Asie, France, Afrique	*Hyalomma asiaticum* *H. truncatum*	Oui	Oiseaux migrateurs ?

	R. australis	Fièvre du Queensland	Australie	*Ixodes holocyclus* *I. tasmani*	Oui	Rongeurs *(Rattus fuscipes)* Australie
	R. japonica	Fièvre boutonneuse japonnaise	Japon	*Ixodes ovatus* *Dermacentor taiwanensis* *H. longicornis* *H. flava*	Oui	Cerf Sika *(Cervus nippon)* Japon; Rongeurs *(Bandicota indica)* Thaïlande
	R. africae	Fièvre à tiques africaine	Afrique, Antilles	*A. hebraeum* *A. variegatum*	A.h. 100	
	R. honei	Fièvre boutonneuse de l'Ile Flinders	Australie (Ile Flinders) Thaïlande États-Unis (Texas)	*Aponomma hydrosauri* *A. cajennense* *Ixodes granulatus*	Oui	
	R. slovaca	TIBOLA *(Tick-borne lymphadenopathy)*	Europe Afrique du Nord	*Dermacentor marginatus* *D. reticulatus*	D.m. 100	
	R. heilongijangensis		Est de l'Asie	*D. silvarum*		
	R. aeschlimannii	Fièvre boutonneuse	Maroc Afrique du Sud Corse, Espagne	*Hyalomma marginatum marginatum* *H. marginatum rufipes* *Rhipicephalus appendiculatus*	H.m.m. Oui	
	R. parkeri	Fièvre boutonneuse	États-Unis Amérique du Sud	*A. maculatum* *A. americanum* *A. triste*		

	R. massiliae	Fièvre boutonneuse	Europe du Sud Afrique	*Rhipicephalus sanguineus* *R. turanicus* *R. muhsamae*	R.t. 100	
	R. helvetica	Fièvre non éruptive	Thaïlande, Japon France, Espagne, Italie Europe de l'Est	*Ixodes ricinus* *I. ovatus* *I. persulcatus* *I. monospinus*	I.r. 100	Cervidés *(Cervus nippon yesaensis)*
	R. raoultii	SENLAT *(Scalp eschar and neck lymphadenopathy)*	Europe	*Dermacentor reticulatus* *D. marginatus*	D.m. 86-100	Chien?
	R. monacensis	Fièvre boutonneuse	Europe, États-Unis, Maroc, Algérie, Tunisie	*Ixodes ricinus,* *I. scapularis*		
	R. honei "marmionii"	Fièvre boutonneuse d'Australie	Australie	*H. novaguineae* *Ixodes holocyclus*		
	R. akari	Rickettsiose vésiculeuse	États-Unis Croatie, Slovénie, Ukraine Afrique du Sud, Turquie	*Liponyssoides sanguineus* (acarien)	> 60	Écureuil coréen *(Microtus fortis pelliceus)*
Autres rickettsies	***R. felis***	Fièvre boutonneuse à puces	Ubiquitaire	*Ctenocephalides felis, C. canis* *Pulex irritans,* *Archeopsylla erinacei* *Xenopsylla cheopis*	2,5 - 63	**Chat, Chien** Rongeurs, Hérisson Opossum

<u>ANNEXE 02</u> : Répartition des cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne (FBM) dans le monde et l'incidence de la maladie dans les pays où la FBM est endémique (Rovery et *al*., 2008)



<u>ANNEXE 03</u> : Situation épidémiologique annuelle de la Fièvre boutonneuse méditerranéenne en Algérie depuis 1998 (Ministère de la santé et INSP, 2011)

Année	Nombre total de cas déclarés
1998	426
1999	488
2000	238
2001	181
2002	309
2004	265
2005	328
2006	457
2007	393
2008	310
2009	359
2010	280

<u>ANNEXE 04</u> : Espèces et sous espèces de *Bartonella* qui sont confirmées ou considérées comme agents pathogènes potentiels pour l'homme, réservoirs principales, vecteurs et hôtes accidentels connus (Chomel et Kasten, 2010)

