République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement
Supérieur et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Magister

Option : IMMUNOLOGIE ANIMMALE

ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DES MALADIES VECTORIELLES CHEZ LES CANIDES DOMESTIQUES ET SAUVAGES

Réalisé par : M. BOUCHAOUR Sidali Abdelwahab

Devant le jury composé de :

Pr. KHELEF D. Professeur, ENSV Alger	Président
Pr. BOUKHORS K.T. Professeur, ENSV Alger	Examinateur
Pr. AIT OUDHIA K. Professeur, ENSV Alger	Examinateur
Pr. MENOUERI N. Professeur, ISV Blida	Examinateur
Dr. AZZAG N. Maitre de Conférences A, ENSV Alger	Directeur de thèse
Dr. GHALMI F. Professeur, ENSV Alger	Co-Directeur de thèse

Année Universitaire : 2015 /2016

Dédicaces

« La chance aide parfois, le travail toujours. »

A tous les vetos passionnés dans le monde,

A tous ceux qui font des animaux, une passion,

A tous ceux que j'oublierai surement,

A tous ceux qui ont contribué de prés ou de loin a l'élaboration de ce travail.

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

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

A ma sœur de substitution, pour avoir été présente tout au long de ce difficile parcours et qui a su supporter et endurer tous mes états d'âmes et sauts d'humeurs et ma joie, parfois. Pour mon plus grand bonheur, nos destins semblent liés à jamais. Tu as marqué ma vie, que Dieu te garde.

A mes amis, pour toutes ces années mémorables passées ensemble, pour tout les souvenirs que l'on s'est forgés, et tout ceux qu'il nous reste à vivre ! Pour votre énorme soutien dans tous les domaines, merci, je vous adore.

Sidali A. Bouchaour

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et remerciements :

A mon encadrant et co-encadrant,

Docteur **AZZAG Naouelle,** Maitre de conférences en Microbiologie et Immunologie a l'ENSV. Vous m'avez proposé une thématique immensément innovante et donné l'opportunité de travailler sur un travail original, vous m'avez encadré et guidé avec beaucoup d'énergie, attention et disponibilité, que vous soit témoigné ici notre profond respect et ma sincère reconnaissance.

Professeur **Ghalmi Farida**, pour votre aide scientifique et pédagogique tous au long de mon cursus en post-graduation ainsi que durant mon année de recherche ont été précieuses votre compréhension. Que ce modeste travail témoigne de mon profond respect et sincère reconnaissance.

Au président du jury et aux membres du jury,

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter l'évaluation et la critique de ce travail.

Qu'ils trouvent ici, ma reconnaissance pour cette participation.

Aux organismes sollicités pour l'élaboration de ce travail,

La Wilaya d'Alger (Jardin d'essai),

Le centre cynégétique de Zeralda,

La fourrière canine d'El Harrach,

J'ai pu travailler tout au long de ce magistère dans un climat convivial que vous avez su installé, mes remerciements pour toute votre continuelle aide au cours de ces mois.

RESUME

Les arthropodes hématophages sont impliqués dans la transmission de nombreuses bactéries dont les principales appartiennent aux genres *Anaplasma*, *Borrelia* et *Ehrlichia*. La plupart des maladies induites sont potentiellement émergente en Algérie. Or, la première étape pour évaluer le risque de contracter ses maladies vectorielles est de connaitre les méthodes de diagnostic de l'infection ainsi que la prévalence de l'agent en cause chez l'hôte réservoir et son vecteur.

L'objectif de cette étude est, d'une part, d'étudier la séroprévalence, par immunofluorescence indirecte, à *Anaplasma phagocytophilum* et à *Borrelia burgdorferi* dans une population de chiens de fourrière et de comparer les résultats obtenus avec les test KITVIA et d'autre part d'évaluer la prévalence de ces mêmes pathogènes vis-à-vis d'une population de canidés sauvages. Un autre objectif a été celui de rechercher les anticorps antinucléaires chez tous les chiens de fourrière préalablement testé par IFI.

Parmi les 84 chiens étudiés, 42.85% se sont montrés positifs en IFI à *Anaplasma phagocytophilum*, 53.33% à *Borrelia burgdorferi*, 46.42% à *Ehrlichia canis*. Chez les canidés sauvages 41.67% se sont révélés positifs à *Anaplasma phagocytophilum* et 25% à *Ehrlichia canis* et séronégatifs vis-à-vis de *Borrelia burgdorferi sensu lato*. L'analyse ave le test kit via de seize chiens (19 %) de l'échantillon total (n=84) ont révélé que 93.7% etaient séropositifs pour *Anaplasma phagocytophilum*, 50% à *Ehrlichia canis* et 0 individu (0%, n=16) pour *Borrelia burgdorferi*. L'infection d'un chien par *Anaplasma phagocytophilum* et/ou par *Borrelia burgdorferi sensu lat*o et/ou Ehrlichia *canis* est un facteur favorisant l'apparition d'une maladie autoimmune.

Mots clés : *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorefri sensu lato*, *Ehrlichia canis*, IFI, KIT VIA, Chiens.

Abstract

Hematophagous arthropods are involved in the transmission of many bacteria, the main ones belonging to the genus Anaplasma, Borrelia and Ehrlichia. Most of the induced diseases are potentially emerging in Algeria. The first step in assessing the risk of contracting its vector-borne diseases is to know the methods of diagnosing the infection and the prevalence of the agent involved in the reservoir host and its vector.

The objective of this study is to identify the seroprevalence by indirect immunofluorescence of Anaplasma phagocytophilum and *Borrelia burgdorferi* in stray dog population and to compare the results obtained with the KITVIA test, On the other hand, to assess the prevalence of these same pathogens in relation to a wild canine population. Another objective was to look for antinuclear antibodies in all stray dogs previously tested by IFI.

Of the 84 dogs studied, 42.85% were positive in IFI to Anaplasma phagocytophilum, 53.33% to *Borrelia burgdorferi,* and 46.42% to *Ehrlichia canis*. In wild canines, 41.67% were found to be positive for Anaplasma phagocytophilum and 25% for *Ehrlichia canis* and seronegative to *Borrelia burgdorferi sensu lato*. The analysis with the test kit via sixteen dogs (19%) of the total sample (n = 84) revealed that 93.7% were seropositive for *Anaplasma phagocytophilum*, 50% for Ehrlichia canis and 0 individual (0%, n = 16) for Borrelia burgdorferi. The infection of a dog by Anaplasma phagocytophilum and / or by *Borrelia burgdorferi sensu lato* and / or Ehrlichia canis are a factor involved in the emergence of an autoimmune disease.

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorefri sensu lato*, *Ehrlichia canis*, IFI, KIT VIA.

ملخص

أكثر الأمراض التي يسببها يحتمل الظهور في الجزائر. ولكن الخطوة الأولى لتقييم مخاطر الأمراض المنقولة لها هو معرفة طرق التشخيص العدوى وانتشار وكيل تشارك في الخزان المضيفة والنواقل.

*Anaplasma phagocytophilum*والهدف من هذه الدراسة هو، أولا، لدراسة الانتشار المصلي المناعي غير المباشر، اختبار وثانيا لتقييم مدى KITVIA وبوريليا برغدورفيرية في رطل من السكان الكلب ومقارنة النتائج المتحصل عليها مع البرية. كان هدف آخر واحد للبحث عن الأجسام المضادة للنواة في canides انتشار هذه الجراثيم وجها لوجه عدد سكانها. كل الكلاب التحفظ عليها اختبار ها من قبل المؤسسات المالية الدولية.

في المؤسسات المالية الدولية، *Phagocytophilum anaplasma* من 84 الكلاب درس، وكانت 42.85٪ إيجابي البرية كانت 41.67٪ إيجابي canids ، الإيرليخية الكلبية 46.42٪. في*burgdorferi* 53.33٪ لبوريليا بالمعنى *burgdorferi* إلى 25٪ الكلبية الإيرليخية والسلبية وجها لوجه بوريليا *phagocytophilum Anaplasma* عدة اختبار عبر ستة عشر كلاب (19٪) من مجموع العينة (ن = 84) كشفت أن 93.7٪ كانت AVE الواسع. تحليل إلى الإيرليخية الكلبية والفردية 0 (0٪، ن = 16) لبوريليا 50٪، *phagocytophilum Anaplasma*إيجابية لل بالمعنى الواسع و *burgdorferi* في كلب و / أو بوريليا *phagocytophilum Anaplasma* عدوى مع *burgdorferi*. / أو الإيرليخية الكلبية هو عامل لصالح مظهر من أحد أمراض المناعة الذاتية.

Sommaire

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 1

Étude de l'espèce *Ehrichia canis* 1

1) TAXONOMIE ET PHYLOGENIE 1

2) MORPHOLOGIE 4

3) EPIDEMIOLOGIE 4

A) Répartition géographique 5

b) Transmission d'*Ehrlichia canis* 7

c) Réservoirs et espèces sensibles 8

4) EXPRESSION CLINIQUE 9

A) Symptômes 9

b) Signes biologiques 11

5) PATHOGENIE 14

A) Cycle de développement 14

B) Pouvoir immunogène et antigénique 15

C) Réponse immunitaire 19

6) DIAGNOSTIC 21

a) Diagnostic clinique 21

b) Diagnostic cytologique et culture 21

c) Diagnostic biochimique 23

d) Diagnostic sérologique 23

e) Diagnostic moléculaire 26

7) TRAITEMENT 29

8) PREVENTION 30

Etude de l'espèce *Anaplasma phagocytophilum* 31

1) TAXONOMIE 31

2) MORPHOLOGIE 32

3) EPIDEMIOLOGIE 34

A) Répartition géographique 34

b) Réservoirs 34

c) Transmission D'*Anaplasma phagocytophilum* 34

d) Cycle biologique chez la tique 35

4) EXPRESSIONS CLINIQUES 38

a) Symptômes 38

b) Signes biologiques 39
5) PATHOGENIE ET REPONSE IMMUNITAIRE 41
6) DIAGNOSTIC 45
a) Clinique 46
b) Examen cytologique et culture 46
c) Bilan biochimique 48
d) Diagnostic sérologique 48
e) Diagnostic moléculaire (PCR) 51
7) TRAITEMENT 52
8) PROPHYLAXIE 49
Étude de l'espèce *Borrelia burgdorferi sensu lato* 55
1) TAXONOMIE 55
2) MORPHOLOGIE 55
3) EPIDEMIOLOGIE 56
a) Répartition géographique 57
b) Transmission de *Borrelia burgdorferi* 58
c) Réservoir et espèces sensibles 61
4) EXPRESSIONS CLINIQUES 61
5) PATHOGENIE 63
6) RÉPONSE IMMUNITAIRE 66
7) DIAGNOSTIC 72
a) Clinique 72
b) Isolement et culture 73
c) Diagnostic sérologique 73
d) Diagnostic moléculaire 75
8) TRAITEMENT 77
9) PROPHYLAXIE 78
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES 79
1) OBJECTIFS 79
2) DÉROULEMENT GÉNÉRAL 79
a) Population de canidés inclue dans l'étude 79
b) Recueil des données épidémiologiques 80
3) ANALYSE PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE 81
a) Principe 81

b) Protocole 81
c) Matériels et équipements 82
d) Manipulations 82
e) Lecture des résultats 85
4) ANALYSE DES ÉCHANTILLONS PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNOCHROMATOGRAPHIE (KITVIA) 86
a) Principe 86
b) Manipulations 86
c) Interprétation du test 87
5) RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI NUCLÉAIRES 88
a) Principe 88
b) Protocole 89
6) OUTILS STATISTIQUES 89
7) IDENTIFICATIONS DES ECTOPARASITES 89
CHAPITRE 3 : RESULTATS 91
1) DESCRIPTION DE LA POPULATION D'ÉTUDE 91
a) Canidés domestiques 91
b) Canidés sauvages 92
2) RÉSULTATS EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI) 93
a) Les canidés domestiques 93
b) Les canidés sauvages 122
3) RÉSULTATS DE L'ANALYSE SÉROLOGIQUE À L'AIDE DU TEST KIT VIA 113
4) COMPARAISON DES DEUX TECHNIQUES SÉROLOGIQUES IFI ET KIT VIA 113
5) RECHERCHE DES ANTICORPS ANTINUCLÉAIRES 115
CHAPITRE 4 : DISCUSSION 117

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Traitement requis lors d'Anaplasmose granulocytaire canine..... 53
Tableau 2 Barème de lectures des lames d'immunofluorescence. 85
Tableau 3 Description de la population des canidés domestiques..... 91
Tableau 4 Analyse statistique de la realtion satut sérologique d'*Anaplasma phagocytophilum* et des facteurs de risques. 99
Tableau 5 Analyse statistique de la realtion satut sérologique d'*Ehrlichia canis* et des facteurs de risques..... 103
Tableau 6 Analyse statistique de la realtion satut sérologique de *Borrelia burdorferi* et des facteurs de risques..... 108
Tableau 7 Séroprévalence des coïnfections par deux et trois agents en fonction..... 109
Tableau 8 Analyse statistique de la realtion satut sérologique de la coinfection *Anplasma phagocytophilum/ Ehrlichia canis* et des facteurs de risques..... 110
Tableau 9 Analyse statistique de la realtion satut sérologique de la coinfection *Anplasma phagocytophilum/ Borrelia burgdorferi* et des facteurs de risques. 111
Tableau 10 Analyse statistique de la realtion satut sérologique de la coinfection *Borrelia burgdorferi Ehrlichia canis* et des facteurs de risques..... 111
Tableau 11 Analyse statistique de la realtion satut sérologique de la coinfection *Anplasma phagocytophilum/ Ehrlichia canis /Borrelia burdorferi* et des facteurs de risques..... 112
Tableau 12 Descriptions de la population des canidés sauvages..... 113
Tableau 13 Comparaison entre l'IFI et l'immunochromatographie 114
Tableau 14 Association de la séroprévalence *Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi* et *Ehrlichia canis* avec la présence d'anticorps antinucléaires 115

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Phylogénie des genres *Ehrlichia, Anaplasma, Wolbachia, Neorickettsia, Orientia* et *Rickettsia* (sequence ARNr 16s) (Dumler et Walker, 2001). 2
Figure 2 Morula d'*Ehrlichia canis* dans un monocyte x100 (Sainz et al., 2015) 4
Figure 3 Pétéchies du à *Ehrlichia canis* 10
Figure 4 Echymoses cutanées chez un chien atteint d'ehrlichiose (Mylonakis et al., 2010). . 11
Figure 5 Ecchymose sclérale chez un chien manifestant l'ehrlichiose monocytaire canine (Mylonakis et al., 2010). 12
Figure 6 Cycle de multiplication d'*Ehrlichia canis (*veteriankey.com)..... 15
Figure 7 Pâleur et pétéchies de la muqueuse du pénis chez un chien myelossupressif (Mylonakis et al., 2010) 19
Figure 8 Frottis sanguin d'un chien infecté par *Ehrlichia canis* (Harrus et al., 2011)..... 23
Figure 9 *Ehrlichia canis* par IFI (Labruna et al., 2007) 26
Figure 10 Diagnostic de l'ehrlichiose monocytaire canine..... 29
Figure 11 Morphologie d'*A. phagocytophilum* à l'intérieur des granulocytes infectés. (Chimier, 2006) 33
Figure 12 Cycle de transmission d'*A. phagocytophilum* (Nicholson et al., 2010)..... 37
Figure 13 Epistaxis chez un chien atteint d'Anaplasmose granulocytaire canine (Little et al., 2010)..... 40

Figure 14 Cycle de multiplication d'*A. phagocytophilum* dans un neutrophile (Zhang, 2007). 44
Figure 15 Morulae d'*Anaplasma phagocytophilum* (Lester et al., 2005). 47
Figure 16 Les cinq spots permettant l'interprétation du SNAP® test 4Dx® (IDEXX Laboratoires, 2012). 50
Figure 17 Diagnostic de l'anaplasmose granulocytaire canine 52
Figure 18 Distribution géographique de la borréliose de Lyme et de son vecteur 56
Figure 19 Cycle de transmission de *Borrelia burgdorferi* (adaptée et modifiée de Little et al., 2010). 59
Figure 20 Arthrite chez un chien atteint de borreliose de lyme (Hammon, 2015) 62
Figure 21 Morphologie des spirochètes *Borrelia burgdorferi* (Singh et Hermann, 2004) 64
Figure 22 Régulation de l'expression des gènes de *Borrelia burgdorferi* chez ses différents hôtes (Singh et Hermann, 2004) 65
Figure 23 Reconnaissance innée de *Borrelia burgdorferi* 68
Figure 24 Conduite à tenir lors de suspicion de Borreliose 76
Figure 25 Prise de sang intracardiaque d'un chien à la fourrière canine El Harrach 80
Figure 26 Lame teflon. 83
Figure 27 Dépôts des sérums sur les puits 83
Figure 28 Lavage au PBS des lames IFI 83
Figure 29 Incubation à 37° pendant 30 minutes 84
Figure 30 Montage des lames IFI. 84
Figure 31 Microscope à immunofluorescence, Institut Pasteur, Alger. 85
Figure 32 KITVIA 4 pathogenes 85
Figure 33 Etapes de l'analyse avec le KITVIA PARASITES 88
Figure 34 Infestation auriculaire massive par des tiques 92
Figure 35 Tique conservée dans de l'éthanol 70% 92
Figure 36 Fennec-*Vulpes zerda* 93
Figure 37 Relation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* avec l'age 94
Figure 38 Relation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* avec le sexe 95
Figure 39 Relation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* avec la race 95
Figure 40 Relation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* avec la présence et l'absence de tique 97
Figure 41 Relation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* avec la saison 98
Figure 42 Relation de la séroprévalence d'*Ehrlichia canis* avec l'âge 99
Figure 43 Relation de la séroprévalence d'*Ehrlichia canis* avec le sexe 100
Figure 44 Relation de la séroprévalence d'*Ehrlichia canis* avec la race 101
Figure 45 Relation de la séroprévalence d'*Ehrlichia canis* avec la présence ou l'absence de tiques 102
Figure 46 Relation de la séroprévalence d'*Ehrlichia canis* avec la saison 102
Figure 47 Immunofluorescence à *Borrelia burgdorferi sensu lato* 103
Figure 48 Relation de la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* avec l'âge 104
Figure 49 Relation de la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* avec le sexe 104
Figure 50 Relation de la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* avec la race 105
Figure 51 Relation de la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* avec la présence ou l'absence de tiques 106
Figure 52 Relation de la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi sensu lato* avec la saison. 107

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Étude de l'espèce *Ehrichia canis*

1) TAXONOMIE ET PHYLOGENIE

Le genre *Ehrlichia* est composé de bactéries intracellulaires strictes, transmises par un vecteur à leur hôte mammifère. Elles appartiennent à l'ordre des *Rickettsiales*. En Europe, on retrouve chez le chien *Ehrlichia canis*. Ces bactéries infectent les leucocytes ou les plaquettes où elles forment des micro colonies typiques (morula) qui peuvent être observées au microscope optique dans les cellules infectées (Rikihisa, 1991).

L'ordre des *Rickettsiales* comprenait à l'origine toutes les bactéries intracellulaires strictes, mais les actuelles Chlamydies ont été secondairement séparées de cet ordre. Parmi ces *Rickettsiales*, on distingue donc à l'origine trois Familles : les *Rickettsiaceae*, les *Bartonellaceae* et les *Anaplasmataceae*, qui parasitent respectivement les phagocytes spécialisés, les phagocytes non spécialisés et les érythrocytes (Anderson et al. 1991 ; Chen et al., 1994).