Espèces de Bartonella	**Réservoir principal**	**Vecteur**	**Hôtes accidentels**
Bartonella alsatica	Lapin (*Oryctolagus cuniculus*)	Puce de lapin? (*Spilopsyllus cuniculi*)	Homme
Bartonella bacilliformis	Homme	phlébotome (*Lutzomia verrucarum*)	?
Bartonella clarridgeiae	**Chat** (*Felis catus*)	Puce de Chat (*Ctenocephalides felis*)	Homme, **Chien**
Bartonella elizabethae	Rat (*Rattus norvegicus*)	Puce Oriental du rat (*Xenopsylla cheopis*)	Homme, **Chien**
Bartonella grahamii	Souris sauvages (*Clethrionomys glareolus, Microtus agrestris, Apodemus flavicollis*)	Puces de rongeurs	Homme
Bartonella henselae	**Chat** (*Felis catus*)	Puce de Chat (*Ctenocephalides felis*)	Homme, Chien, Cheval, Animaux marins
Bartonella koehlerae	**Chat**	Puce de Chat	Homme, **Chien**
Bartonella melophagi	Moutons (*Ovis aries*)	pou du mouton (*Melophagus ovinus*)	Homme
Bartonella quintana	Homme	pou de corps (*Pediculus humanis*)	**Chat, Chien**
Bartonella rochalimae	**Les canidés**	puces? (*Pulex irritans, Pulex simulans*)	Homme, **Chien**
Bartonella tamiae	Inconnu (Rat?)	acariens? tiques?	Homme
Bartonella vinsonii arupensis	Souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*)	Inconnu (puces? tiques?)	Homme
Bartonella vinsonii berkhoffii	Coyote (*Canis latrans*) **Chien** (*Canis familiaris*)	Inconnu (Tiques?)	Homme, **Chat**
Bartonella washoensis	Écureuil terrestre de Californie (*Spermophilus beecheyii*)	puces (*Oropsylla ontana*)	Homme, **Chien**

<u>ANNEXE 05</u> : Aspects cliniques des infections à *Bartonella* chez l'Homme et le Chien (Boulouis et *al*., 2008)

Symptômes	Homme	Chien
Bactériémie chronique	*Bq, Bh*	*Bvb*
Fièvre prolongée	*Bq, Bh*	*Bvb*
Léthargie, perte de poids, anorexie	*nd*	*Bvb*
Lymphadénite, Rhinite granulomateuses	*Bh*	*Bvb*
Angiomatose bacillaire et péliose hépatique	*Bq, Bh, Bb*	*Bh*
Endo/Myocardite, Arythmie	*Bq, Bh, Be, Bva, Bw, Bk, Ba*	*Bvb, Bw, Bc, Bq*
Symptômes neurologiques	*Bh, Bva*	*Bvb*
Encéphalite	*Bh*	*nd*
Arthrite, douleurs articulaires	*Bh*	*Bh*
Uvéite et lésions oculaires	*Bg, Bh*	*Bh*
Glomérulonéphrite	*Bh*	*nd*

***Ba**: B. alsatica ; **Bb**: B. bovis ; **Bc** : B. clarridgeiae ; **Be**: B. elizabethae ; **Bg**: B. grahamii ; **Bh**: B. henselae ; **Bk**: B. koelherae ; **Bq**: B. quintana ; **Bva** : B. vinsonii arupensis ; **Bvb** : B. vinsonii berkhoffii ; **Bw**: B. washoensis. **nd**:* non décrit.

ANNEXE 06: Fiche de renseignements

Fiche de renseignements

Prélèvement N°:

Date du prélèvement : ……/……. /……..

Localité du prélèvement : Fourrière canine, EL HARRACH

- **Espèce:** Canine / féline
- **Race:** ……...
- **Age:** ……
- **Sexe:** ……...
- **Origine:** Indéterminée

État de l'animal avant l'abattage :

État général :……..……

Température :……..……...

Muqueuses :..……..……

Examen dermatologique (Téguments) :…….……...