Dans la grande famille des *Rickettsiaceae*, les différents genres et espèces ont d'abord été établies sur des critères phénotypiques : sérologique et sur le pouvoir pathogène chez l'homme et chez l'animal. Ces critères ont permis de définir trois familles *: Rickettiseae, Wolbachieae* et *Ehrlichieae,* cette dernière comprenant les genres *Ehrlichia, Cowdria* et *Neorickettsia*. Les bactéries de ces trois groupes se répliquent dans une vacuole parasitophore de la cellule hôte, alors que les éléments de la « Tribu » des *Rickettsieae* (sauf *Coxiella burnetii*) se répliquent librement dans le cytoplasme (Fehr et al. 2010 ; Von Loewenich 2010 ; Wilinder-olsson 2010).

Trois groupe du genre *Ehrlichia* ont été identifiés en se basant sur l'analyse de l'ARNr 16S, incluant les génogroupes *Ehrlichia canis (E. canis, E. chaffensis, E. muris, E. ewingii* et

cowdria ruminatium), Ehrlichia phgocytophila (E. equi, E. phagocytophilan Anaplasma platys) et Ehrlichia *seunetsu (E. seunetu, E. risticii* et probablement *Neorickettsia helminthoeca* (Dumler et al., 1995).

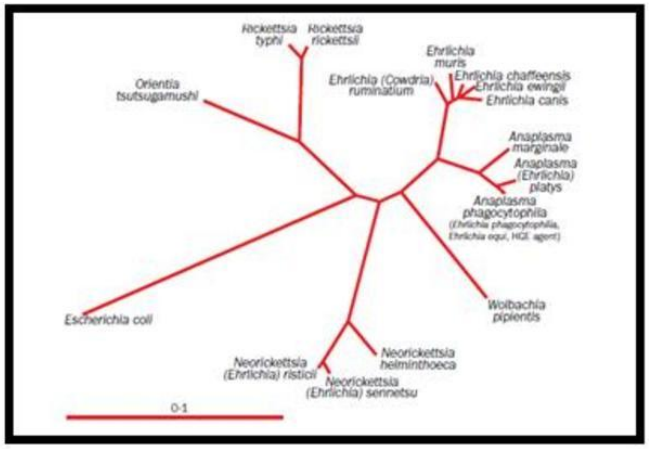

Figure 1 Phylogenie des genres *Ehrlichia, Anaplasma, Wolbachia, Neorickettsia, Orientia* et *Rickettsia* (sequence ARNr 16s) (Dumler et Walker, 2001).

Les séquences génomiques complètes ont été déterminées pour les trois espèces *E. chaffeensis, E. Canis* et *E. ruminatium* (Brayton et al. 2005 ; Collins et al., 2005 ; Duning Hotopp et al., 2006 ; Herndon et al., 2010).

Les espèces du genre *Ehrlichia* ont un chromosome circulaire. La taille de leur génome est de 1225,8 kb. Il est caractérisé par un ARNr opéron où le gène 16s est séparé par la paire 23s5s (Dunning Hotopp et al. 2006)

Par ailleurs, la comparaison des séquences d'*Ehrlichia* avec celles des autres bactéries de la famille des *Anaplasmatacae* a montré que la majorité des gènes, sont soit conservés dans tous les génomes ou unique dans des génomes particuliers. D'autre part, plus de 432 gènes très homologues et regroupés en cluster ont été décrits. Ces gènes ont été principalement associés aux gènes de ménage.

D'autres études portant sur la comparaison des *Alpha-proteobacteria*, ont permis de démontrer que la majeure partie des génomes des genres *Ehrlichia* et *Anaplasma* contenaient des gènes codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse de nucléotides, vitamines et de cofacteurs. En effet, selon Dunning Hotopp et ses collaborateurs (2006), ces gènes sont nécessaires pour l'activité vitale de la bactérie et ils sont localisés dans la partie réduite du génome.

D'autres études (Lin et al. 2003 ; Ohashi et al., 2001) ont décrits l'importance des protéines majeurs de surfaces, celles-ci représentent un groupe de protéines important dans la pathogénie et la persistance des bactéries chez l'hôte vertébré. La variation antigénique de ces protéines entraine une transmission efficace de l'agent pathogène à la tique. Beaucoup de ces protéines appartiennent à la famille des MSP3, p44 et OMP-1 (Dunning hotop 2006).

La comparaison des séquences du gène ARNr 16S des souches d'*E. canis* en provenance d'Europe, d'Asie et d'Amérique a montré un important degré de similitude (99,6%). Ainsi, des séquences identiques ont été retrouvées dans des zones géographiquement éloignées, telles que le Venezuela, Taiwan, l'Italie et la Turquie (Pinyoowong et al. 2008 ; Hsiech et al., 2010) (Figure 3).

D'autres parts, l'analyse des gènes codant pour les protéines gp19 et gp36 a aussi montré une similarité génétique entre les souches provenant de différentes régions. L'ensemble des souches se répartissaient en deux clusters. Le premier est formé par les isolats taïwanais, le second par toutes les autres souches décrites plus haut. Cependant, les souches américaines forment une branche séparée dans le second cluster (Hsiech et al. 2010)

2) MORPHOLOGIE

Microscopiquement, les *Ehrlichieae* se présentent sous la forme de petits cocci d'environ 0,5 à 4 µm appelés corps élémentaires et présents dans le cytoplasme à l'intérieur d'une membrane parasitophore issue de la cellule hôte.

Cette bactérie ne prend pas la coloration de Gram, mais apparaît à la coloration de May-Grünwald-Giemsa comme une inclusion cellulaire basophile (rouge ou bleu foncé selon le stade de développement de la bactérie : les corps élémentaires sont pourpres, les corps initiaux gris bleu (Popov et al., 1995).

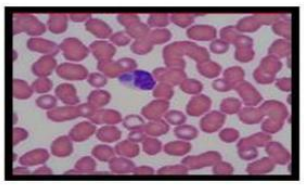

Figure 2 Morula d'*Ehrlichia canis* dans un monocyte x100 (Sainz et al., 2015)

3) EPIDEMIOLOGIE

La première description d'infection canine à *E. canis* remonte à 1935, en Algérie (Donatier et Lestoquard, 1935). L'hôte majeur de ce pathogène est le chien mais d'autres canidés peuvent fonctionner comme hôte réservoir. Tous les stades de développement (larves, nymphes, adultes) de la tique *Rhipicephalus sanguineus* se nourrissent de sang et peuvent être contaminés par *E. canis* lors d'un repas sanguin pris sur un chien infecté. Une transmission transtadiale de la bactérie peut avoir lieu de la larve à la nymphe et/ou de la nymphe à la tique adulte. La transmission transovarienne de la tique à ses œufs n'a pas été observée (Breistscherdt, 1998).

La répartition des infections dues à *E. canis* est liée à celle de son vecteur *R. sanguineus*. Même si seulement 2 à 4 % des tiques sont porteuses de cet agent pathogène dans les régions endémiques telles que la France, l'Italie, l'Espagne, le Portugal, la Bulgarie et la Grèce ; cette fréquence de déplacement des populations humaines et des chiens est responsable de la mise en évidence d'infections en dehors des zones traditionnelles d'enzootie (Azzag et al , 2015).

a) Répartition géographique

Des études basées sur des critères sérologiques et moléculaires ont permis de révéler la présence d'*E.canis* chez des chiens sur le continent africain et dans les pays suivants : l'Algérie (Azzag et al., 2015) la Tunisie, le Sénégal, le Tchad (Brouqui et al., 1991), le Soudan (Inokuma et al., 2006) le Zimbabwe (Kelly et al, 2004 ; Matherwmon et al., 1993) le Cameroun (Ndip et al., 2005), la Cote d'ivoire et le Gabon (Davoust et al., 2006).

Le taux de chiens positifs vis-à-vis d'*Ehrlicha canis* dans ces études, variait d'une étude à une autre. En effet, Azzag et ses collaborateurs (2015) ont décrit que 30% des chiens analysés en immunofluorescence étaient positifs et 17,8% par PCR. Les autres études ont présenté une valeur qui se situant entre 32% et 80,8 %.

Par ailleurs, une analyse similaire a été réalisée en Égypte sur 252 chiens provenant de cinq chenils différents et sur 122 chiens de propriétaire. Les auteurs ont décrit les résultats obtenus par immunofluorescence suivant : une séroprévalence globale de 33%, ainsi 29 % des chiens positifs appartenaient aux groupes chenils et 41% des chiens étaient ceux de propriétaire. En outre, 44% des chiens infestés par des tiques du genre *R. sanguineus* étaient positifs et curieusement 31% des chiens sains étaient séropositifs (Botros et al., 1995).

Par ailleurs et à l'autre bout du continent africain, Pretorius et Kelly (1998) ont décrit par analyse sérologique la présence d'*E. canis* et *E. chaffeensis*. Ces deux agents ont un tropisme pour les monocytes.

Durant la guerre du Vietnam, une forme très hémorragique de l'EMC à *E. canis* a été responsable d'importantes pertes parmi les chiens militaires (Nims et al., 1971). Depuis, de nombreuses enquêtes sérologiques et sous microscopie ont été menées à travers de nombreux pays asiatiques comme la Chine, la Corée du sud, le Japon et la Malaisie ainsi que la Thaïlande (Banet et al., 1996 ; Chae et al., 2003 ; Suksawat et al., 2001 ; Wenet et al., 2003). D'autres études rapportent une séroprévalence à *E. canis* de 30% en Palestine, 13,6% en Chine, 0,2% en Malaisie et 22% en Thaïlande et des inclusions intracytoplasmique chez 14,1 % en Inde (JiHapalapong et al., 2003). En outre, Watanabe et ses collaborateurs (2006) ont décrits une séroprévalence à *E. canis* de 10%, tout en relevant la présence de réactions croisées entre *E. canis, E. chaffeensis* et *E. muris*.