Présence d'ectoparasites : OUI □ NON □

Si OUI, Quels ectoparasites : Tiques □ Puces □

ANNEXE 07: MATÉRIEL NON BIOLOGIQUE

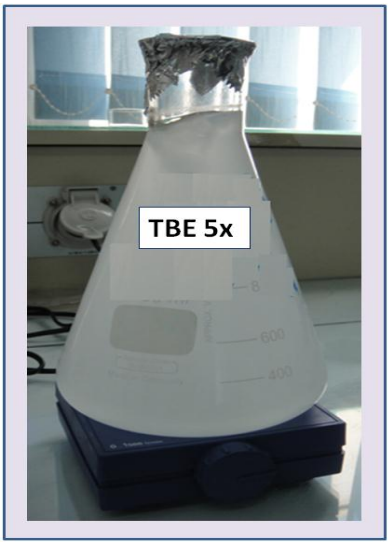
Matériels de mission sur le terrain	Matériels de protection : lunettes de protection, masque FFP2, charlotte, gans, blouse ou combinaison, bottes. Matériels de prélèvements d'organes : instruments de rasage, champs propres, alcool chirurgical, coton, pinces, sonde cannelée, ciseaux, écarteurs, scalpel et lames de bistouri stériles, tubes à vis stériles étiquetés, glacière.
Matériels de laboratoire	Hôtes à flux laminaire, Bain à sec avec thermomètre, Vortex, Ultracentrifugeuse (14000 tours/ minute), Balance de précision, Four à micro-onde, Thérmocycleur, Cuve à migration, Cuve à Électrophorèse (horizontal) avec bloc d'alimentation électrique, Transilluminateur à UV, Micropipettes avec leurs embouts, Tubes Eppendorf et les barrettes PCR, Tubes collecteurs à filtre, Boittes de pétri, Pince et bistouri, Broyeurs, Parafilm, Les portoirs, Erlenmeyer, Autoclave, Agitateur magnétique.
Les réactifs et produits chimiques	Éthanol absolu, Alcool. Réactifs d'extraction : eau distillée stérile (ph 7), ATL, protéinase K, AL, éthanol, AW1, AW2, AE. Réactifs de PCR : Buffer, dNTP, MgCl2, eau distillé stérile, Taq polymérase (Hot star taq), Primers (amorces). Réactifs d'électrophorèse : Agarose, BET, TBE. Tampon de charge (Bleu de Bromo phénol ou Blue Juice). Marqueur de PM (DNA Markers).

Matériels de laboratoire (Originale, 2011).

<u>ANNEXE 08</u> : Formule du tampon de migration (Électrophorèse)

Préparation du tampon d'électrophorèse **TBE 5x** (Tris Borate EDTA), pour 1 litre :

Eau déminéralisée	800 ml
EDTA	20 ml (pH 8,0)
Acide Borique	27,5 g
Tris-HCl	54 g



Pour préparer 1000 ml de tampon TBE 5X électrophorèse :

- Peser 54 g de Tris base et 27,5 g d'acide borique dans un bécher. Les dissoudre dans 800 ml d'eau distillée puis mélanger très bien la solution à l'aide d'un agitateur magnétique
- Ajouter 20 ml d'EDTA (**pH 8,0**).
- Ajustez le volume final de 1000 ml avec de l'eau distillée. Mélangez bien.

Il n'est pas nécessaire de stériliser la solution, le TBE peut être stocké à température ambiante pendant plusieurs mois.

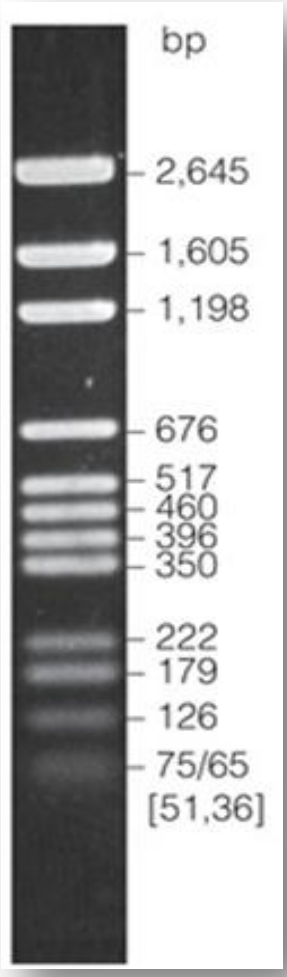
Pour électrophorèse sur gel, le TBE 5x doit être dilué avant son utilisation à :

0.5 x TBE: 100 ml 5x TBE + 900 ml d'eau distillée.

1 x TBE: 200 ml 5x TBE + 800 ml d'eau distillée.

Après plusieurs électrophorèses, la capacité du tampon (TBE) est épuisée, le pH dans la partie anodique de la cuve d'électrophorèse est modifié et la mobilité d'ADN peut se réduire. Au minimum, remplacer le TBE, après plusieurs passages.

<u>ANNEXE 09</u> : La taille des fragments du marqueur de poids moléculaire (source Internet n° 6 : http://www.promega.com/en-gb/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight-markers/benchtop-dna-markers/ **)**



ANNEXE 10: Tableau comparatif entre la PCR standards et la PCR en temps réel (source Internet n° 7 : http://www.ilm.pf/PCRtempsreel **)**

	PCR classique	**PCR en temps réel**
Principe	Amplification cyclique d'un fragment d'ADN basée sur une réaction enzymatique	
Détection	Finale	A chaque élongation
Spécificité	Amorces Taille des amplicons	Amorces Sondes
Rapidité	1 H à 2 H sans la révélation	1H 30 à 2 H
Reproductibilité	Bonne	excellente
Quantification	Non	Oui
Avantages		Sensibilité élevée Grande spécificité Rapide
Inconvénients	Risque élevé de contaminations	
Applications	Détection de produits amplifiés	Détection et quantification d'agent pathogènes

<u>ANNEXE 11</u> : Tableau récapitulatif des résultats obtenus par les deux méthodes moléculaires réalisées dans la présente étude

Résultats obtenus par la PCR standard		**Résultats obtenus par la PCR real time**	
N° des animaux positifs à *Rickettsia spp.*	**N° des animaux positifs à *Bartonella spp.***	**N° des animaux positifs à *Rickettsia spp.***	**N° des animaux positifs à *Bartonella spp.***
Chien N°47	Chat N°11	Chien N°15	Chat N°5
	Chat N°17	Chien N°18	Chat N°10
		Chien N°35	Chat N°11
		Chien N°36	Chat N°17
		Chien N°47	Chat N°33
		Chat N°18	Chien N°11
		Chat N°36	Chien N°15
			Chien N°33

<u>ANNEXE 12</u> : Renseignements concernant les chiens prélevés dans fourrière canine (Cas positifs : N° 11 – 15 – 18 – 33 – 35 – 36 – 47)