Par ailleurs, l'incidence d'*E. canis* en Europe est plus importante dans le bassin méditerranéen (Espagne, sud de la France, Italie et Turquie) avec toutefois des cas isolés en Europe centrale (Trotz-Williams et Arbres, 2003). En effet, la séroprévalence chez les chiens en provenance d'Espagne était de 16,7% (Solano-Gallego et al., 2006). En outre, Aguirre et ses collaborateurs (2004) ont pu cultiver avec succès *E. canis* à partir de chiens espagnol infectés naturellement. D'autres études menées en Sardaigne, ont permis d'établir des résultats globaux de 50% et de 62,5% chez des chiens adultes de plus 13 mois (Coco et al., 2003). En France, Jouret-Gourjault et ses collaborateurs (2006) ont inoculé en intraveineuse, quatre beagles sains avec *E. canis*, souche Borgo 89, cette dernière fut isoler à partir de chiens malades. Les résultats cliniques obtenus étaient comparables à ceux obtenus à partir d'autres souches.

D'autres parts, Marsilio et ses collaborateurs (2006) ont décrit une similitude génétique de l'ordre de 99,2% des souches européennes d'*E. canis* avec celles sévissant au Japon. En outre, des études basées sur des critères moléculaires ont été menées dans différentes régions d'Italie : le nord, centre et le sud avec respectivement des résultats de 2,9%, 8% et 9,7% respectivement (Solano-Gallego et al 2006).

Unver et ses collaborateurs (2005) ont rapporté une similitude génétique entre *E. canis* et *Ehrlichia ovis* en Turquie. Une autre étude a permis de décrire une similitude de 99,9% entre

des souches d'Oklahoma et des souches Vénézuéliennes (Unver et al.,2001 ; Labruna et al., 2007).

En Amérique, la première description de l'infection par *E. canis* chez les chiens remonte à 1957. Par la suite, d'autres enquêtes ont suivi celle-ci, au Brésil ont a estimé la séroprévalence entre 19,8 et 23% (Labarthe et al., 2003 ; Trapp et al., 2006).

Une autre étude basée sur des critères moléculaires et les signes d'absence ou de présence d'une thrombocytopenie ainsi que la sévérité de l'affection. Cette étude a abouti aux résultats suivants respectivement : 1,4-3,5%, 20-26,8 %, 63,1%(Bulla et al., 2004 ; Dagnone et al., 2003 ; Maciera et al., 2005).

Par ailleurs, des prévalences plus faibles ont été décrites au Canada en comparaison aux USA (Gary et al., 2006). La première description de *E. canis* aux USA, a été faite sur un chien en Oklahoma, Ewing 1963 rapporte qu'il était co-infecté par *Babesia canis*, il est utile de souligner que l'auteur n'a pu confirmer auxquels des deux pathogènes appartenait les inclusions intracytoplasmique mis en évidence en microscopie. En outre, de nombreux cas d'EMC ont été identifiés par « The oklahoma animal disease diganostic lab » entre juin 1986 à juillet 1987 avec un taux de 53% (Rodgers et al., 1989). D'autres part, des études menées aux Missouri sur des chiens présentant des signes de polyarthrites ont abouti à des résultats avec des titres allant de 1 :20 à 1 :5120 et la trhombocytopenie était l'anomalie la plus répandue parmi les chiens positifs (Stockham et al., 1992).

b) Transmission d'*Ehrlichia canis*

E. canis se développe dans les glandes salivaires, les hémocytes, les tubes de Malpighi et dans l'intestin moyen de la tique. L'intestin moyen étant conservé au cours des mues successives de *R. sanguineus* ; la bactérie persiste (Davoust, 1994).

Le rôle pathogène indirect de la tique est fondamental dans la transmission : le passage de l'infection d'un chien à un autre est directement tributaire de la présence du vecteur. C'est à la fin du gorgement rapide que les germes pathogènes sont inoculés lors du repas sanguin : au moment où les régurgitations de sécrétions salivaires sont importantes. Lors d'infections expérimentales, il a été démontré qu.il était nécessaire à la nymphe infectée de prendre un repas même partiel pour pouvoir transmettre les *Ehrlichia* à un chien sain (Smith et al., 1976). En effet, l'injection à un chien de tissu de nymphes infectées et à jeun, ne permet pas de transmettre la maladie, alors que la même manipulation avec une nymphe gorgée de sang aboutit à l'infection du chien. Il est également certain qu'après la mue de *Rhipicephalus*, le niveau d'infection décline si la tique jeûne, car l'ingestion de sang semble stimuler la multiplication du microorganisme. Les *Ehrlichia* sont sans doute en nombre insuffisant pour entraîner l'infection sans cette stimulation.

c) Réservoirs et espèces sensibles

Les espèces sensibles à *E. canis* sont les canidés domestiques et sauvages : chiens, chacals, loups et coyotes.

Les tentatives d'infection expérimentales de souris, rats, hamsters, lapins, moutons, bovins et chats sont restées vaines. Il n'existe pas de variation de sensibilité inter raciale à proprement parler. Certaines races pures sont plus souvent citées comme le Berger belge ou le Berger allemand. Mais leur sensibilité supérieure apparente relève plus de la gravité de la forme clinique que du taux d'infection. La prédisposition du Berger allemand aux formes graves serait due à un déficit de l'immunité à médiation cellulaire dans cette race (Nyendo et al., 1980).

Les facteurs sexe et âge des individus ne semblent pas influer de manière significative. Par contre, il existe des facteurs individuels prédisposant tels les infections concomitantes et le stress qui peuvent être immunodépresseurs. Les cas chroniques peuvent alors évoluer et des symptômes aigus apparaître. L'infection devient alors une maladie.

Les réservoirs de la bactérie sont probablement les canidés sauvages ; un doute persiste sur les chiens porteurs chroniques d'*E. canis* et la tique vectrice elle-même. Les chiens ayant déjà été atteints d'ehrlichiose et qui ont guéri restent candidats à une nouvelle infection. La protection immunitaire développée lors de l'infection reste en général incomplète. Les canidés sauvages les plus nombreux aux États-Unis sont les renards roux et argentés. Le renard roux est omniprésent en Floride et au Texas, deux états des États-Unis où *R. sanguineus* est aussi présent et où l'ehrlichiose est endémique. En 1973, Amyx et Huxsoll ont montré que l'infection expérimentale de ces deux genres est possible, les renards développant une forme atténuée d'ehrlichiose. Il est donc logique de penser que les renards sont des réservoirs (Beaufils, 1997).

Le rôle des chiens infectés chroniques est lui discuté. En effet en dehors de la phase aiguë de la maladie, le nombre de bactéries circulant dans le sang périphérique est faible. Le chien serait alors une impasse évolutive (Beaufils, 1997). Cependant, certains auteurs considèrent les chiens porteurs chroniques asymptomatiques comme des réservoirs et des sources de contagion dans la mesure où ils peuvent présenter des phases de rechute (Davoust, 1994).

La tique *R. sanguineus*, malgré l'absence de transmission transovarienne du microorganisme constitue un éventuel réservoir plausible : en effet, les adultes à jeun peuvent survivre 158 à 568 jours, avec un pouvoir contaminant de 150 jours environ ; les répartitions géographiques de la tique et d'*E. canis* se superposent ; de plus *R. sanguineus* présente une certaine résistance aux acaricides qui assure sa persistance (Latour, 1997).

4) EXPRESSION CLINIQUE

a) Symptômes

L'EMC est une maladie multi systémique qui se manifeste sous trois formes : aigue, subclinique et chronique.

E. canis peut infecter toutes les races de chiens, toutefois le berger allemand s'avère être le plus sensible. En effet, il manifeste fréquemment la forme sévère de la maladie avec un taux élevé de morbidité et de mortalité (Nyindo et al., 1980).

Figure 3 Pétéchies dues à *Ehrlichia canis* (veteriankey.com)

Par ailleurs, l'âge n'est pas un facteur favorisant l'incidence ou la sévérité de la maladie. En outre, les manifestations cliniques peuvent être affectées par la pathogénicité des différentes souches de *E. canis*, ainsi que des coïnfections avec d'autres agents infectieux vectorisés par des arthropodes comme *Hepatozoon canis, Anaplasma phagocytophilum* ou *Dirofilaria immits* (Gal et al., 2007).

La phase aigüe est caractérisée par une importante hyperthermie, de la léthargie, une anorexie, une adénopathie, une splénomégalie et des hémorragies. Ce dernier signe peut être observé par un examen général qui mettra en évidences des pétéchies, des ecchymoses et de l'épistaxis (Figure 3,4 et 5).

En outre, des lésions ophtalmologiques ont été signalées par Komenon et ses collaborateurs (2007) incluant des uvéites, des chorioretinites, des hémorragies et des infiltrations perivasculaire de la rétine. De plus, Harrus et ses collaborateurs (1998) rapportent des cas d'hémorragies sous rétinienne.

Par ailleurs, des manifestations neurologiques ont été décrites par Waner et son équipe (1997). En effet, pour des raisons encore mal connues, le chien peut évoluer vers la phase chronique. Au cours de cette phase, des symptômes similaires à ceux décrit en phase aigüe peuvent être rencontrer, toutefois ils se manifesteront avec une plus grande intensité notamment, une pâleur et une faiblesse intense ainsi qu'une cachexie sévère (Harrus et al., 1997)

Figure 4 Echymoses cutanées chez un chien atteint d'ehrlichiose (Mylonakis et al., 2010)

b) Signes biologiques

Hémogramme

L'hémogramme est un examen essentiel dans le diagnostic de l'EMC. En effet la thrombocytopenie est une anomalie courante durant la phase aigüe, durant cette phase la thrombocytopenie est accompagnée d'une légère anémie ainsi que d'une leucopénie.

D'autres parts, durant la phase subclinique, il est possible de déceler une légère thrombocytopenie en absence d'autres signes cliniques. En effet, Harrus et ses collaborateurs (1998) ainsi que Waner (1997) ont décrits des chiens infectés expérimentalement avec un taux de plaquettes sanguines réduit de 42%. En outre,

d'autres anomalies ont été rapportées, parmi celles-ci on retrouve une baisse du nombre des érythrocytes et des leucocytes.

Par ailleurs, durant la phase chronique une grave thrombocytopenie est couramment associée à une anémie et une leucopénie marquées. En outre une pancytopenie est également décrite, elle serait une conséquence de l'aplasie de la moelle osseuse, cette dernière serait un signe d'appel de la phase chronique de l'EMC (Harrus et al., 1997).

D'un autre côté, des études ont décrits la pertinence de la numération plaquettaire en zone endémique pour le dépistage de l'EMC. En effet, seul (1,4%) de chiens non thrombocytopenique étaient positifs vis-à-vis d'*E. canis* par biologie moléculaire (amplification de l'ARNr 16s). En revanche, 63,1% des chiens trhombocytopenique étaient positifs. Cette étude souligne l'importance de l'évaluation de la numération plaquettaires (Bulla et al., 2004).

Figure 5 Ecchymose sclérale chez un chien atteint d'ehrlichiose monocytaire canine (Mylonakis et al., 2010).

Modifications biochimiques

L'hypoalbuminémie constatée peut être due à une fuite rénale d'albumine mais l'atteinte hépatique ainsi que les saignements, l'exsudation et l'anorexie transitoire

constituent également des causes possibles (Harrus et al., 1996 ; Dawson et al.,1990). Certains auteurs pensent également qu'elle est purement physiologique. En effet, le taux d'albumine est en partie régulé par la pression oncotique. Une augmentation de cette dernière, suite à la synthèse massive de globulines (alpha-2, bêta et gammaglobulines) observée durant le début de la maladie entraînerait, par compensation, une diminution de la synthèse hépatique d'albumine. Cela permettrait d'éviter l'apparition d'une hyperviscosité sanguine (Harrus et al., 1997)

L'augmentation des alpha2-globulines est la conséquence de la synthèse hépatique de protéines de l'inflammation. Rikihisa a pu noter une augmentation de la CRP (protéine C réactive) 4 à 6 jours après l'inoculation d'*E. canis* (Rikihisa et al. 1994). Et plus récemment, la cinétique de cette augmentation a été étudiée : Shimada et coll. ont mis en évidence un pic très important (> 200 µg/mL) entre 15 et 42 jours, suivi d'une baisse rapide des concentrations sériques. Ce pic correspond à la période à partir de laquelle *E. canis* a pu être mise en évidence par PCR et l'auteur suppose que la multiplication intense du parasite dans le sang serait la cause de cette réponse inflammatoire (Shimada et al., 2002).

Modifications histologiques

Elles varient selon la phase de la maladie et selon sa gravité. On note des lésions de type pétéchies et ecchymoses, une hyperplasie réticulo-endothéliale généralisée associée à un œdème des organes concernés. Sur le plan histologique, on observe une infiltration plasmocytaire périvasculaire concernant divers organes dont les méninges, les reins, les poumons, le foie, la rate, la moelle osseuse et les nœuds lymphatiques (Hildebrandt et al., 1973).

Lésions

Des lésions de phlébite et de vasculite sont observées dans les reins, suivies d'une infiltration lympho-plasmocytaire. Les poumons sont le siège de lésions de

pneumonie interstitielle, puis de lésions hémorragiques et infiltratives interstitielles et péri-bronchiques. La rate présente une hyperplasie réticuloendothéliale, une infiltration lympho-plasmocytaire, une hématopoïèse extra-médullaires et de nombreuses images d'érythrophagocytose. Enfin, dans le foie, une infiltration par des macrophages, des lymphocytes ou encore des plasmocytes est observée au niveau de la triade porte. On note également parfois des dépôts d'hémosidérine dans le foie et la rate (Davoust et al., 1991).

5) PATHOGENIE

a) Cycle de développement

Il existe plusieurs stades de développement : les corps élémentaires pénètreraient dans la cellule par phagocytose et se diviseraient dans une membrane parasitophore provenant de la membrane plasmique de la cellule hôte. Après 3 à 5 jours, on observe des amas d'éléments pléomorphes comparables aux corps réticulés des Chlamydies (Figure 6), appelés corps initiaux. Enfin, ces corps initiaux se multiplieraient encore pour former en une semaine environ le stade morula de 4µm de diamètre environ - spécifique de ce groupe, qui correspond à des micro-colonies pouvant contenir jusqu'à 100 corps élémentaires (20 à 40 en moyenne). La sortie de la cellule se ferait le plus fréquemment sans doute par exocytose, libérant ainsi les corps élémentaires. D'autre part, *E. canis, E. (Cowdria) ruminantium* et *E. chaffeensis* ont tendance à donner des morulas très denses, dans lesquelles on distingue à peine les corps élémentaires.

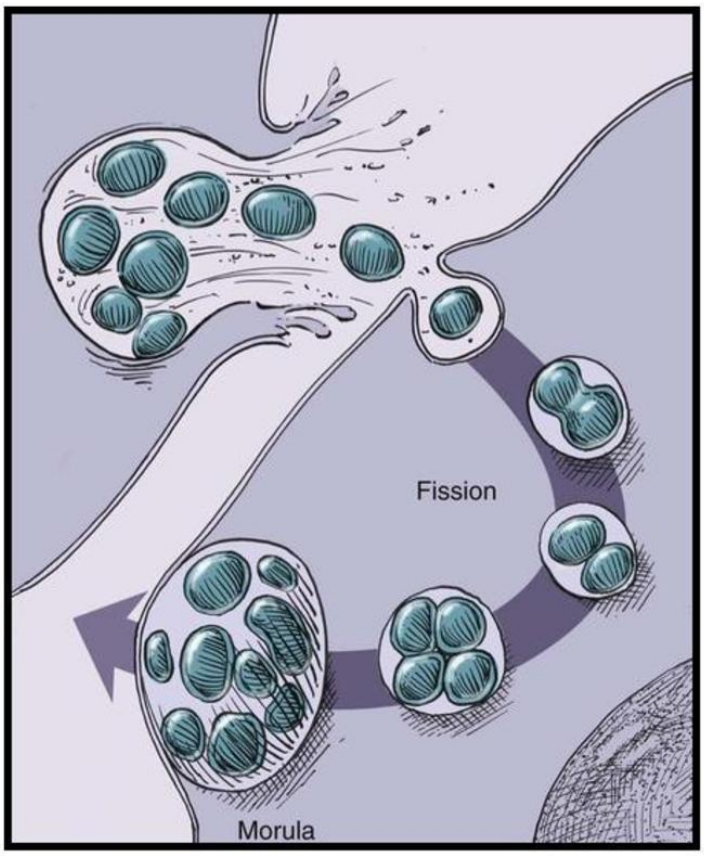

Figure 6 Cycle de multiplication d'*Ehrlichia canis* (Inokuma et al., 2003)

b) Pouvoir immunogène et antigénique

E. canis est reconnue comme étant l'agent pathogène responsable de l'ehrlichiose monocytaire canine (EMC) à travers le monde (Neer et al., 2002). Après une période d'incubation de 8 à 20 jours, l'évolution expérimentale de l'EMC peut être subdivisée en trois phases, aigue, subclinique et chronique. Toutefois, dans des conditions naturelles il est difficile de faire cette distinction.

La plupart des chiens non traités se rétablissent cliniquement en deux à quatre semaines. La phase subclinique peut alors durer plusieurs mois, voire plusieurs années (Neer et al., 2006). En outre, les individus immunocompétents peuvent éliminer l'infection durant

cette phase ou devenir porteur chronique. La phase chronique est caractérisée par une sévère aplasie médullaire (myelosuppression), un pan cytopénie périphérique et une forte mortalité secondaire à une septicémie ou d'importantes hémorragies (Mylonakis et al., 2004) (Figure 5). Mylonakis et ses collaborateurs (2004) rapportent des signes d'aplasie médullaire expérimentale dès la fin de la phase aigüe.

Plusieurs études indiquent la sensibilité à l'infection par *E. canis* du berger-allemand. Ainsi, la forte morbidité et mortalité chez cette race s'explique par l'inefficacité de leurs immunités à médiation cellulaire (Harrus et al., 1997 ; Mylonakis et al., 2004).

D'autre part, Breitschwerdt et ses collaborateurs (2005) suggèrent que les infections simultanées avec d'autres agents pathogènes tels que *Leishmania infantum, Babesia* spp, *Rickettsia* spp, *Bartonella* spp, *Hepatozoon* spp et *Anaplasma* spp contribuent à la gravité de la maladie, en amplifiant les signes cliniques et pathologiques. Toutefois, des preuves solides associant les coïnfections à la myelossupression avec la mort de l'animal doivent être mises en évidence. (Kordick et al., 1999 ; Mylonakis et al., 2004, 2005).

D'autres études expliquent que la variation de la virulence des souches d'*E.canis* peut également affecter l'intensité et la gravité de la maladie. Siarkou et ses collaborateurs (2007) décrivent un génotype basé sur l'ARNr 16S identique entre les souches responsables de la forme myelossupressive et la forme non myelossupressive, suggérant la pertinence d'explorer d'autres gène comme le gène codant pour la gp36.