Date de prélèvement	N° des chiens	Sexe	Race	Age	État général de l'animal	Température	Muqueuses	Téguments	Présence Tique/Puce	Rate/extraction-PCR
23/12/2010	N°1	M	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Normal	absence	**oui**
23/12/2010	N°2	M	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Normal	absence	**oui**
23/12/2010	N°3	M	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Normal	absence	**oui**
23/12/2010	N°4	M	race commune	jeune	Bon	-	Pale	Terne	absence	**-**
30/12/2010	N°5	M	race commune	adulte	Mauvais	N	Pale	Terne	absence	**oui**
30/12/2010	N°6	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
30/12/2010	N°7	F	Berger allemand	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
30/12/2010	N°8	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Terne	puces +	**-**
30/12/2010	N°9	F	Berger croisé	jeune	Bon	N	Rose	Normal	absence	**-**
01/06/2011	N°10	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
01/06/2011	N°11	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
01/06/2011	N°12	M	race commune	adulte	Bon	N	Pale	Normal	absence	**-**
01/06/2011	N°13	M	race commune	jeune	Mauvais	N	Pale	Terne	absence	**-**
20/01/2011	N°14	F	race commune	adulte	Mauvais	N	Pale	Normal	puces +	**oui**
20/01/2011	N°15	M	race commune	adulte	Mauvais	39,2°	Pale	Croûtes	tiques + et puces+++	**oui**
20/01/2011	N°16	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
20/01/2011	N°17	M	race commune	adulte	Mauvais	N	Pale	Terne	absence	**oui**
20/01/2011	N°18	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
20/01/2011	N°19	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Terne	absence	**oui**
20/01/2011	N°20	F	race commune	jeune	Mauvais	40,1°	Pale	Terne	absence	**-**
27/01/2011	N°21	F	race commune	adulte	Mauvais	N	Rose	Terne	absence	**oui**
27/01/2011	N°22	M	Berger croisé	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
27/01/2011	N°23	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
27/01/2011	N°24	M	race commune	adulte	Bon	N	Pale	Normal	absence	**oui**
27/01/2011	N°25	M	race commune	jeune	Bon	N	Rose	Normal	absence	**-**
27/01/2011	N°26	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**-**
02/10/2011	N°27	M	Berger croisé	jeune	Mauvais	-	Pale	Terne	absence	**oui**

02/10/2011	N°28	M	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Normal	absence	**oui**
02/10/2011	N°29	M	race commune	adulte	Mauvais	-	Pale	Normal	absence	**oui**
02/10/2011	N°30	F	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Normal	absence	**oui**
02/10/2011	N°31	M	race commune	adulte	Bon	-	Rose	Normal	absence	**oui**
02/10/2011	N°32	F	race commune	adulte	Mauvais	-	Pale	Terne	absence	**-**
17/02/2011	N°33	M	race commune	jeune	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
17/02/2011	N°34	M	race commune	jeune	Mauvais	39,5°	Pale	Terne	absence	**oui**
17/02/2011	N°35	F	race commune	jeune	Bon	N	Rose	Terne	absence	**oui**
17/02/2011	N°36	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
17/02/2011	N°37	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
17/02/2011	N°38	F	race commune	adulte	Mauvais	N	Pale	Terne	absence	**oui**
17/02/2011	N°39	F	race commune	adulte	Bon	N	Pale	Normal	absence	**-**
17/02/2011	N°40	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**-**
24/02/2011	N°41	F	Berger croisé	jeune	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
24/02/2011	N°42	M	Berger croisé	jeune	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
24/02/2011	N°43	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Terne	absence	**-**
24/02/2011	N°44	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Terne	absence	**-**
24/02/2011	N°45	M	race commune	adulte	Bon	39,2°	Rose	Normal	absence	**-**
24/02/2011	N°46	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Terne	absence	**oui**
03/03/2011	N°47	F	race commune	adulte	Mauvais	39,8°	Pale	Croûtes et dépilation	tiques++ et puces+	**oui**
03/03/2011	N°48	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**oui**
03/03/2011	N°49	F	race commune	adulte	Bon	N	Pale	Terne	puces ++	**oui**
03/03/2011	N°50	F	race commune	jeune	Bon	N	Rose	Terne	absence	**-**
03/03/2011	N°51	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**-**
03/10/2011	N°52	F	race commune	jeune	Bon	N	Rose	Normal	absence	**-**
03/10/2011	N°53	M	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	tiques +	**-**
03/10/2011	N°54	F	race commune	adulte	Mauvais	39,5°	Pale	Terne	absence	**-**
03/10/2011	N°55	F	race commune	adulte	Bon	N	Rose	Normal	absence	**-**

NB : Les localités d'origines des chiens sont indéterminées

Adulte : plus d'un an. Jeune : moins d'un an.