Des études expérimentales suggèrent que la sévérité de la maladie serait liée aux profiles immunologique des individus (polarisation Th1/Th2) (Harrus et al., 2001). En effet, des niveaux élevés d'INFδ sont associés à une maladie bénigne, en revanche une élévation persistante d'IL1β et IL8 suggère une maladie sévère (Tajima et al., 2005 ; Unver et al., 2006). En outre, l'immunité cellulaire est essentielle pour la protection contre *E. canis*, l'immunité humorale ne confère aucune protection (Neer et al., 2006).

En 2006, Mylonakis et ses collaborateurs décrivent une plasmocytose au niveau de la moelle osseuse, elle serait plus fréquente chez les individus présentant une myelossupression. D'un autre côté, l'utilisation de stéroïde dans l'approche thérapeutique des chiens pancytopenique pourrait s'avérer intéressante. Ainsi, la destruction de cellules souches et leur progéniture dans la moelle osseuse pourrait avoir une médiation immunitaire (Waner et al., 2008).

La mise en œuvre d'une approche préventive globale est importante. En effet, la réinfection persistante par *E. canis* ainsi que le volume de l'inoculum pourrait contribuer à la sévérité des manifestations de la maladie (Harrus et al., 1999 ; Baneth et al., 2009).

D'autres parts, des études suggèrent que le désordre plaquettaire est l'anomalie la plus décrite lors d'EMC (Waner et al., 1997). En effet, on rapporte que les phénomènes inflammatoires siégeant au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins, contribuent à la séquestration des thrombocytes au niveau de la rate lors de la phase aigüe de la maladie, réduisant ainsi la durée de vie des plaquettes sanguine (Smith et al., 1975 ; Pierce et al., 1977 ; Kakoma et al., 1978). En outre, des études utilisant des radio-isotopes ont montré la baisse de la durée de vie des thrombocytes, passant de 9 à 4 jours lors d'infection à *E. canis* (Smith et al., 1975).

La présence d'anticorps antiplaquettaires sériques chez des chiens infectés expérimentalement par *E. canis* soutient l'hypothèse d'un composant immunopathologique dans la pathogénie de l'EMC. (Waner et al., 1995 ; Harrus et al., 1996). La détection de ces anticorps est précoce (Harrus et al., 1996). Cette précocité, Waner et ses collaborateurs (1995) l'expliquent par un phénomène auto-immun, ils proposent que l'apparition des anticorps anti plaquette avant ceux d'*E. canis* suggère que les cellules B portent des récepteurs d'auto anticorps naturel. Ces cellules prolifèreraient en interagissant avec des antigènes d'*E. canis* similaires antigeniquement à ceux du soi.

D'autre part, Lovering et ses collaborateurs (1980) rapportent que la décomplémentation de sérum de chiens infectés par *E. canis*, manifestant la phase aigüe de la maladie, contribue à modérer la thrombocytopenie.

D'autres études décrivent des manifestations moins graves de la maladie chez des individus ayant subi une splénectomie. De plus, l'apparition des anticorps anti-*E. canis* ne semble pas être affectée chez les animaux ayant subi une splénectomie. Cette même étude, décrit chez ces sujets une augmentation des valeurs de la FNS, il est utile de souligner le rôle majeur de la rate dans la pathogénie des maladies auto-immunes, ainsi la splénectomie pourrait être un élément thérapeutique pour les individus rebelles aux traitements médicamenteux (Lewis et Meyers, 1996). En effet, la splénectomie contribue à neutraliser la production d'anticorps et l'élimination d'un des sites majeurs du système de phagocytaire. La rate est aussi le site principale pour la synthèse de tuftsine et properdine, des molécules opsonisantes servant à promouvoir la phagocytose (Eichner, 1970 ; Lockwood, 1983).

Parmi les nombreuses manifestations cliniques induites lors de l'EMC, les plus fréquentes semblent être liées à la formation d'immun complexe, comme les glomérulonéphrites, l'uvéite et les polyarthrites (Ristic et Holland 1993 ; Breitshwerdt, 2000). En effet, ces affirmations ont été basées sur la prévalence de l'hyperglobulinémie polyclonale. (Harrus et al., 1996).

Pedersen et ses collaborateurs (1999) décrivent des immuns complexes circulant chez des chiens infectés naturellement ou expérimentalement durant la phase chronique. En revanche, Harrus et ses collaborateurs (2001) n'ont pas restreint leurs descriptions à cette phase. D'un autre côté, cette dernière étude a associé la sévérité de la maladie à la présence des immuns complexes circulants et suggèrent que nombreuses manifestations cliniques sévères sont médiées par les immuns complexes.

Figure 7 Pâleur et pétéchies de la muqueuse du pénis chez un chien myelossupressif (Mylonakis et al., 2010)

c) Réponse immunitaire

L'infection naturelle ou expérimentale du chien par *E. canis* entraîne la production d'anticorps spécifiques. Weisiger a étudié la cinétique des anticorps suite à une infection expérimentale : 4 à 7 jours après l'infection par transfusion de sang à partir de chiens infectés en phase aiguë, on peut noter l'apparition d'IgM et d'IgA, alors que les IgG n'apparaissent qu'à partir du 15ème jour (Weisiger, 1975).

D'autre part, l'apparition des IgG semble être plus précoce et dépendante de la dose infectante. Ainsi, à partir d'isolats de culture cellulaire, on a pu aboutir à des infections expérimentales avec production d'IgG à partir du 5^{e} jour, voire même du 3^{e} jour (Iqbal et Rikihisa, 1994).

La séroconversion est beaucoup plus lente lors d'infections naturelles ; il est a noté que les chiens peuvent présenter des délais de séroconversion allant jusqu'à 4 semaines (Neer et al., 2002).

Une étude américaine a montré l'existence d'une réponse immunitaire de type Th1 prédominante, par la mise en évidence d'une présence essentiellement d'immunoglobulines de type IgG2, induites par l'IFNδ, chez des chiens atteints d'ehrlichiose naturelle comme expérimentale. La dose infectante, la réponse immunitaire de l'hôte ou encore la pathogénicité

de la souche sont autant de facteurs pouvant influencer l'apparition de la réponse immunitaire humorale (Harrus et al., 2001).

Expérimentalement, le titre initial en IFI après les 15 premiers jours est de 160 à 640, mais il augmente très vite de 320 à 1280 à J17 et de 1280 à 2560 à J20. Durant les premiers jours de l'infection, les anticorps produits sont dirigés contre des protéines de faibles poids moléculaires, notamment des antigènes majeurs de 28 et 36 kDa. Par la suite, la protéine de 28 kDa est toujours reconnue par un sérum de chien en phase subclinique et chronique, ainsi que de nombreux autres antigènes de plus haut poids moléculaire (44, 53, 60, 65 kDa) (Waner et al., 2000).

Une étude menée sur des sérums de chiens infectés par *E. canis* et provenant de différentes régions du monde a révélé que malgré une apparence homogène des profils antigéniques en Western Blot (WB) des chiens provenant des États-Unis, de France et des Iles Vierges, les sérums des chiens provenant d'Italie et du Zimbabwe ont des profils légèrement différents. Même si dans cette étude, une infection concomitante avec *E. (Cowdria) ruminantium* n'a pas été exclue pour les sérums provenant du Zimbabwe, aucun des sérums provenant d'Italie n'a reconnu la protéine immunodominante de 28 kDa, mais une autre protéine de 27 kDa et d'autres protéines de 24 à 34 kDa notamment. La souche Florida *d'E. canis* utilisée présenterait donc des différences antigéniques avec les souches rencontrées dans ces deux pays. Cette diversité antigénique observée à travers différents pays est aujourd'hui admise pour *E. canis* (Hegarty, 1999).

Les protéines membranaires majeures ont un poids moléculaire de 28 à 32 kDa et elles constituent l'antigène dominant ; ces protéines sont codées par les gènes p30s, une famille de multigènes très polymorphe, comme nous l'avons vu dans la première partie. On connaît plus de 20 copies de ce gène, qui sont homologues mais légèrement différentes, et codent donc pour des protéines différentes. La structure de ces gènes semble assez conservée pour différentes souches *d'E. canis*. L'homologie des séquences d'acides aminés entre ces diverses protéines varie de 24,7 à 71,8 % (Chens et al., 1997). Cette diversité et le nombre important de copies du gène p30s justifie la survie et la possibilité d'échappement d'*E. canis* au système immunitaire malgré la faible taille du génome (Redy et Steck, 1999)

L'isolement et l'amplification de 14 de ces protéines par RT-PCR a été réalisée sur des prélèvements sanguins de chiens infectés expérimentalement et sur des tiques infectées artificiellement également. On a retrouvé 11 ARNm différents dans les monocytes de chiens infectés, alors qu'un seul gène a été détecté chez les tiques, adultes ou nymphes (Unver, 2001)

6) DIAGNOSTIC

a) Diagnostic clinique

Cliniquement, les ehrlichioses pourront principalement s'inscrire, comme nous l'avons vu, dans le diagnostic différentiel des maladies cachectisantes chroniques, des fièvres inexpliquées, des polyarthrites ou encore des syndromes hémorragiques, avec principalement épistaxis et pétéchies. Mais l'existence de présentations cliniques variées (uvéites, troubles neuromusculaires, œdèmes…) doit laisser un champ plus large dans un contexte épidémiologique et biologique favorable (Baroche, 1996)

b) Diagnostic cytologique et culture

Il est possible de mettre en évidence des morulas caractéristique dans les monocytes par microscopie optique (Hildebrandt et al., 1973). Toutefois, la recherche de morula s'avère fastidieuse et pertinente dans seulement 4 % des cas (Woody et Hoskins, 1991). Cet examen peut être optimisé par un frottis leucocytaire. En effet, la sensibilité a été augmentée de 66% (Mylonakis et al., 2003).

Par ailleurs, les inclusions intra-cytoplasmique peuvent être confondus avec des granules azurophiles dans les lymphocytes (Figure 8), les matières nucléaires phagocytées, ainsi qu'avec d'autres organismes *Ehrlichia* appartenant à la famille des *Anaplasmatacea* (*E. chaffeensis Neorickettsia risticii* et *E. ruminatium).* En effet, ces bactéries peuvent aussi infectées les monocytes chez le chien (Kakoma et al 1994 ; Kelly et al 1994 ; Breitscherdt et al., 1998) (Figure 8).

D'autre part, l'évaluation du frottis sanguin est également nécessaire afin d'évaluer les éventuelles coïnfections avec d'autres agents infectieux transmis par les tiques (eg. *H. canis*). En effet, ces agents infectieux influencent les manifestations cliniques et contribuent à sa gravité tout en influant sur l'issue thérapeutique (Ga et al., 2007).

Il est possible de mettre l'agent infectieux en culture à partir du *buffy coat* d'un patient que l'on injecte à une espèce sensible, ou dans un milieu cellulaire spécifique. Pour *E. canis*, la mise en culture prend 14 à 34 jours. L'avantage de la méthode est sa grande sensibilité : elle peut détecter *E. canis* dans le sang de l'animal dès le deuxième jour de l'infection et même en début de traitement. Mais cette méthode est aujourd'hui considérée uniquement comme un outil de recherche, du fait de son coût et du délai de réponse variant de 3 jours à plus de deux mois (Neer et al., 2002).

Une lignée cellulaire continue de macrophage de chiens (DH82) a été utilisée avec succès pour la culture de *E. canis*, ouvrant la possibilité de développer des tests IFI, améliorant ainsi le diagnostic de l'EMC (Lovering et al., 1980).

Par ailleurs, l'isolement et la culture des espèces à *Ehrlichia* s'avèrent fastidieux et long, il est restreint aux laboratoires de recherche et non comme un outil de diagnostic. En effet, l'isolement requiert un équipement spécifique et un personnel qualifié. La culture de la bactérie est un long processus qui peut durer jusqu'à dix semaines. En outre, la culture de *E. canis* sur des macrophages de lignée cellulaires continues de souris (J774.A1) a été décrite comme une alternative à la lignée cellulaire (DH82) (Keusary et al., 2001).

De plus, il a été rapporté que la culture de *E. canis* sur une lignée cellulaire d'endothéliale microvasculaire immortalisée (CDC/EU.HMEC-1) a été possible (Dawson et al., 1993).

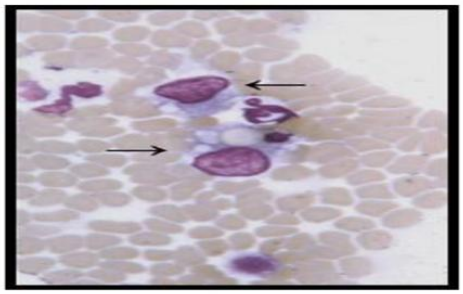

Figure 8 Frottis sanguin d'un chien infecté par *Ehrlichia canis* (Harrus et al., 2011)

c) Diagnostic biochimique

L'hypoglobulinémie, l'hyperglobulinémie et l'hypergammaglobulinemie sont des altérations biochimiques courantes lors de l'EMC. En outre, l'électrophorèse des protéines sériques révèle une hypergammaglobulinemie poly clonale dans la majorité des cas (Harrus et al., 1996).

Par ailleurs, d'autres études signalent une légère augmentation de l'alanine aminotransferase, la phosphatase alcaline chez les chiens durant la phase aigüe de l'EMC. De plus, la concentration des protéines peut augmenter durant cette phase. En effet, Shimada et ses collaborateurs (2002) décrivent une augmentation de la CRP entre 4 à 16jours post infection.

d) Diagnostic sérologique

Plusieurs méthodes sérologiques ont été développées pour le diagnostic de l'EMC. Ces méthodes sont considérées pertinentes pour la prévalence ainsi que pour le diagnostic de l'EMC.

L'immunofluorescence indirect (IFI) pour la détection d'anticorps anti-*E. canis* est considérée comme la méthode sérologique de référence. En effet, elle indique l'exposition de l'individu à *E. canis* (McBride et al., 2003) (Figure 9).

D'autres études suggèrent deux tests IFI à 7-14jours d'intervalle, ainsi une augmentation de 4 fois des titres d'anticorps est évocatrice d'une infection active. Les anticorps anti-ehrlichia sont persistant pendant plusieurs mois, voire années, même après traitement et élimination de l'agent infectieux (Bortsh et Greene, 1996).

De plus de l'IFI, l'épreuve d'immuno-absorption enzymatique (ELISA) a été développer et semble être utile dans le diagnostic de la maladie (Harrus et al., 2002). En effet des kit dot-ELISA sont commercialisés et sont utilisés comme test de control.

Par ailleurs, trois kits ELISA pour la détection d'anticorps IgG anti-E. canis : (1) kit ELISA basé sur la majeure protéine antigénique recombinante (MAP 2), le test IMMUNOCOMB dot-ELISA en utilisant un extrait brute d'*Ehrlichia* (Biogal, laboratoire Galed) et le SNAP 3dx test, ce dernier utilise des peptides synthétiques dérivés de la protéines P30 et P31 (Laboratoires IDEXX) (Harrus et al., 2002). Les échantillons testés ont été recueilli à partir de chiens suspectés d'être infectés naturellement par *E. canis*, ainsi que des chiens infectés expérimentalement. Les auteurs ont comparé les résultats qualitatifs (le rapport positif/négatif) avec une correspondance de 74,6% entre le différent test décrit plus haut. De plus, la spécificité de l'immunocomb et le test IDEX était très élevée. Les auteurs ont conclu la spécificité et la sensibilité des kits dot-ELISA, ils ont aussi recommandé de répéter le test ELISA à 1-2 semaine d'intervalle (Harrus et al., 2002).

D'autres parts, Hegarty et ses collaborateurs (2009) recommandent l'association du test 3Dx SNAP avec une numération plaquettaire afin d'augmenter sa pertinence.

D'un autre côté, le diagnostic sérologique de l'EMC est compliqué par les réactions croisées de *E. canis* avec les autres organismes déjà décrit dans ce présent manuscrit (Waner et al., 2001). Il est donc nécessaire d'associer les éléments épidémiologiques, clinique avec la sérologie. En effet, l'IFI ne pourra distinguer entre *E. canis, E. ewingii, E. ruminatium et E. chaffeensis* (Cardenas et al., 2007). De plus, des réactions croisées entre *E. canis et Anaplasma phagocytophilum* ont déjà été documentées. En effet, une étude portant sur des chiens expérimentalement a décrit une réaction entre ces deux agents infectieux au bout de 55

jours PI en dépit de l'absence de réaction croisées durant la phase aigüe de la maladie (Waner et al., 1998).

Par ailleurs, il n'y a pas de réactions sérologiques croisées entre *E. canis* et *Anaplasma platys*, l'agent étiologique de l'anaplasmose thrombocytopique canine (French et Harvey, 1983). En revanche des réactions croisées entre *E. canis* et *Rickettsia ricjettsii*, l'agent étiologique de la fièvre des montagnes rocheuses ont été décrite (Greene et al., 1985).

L'interprétation des résultats sérologiques doit tenir compte des données épidémiologiques et des signes cliniques, la possibilité d'infections multiples transmît par les tiques.

D'autres part, les tests western blot sont des méthodes sérologiques plus spécifique, pouvant aider à caractériser l'agent infectieux en donnant en quelque sorte une empreinte de son profil de protéines immunogènes. Habituellement une certaine homogénéité entre les différentes souches de *E. canis* est retrouvée (Hegarty et al., 1997).

En outre, un test western blot a été utiliser pour caractériser et distinguer les infections des différents organismes responsable des ehrlichioses, anaplasmoses, neorickettsioses et semble résoudre le dilemme des réactions croisées sérologiques.

Dans des études visant à identifier les principaux antigènes immunoréactifs de *E. canis* ainsi que pour déterminer la cinétique de la réponse à anticorps anti-*E. canis*, des chiens ont été infectés expérimentalement par voie intradermique et sous cutanée. La réponse anticorps a été détecté dès le 21^{e} jour PI, à ce stade les anticorps détectés étaient dirigées contre les protéines de poids moléculaire compris entre 19 et 37 kDa. Entre le 2^{e} jour et le 28^{e} jours PI, les principales protéines immunoreactive reconnues étaient 19, 37, 75 et 140 kDa. Du 28^{e} jour aux 42^{e} jour PI, les protéines de 28, 42, 72, 95, 200 kDa étaient reconnues (MCbride et al., 2003).

Par ailleurs, le test western blot est utile pour distinguer entre les infections à *E. canis et E. ewingii*. En effet la plupart des chiens infectés par *E. ewingii* auront des titres IFI positifs à *E. canis*. De plus, aucun test IFI n'a été mis au point pour *E. ewingii*, cette dernière ne peut être cultivée in vitro (Hegarty et al., 1997).

D'autres études, menées par O'connor et ses collaborateurs (2006) sur des sérums infectés avec différentes espèces de *Ehrlichia* afin de démontrer le nombre possible de réactions à des protéines de 27 30 KDa, en utilisant le western blot basé sur des antigènes natifs de *E. canis* ont abouti, à des réactions avec les protéines de 28 à 30 KDa pour les sérums infectés par *E. canis*, des réactions variable pour ceux infectés par *E. chaffeensis* et aucune réaction pour les sérums infectés par *E. ewingii*. (O'Connor et al., 2006).

D'autres part, le gène Map-1 codant pour la protéine de 28 KDa de la membrane externe sont hautement diversifiés parmi les souches de *E. chaffeensis et E. ruminatium* et très conservé parmi les souches de *E. canis* (Yu et al., 2007).