<u>ANNEXE 13</u>: Renseignements concernant les chats prélevés dans fourrière canine (Cas positifs : N° 5 – 10 – 11 – 17 – 18 – 33 – 36)

Date de prélèvement	N° des chats	Sexe	Race	Age	État général de l'animal	Muqueuses	Téguments	Présence Tique/Puce	Rate/extraction-PCR
23/12/2010	N°1	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
23/12/2010	N°2	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Terne	absence	**oui**
23/12/2010	N°3	M	race croisée	jeune	Bon	Rose	Normal	absence	**-**
23/12/2010	N°4	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**-**
30/12/2010	N°5	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
30/12/2010	N°6	M	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Terne	absence	**oui**
30/12/2010	N°7	F	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Normal	absence	**oui**
30/12/2010	N°8	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**-**
30/12/2010	N°9	M	race croisée	jeune	Mauvais	Pale	Terne	absence	**-**
01/06/2011	N°10	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
01/06/2011	N°11	F	race croisée	jeune	Bon	Pale	Normal	puces +	**oui**
01/06/2011	N°12	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Terne	puces +	**oui**
01/06/2011	N°13	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
01/06/2011	N°14	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**-**
01/06/2011	N°15	F	race européenne	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**-**
20/01/2011	N°16	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
20/01/2011	N°17	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
20/01/2011	N°18	M	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Terne	absence	**oui**
27/01/2011	N°19	M	race croisée	jeune	Bon	Pale	Normal	absence	
27/01/2011	N°20	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
27/01/2011	N°21	M	race croisée	adulte	Bon	Pale	Normal	absence	**oui**
27/01/2011	N°22	F	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Normal	absence	**-**
27/01/2011	N°23	M	race croisée	adulte	Bon	Pale	Normal	absence	**-**
02/10/2011	N°24	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
02/10/2011	N°25	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Terne	absence	**oui**
02/10/2011	N°26	F	race croisée	jeune	Bon	Rose	Terne	absence	**oui**
02/10/2011	N°27	M	race européenne	jeune	Bon	Rose	Normal	absence	**-**

02/10/2011	N°28	M	race européenne	jeune	Bon	Rose	Terne	puces +	-
17/02/2011	N°29	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
17/02/2011	N°30	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
17/02/2011	N°31	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	-
24/02/2011	N°32	F	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Terne	absence	**oui**
24/02/2011	N°33	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
24/02/2011	N°34	M	race croisée	adulte	Bon	Pale	Terne	puces +	**oui**
24/02/2011	N°35	M	race croisée	jeune	Mauvais	Pale	Terne	absence	**oui**
24/02/2011	N°36	F	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
24/02/2011	N°37	F	race croisée	jeune	Bon	Rose	Normal	absence	**oui**
03/03/2011	N°38	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	-
03/03/2011	N°39	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Terne	absence	-
03/03/2011	N°40	F	race croisée	adulte	Bon	Pale	Normal	absence	-
03/03/2011	N°41	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	-
03/10/2011	N°42	M	race croisée	adulte	Bon	Rose	Normal	absence	-
03/10/2011	N°43	M	race croisée	adulte	Mauvais	Pale	Normal	puces +	-
03/10/2011	N°44	M	race croisée	jeune	Mauvais	Pale	Terne	absence	-
03/10/2011	N°45	F	race croisée	jeune	Mauvais	Pale	Terne	puces ++	-

NB : Les localités d'origines des chats sont indéterminées.
Adulte : plus d'un an. Jeune : moins d'un an.

RESUME

Les rickettsioses et les bartonelloses sont des maladies vectorielles, zoonotiques, qui prennent de plus en plus d'ampleur, surtout en santé publique. Leur réémergence dans notre pays est éventuellement due à l'apparition de nouveaux réservoirs animaux, abritant les agents pathogènes.

Ce travail contribue à l'étude des réservoirs de *Rickettsia spp*. et de *Bartonella spp*. dans la wilaya d'Alger. Pour cela, des rates ont été prélevées à partir de chiens et de chats de la fourrière canine d'El-Harrach puis analysées par la méthode d'amplification génique (PCR).

La PCR standard révèle que 2,86 % (1/35) des chiens sont infectés par *Rickettsia sp.* et 8 % (2/25) des chats sont positifs à *Bartonella sp*. La deuxième analyse moléculaire par la PCR en temps réel montre que les taux d'infection chez les chiens sont de 14.28% (5/35) pour *Rickettsia sp.* et 8.57 % (3/35) pour *Bartonella sp*., tandis que les taux de positivité chez les chats sont de 20 % (5/25) et de 8 % (2/25) pour *Bartonella sp*. et *Rickettsia sp.* respectivement.

Du point de vue épidémiologique, nos résultats suggèrent que les chiens et les chats peuvent être considérés comme hôtes sentinelles ou plutôt réservoirs de ces agents pathogènes, et jouent certainement un rôle dans la persistance de ces infections dans la nature.

Mots clés: *Rickettsia sp.*, *Bartonella sp.*, PCR en temps réel, chien, chat, rates, réservoir,Alger.

ABSTRACT

Rickettsiosis and bartonellosis are zoonotic and vector-borne diseases, which are increasingly taking a major scale, especially in public health.Their re-emergence in our country is possibly due to the appearance of new animal reservoirs, harboring pathogens.

This work contributes to the study of reservoirs of *Rickettsia spp*. and *Bartonella spp*. in the wilaya of Algiers. For that, the spleens were collected from stray dogs and cats in pound of El-Harrach and then analyzed using Polymerase Chain Reaction (PCR).

The standard PCR reveals that 2.86% (1/35) of dogs are infected with *Rickettsia sp.* and 8% (2/25) of cats are positives for *Bartonella sp.*The second molecular analysis by real-time PCR shows that infection rates in dogs are 14.28% (5/35) for *Rickettsia sp.* and 8.57% (3/35) for *Bartonella sp*., while the positivity rates in cats are 20% (5/25) and 8% (2/25) for *Bartonella sp.* and *Rickettsia sp.* respectively.

From the epidemiologic perspective, our results suggest that dogs and cats can be considered as sentinel hosts or rather reservoirs of these pathogens and certainly have a role in the persistence of these infections in nature.

Keywords: *Rickettsia sp*. *Bartonella sp*., real-time PCR, dog, cat, spleen, reservoir, Algiers.

ملخص

الريكتسيوز و البارتونلوز هي أمراض حيوانية المنشأ تنتقل عن طريق الحشرات والتي أصبحت تسبّب مشكلة هامة خاصة في مجال صحة الإنسان.

عودة ظهورها في بلادنا يدل ربّما على تواجد خزّانات حيوانية جديدة، والتي يمكنها إيواء مسببات هذه الأمراض.

هذا العمل يساهم في دراسة خزّان ريكتسيا و بارتونلا في ولاية الجزائر العاصمة ، لهذا الغرض قمنا بإستئصال الطحال من مجموعة من الكلاب والقطط الضّالة في محشرة الحيوانات بالحرّاش ومن ثم تحليل هذه العينات عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل.

النتائج التي تمّ الحصول عليها بواسطة التفاعل البوليميرازالكلاسيكي تشير أن 2.86٪ (35/1) من الكلاب مصابة بريكتسيا و 8٪ (25/2) من القطط مصابة ببارتونلا.

التحليل الجزيئي الثاني بواسطة التفاعل البوليميراز في الوقت الحقيقي يبين أن معدلات الإصابة لدى الكلاب هي 14.28٪ (35/5) و8.57 ٪ (35/3) بالنّسبة إلى ريكتسيا و بارتونلا على التّوالي.

في حين أن معدل الإيجابية عند القطط هو 20٪ (25/5) و 8٪ (25/2) بالنّسبة إلى ريكتسيا و بارتونلا على التوالي.

نتائجنا تشير إلى أنه يمكن اعتبار الكلاب والقطط دليلا أو بالأحرى خزانا لهذه الجراثيم و أنّها بالتأكيد تلعب دورا في بقاء هذه الأمراض في الطبيعة.

الكلمات الأسّاسية : ريكتسيا، بارتونلا، تفاعل البوليميرازالمتسلسل ،الكلاب ،القطط ،الطحال، الخزان ، الجزائر.