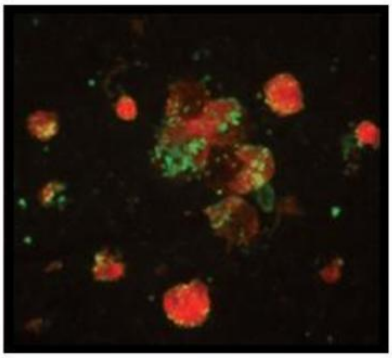

Figure 9 *Ehrlichia canis* par IFI (Labruna et al., 2007)

.

e) Diagnostic moléculaire

La PCR et le séquençage sont des méthodes sensibles pour la détection et la caractérisation de l'ADN d'*E. canis*. Toutefois des résultats faussement positifs peuvent se produire avec de basse température lors de la présence de contaminant, ou lorsqu'une

amplification non spécifique se produit. En outre, un résultat négatif ne prouve pas nécessairement que le chien est négatif (faux négatif).

La détection de *E. canis* par PCR peut-être réaliser au plus tôt à 4-10jours PI (Iqbal et al., 1994).

Par ailleurs, plusieurs tests basés sur différents gènes (eg. ARNr 16S, P28, P30, dsb, VirB9) ont été élaboré. Toutefois, les tests basés sur l'ARNr 16S et le P30 sont les plus utilisés.

L'analyse basé sur le P30 par la PCR-nichée a montré plus de sensibilité que celle basée sur l'ARN 16S (Stich et al., 2002). Cette sensibilité est expliquée par Harrus et ses collaborateurs (1998, 2004) par le fait que *E. canis* contient de multiples copies du gène P30 et uniquement une copie du gène ARNr 16S, ainsi les chances de détection sont optimisées en ciblant le gène P30.

D'autres part, la PCR sur des échantillons de rate est considérée comme plus sensible pour l'évaluation de la guérison par rapports aux échantillons de sang et de moelle osseuse (Harrus et al., 1998, 2004). En outre, en l'absence d'échantillon de sang totale, l'utilisation de la PCR sur du sérum est possible. En effet, Mylonakis et ses collaborateurs (2009) la décrivent dans leurs études basées sur l'ARNr 16S en utilisant la PCR-nichée.

Dans une autre étude, on décrit une sensibilité plus importante de la PCR en temps réel versus PCR conventionnelle, de plus elle permet la quantification de la charge bactérienne (Baneth et al., 2009).

La PCR en temps réel semble moins sujette aux contaminations, (Peleg et al., 2009) décrivent la construction d'amorces ADN/ARN chimérique pour l'ARN 16S de *E. canis*. En effet plusieurs bases de l'ARN ont été incorporées dans des positions spécifiques des amorces

de l'ADN. Ce procédé permet la diminution de la formation de sous-produits indésirables et l'augmentation de la sensibilité de dix fois (Peleg et al., 2009).

Par ailleurs, la PCR en temps réel permet l'élaboration de test multiplex pour une détection simultanée de plusieurs pathogènes dans un même échantillon. Ainsi plusieurs tests multiplex QPCR ont été mis au point pour la détection *de E. canis, E. chaffeensis, E. ewingii, A. platys* et *A. phagocytophilum* (Sirigireddy And Ganta 2005).

Récemment, une nouvelle approche moléculaire, utilisant la PCR en temps réel consiste en l'analyse des courbes de fusion à haute résolution (HRM). HRM en temps réel est une méthode moléculaire développé à la base pour la détection de mutations, de polymorphismes génétiques et pour le génotypage (Witwer et al., 2003).

En conclusion, il existe plusieurs avantages pour la PCR, qu'elle soit conventionnelle ou en temps réel. La détection précoce de l'ADN avant que ne se produit la séroconversion, sa sensibilité qui est plus élevée et en la détection de l'ADN de *E.canis* avant les anticorps indique une infection active. Cette dernière caractéristique peut permettre aux cliniciens un meilleur contrôle de l'efficacité du traitement (Baneth et al., 2009).

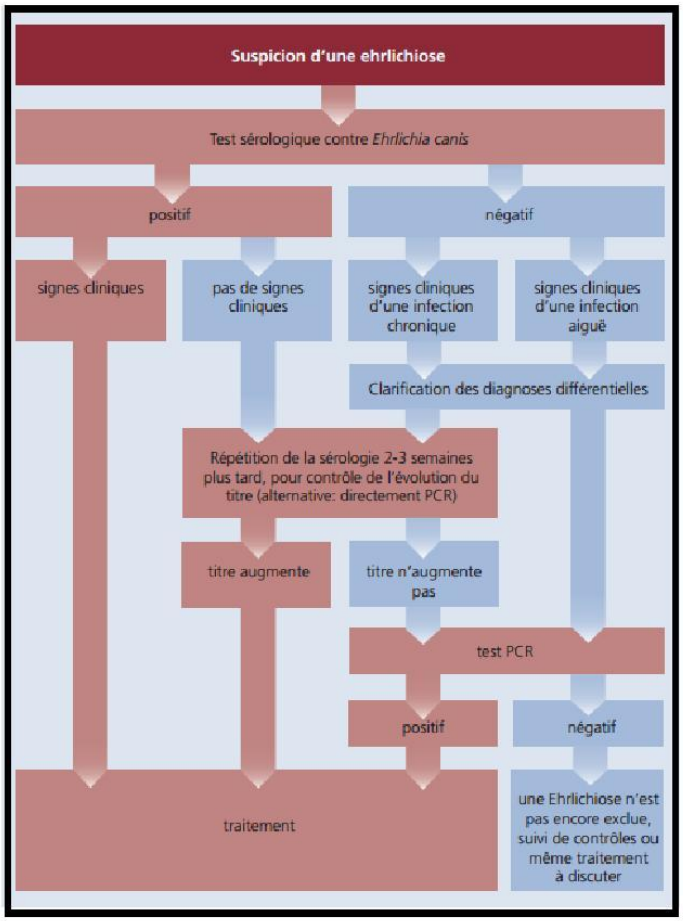

Figure 10 Diagnostic de l'ehrlichiose monocytaire canine

7) TRAITEMENT

Le traitement de l'ehrlichiose monocytaire canine repose sur l'utilisation d'agents anti-rickettsiens et d'une thérapeutique de soutien. Les tétracyclines sont les médicaments les plus couramment utilisés, la doxycycline une fois par jour à la dose de 2 x 5 mg/kg par jour pendant 3 semaines étant le protocole thérapeutique de référence Chez les chiens infectés par *E. canis*, la disparition de la thrombopénie constitue un bon indicateur d'une réponse favorable au traitement. Les cas d'ehrlichiose monocytaire canine chroniques sévères chez le chien sont de mauvais pronostic (Brouqui et Raoult, 1990).

8) PREVENTION

Actuellement, aucun moyen médical de prévention n'est disponible contre les infections dues à *E. canis* chez le chien. Ainsi, la principale méthode de prévention de ces infections est basée sur une protection active contre les tiques. Les voyages de chiens provenant de zones indemnes vers ou à travers les zones d'enzootie doivent être limites. Si ces voyages ne peuvent pas être évites, les chiens doivent être protégés contre l'infestation des tiques, avant leur départ (Stich et al., 2002).

Étude de l'espèce *Anaplasma phagocytophilum*

L'anaplasmose à *Anaplasma phagocytophilum* est une maladie vectorielle zoonotique et infectieuse évoluant sous forme aiguë ou inapparente et selon un tableau épidémiologique sporadique ou endémique. L'Anaplasmose canine à *Anaplasma* spp, est une maladie apparue à la deuxième moitié du XXème siècle, on regroupe sous le genre *Anaplasma* chez le chien, deux bactéries ayant un tropisme pour les cellules sanguines de l'hôte : *Anaplasma platys*, responsable de la thrombopénie infectieuse et *Anaplasma phagocytophilum*, cette dernière fera l'objet de notre étude.

1) TAXONOMIE

Anaplasma phagocytophilum a présenté plusieurs modifications taxonomiques dues au développement et à la découverte de nouvelles méthodes d'analyses qui ont abouties à la nomenclature actuelle.

En effet, de récentes améliorations dans les techniques moléculaires ont significativement fait avancer les capacités à mener les analyses génétiques. Pour la première fois on a clairement indiqué les propriétés et les positions phylogénétiques de la plupart des espèces bactériennes dans la famille des *Rickettsiales, Bartonellaceae* et *Anaplasmataceae* dans l'ordre des *Rickettsiales* (Woese et al., 1990 ; Weisburg et al., 1989 ; Bremer et al., 1990).

L'analyse des séquences des gènes *gltA* (codant pour la citrate synthétase), effectuée par Inokuma et ses collaborateurs, montre cependant que *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* et l'agent de l'ehrlichiose granulocytique humaine pourraient constituer un groupe proche mais différent du genre *Anaplasma*. De plus, ces auteurs rappellent que les *Anaplasma* sp. Infectent les globules rouges alors que *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* et l'agent de

l'EGH infectent principalement les granulocytes. Inokuma et son équipe estiment que ces différences génétiques et biologiques pourraient justifier la création d'un nouveau genre destiné à accueillir *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* et l'agent de l'ehrlichiose granulocytique humaine. Les articles de Dumler et al. et de Inokuma et al. ont été publiés de manière pratiquement simultanée (respectivement novembre 2001 et septembre 2001) si bien que les résultats de Inokuma et ses collaborateurs n'ont pu être pris en compte par Dumler et ses collaborateurs (Dumler et al., 2001 ; Inokuma et al., 2001).

Inokuma et ses collaborateurs ne font aucune proposition formelle concernant la nomenclature, mais il n'est pas impossible que dans l'avenir de nouveaux changements soient proposés.

Les ARNr 16S des souches d'*Anaplasma phagocytophilum* présentent de légères différences de séquences (environ 5 pb) et leurs caractères biologiques, notamment leur spectre d'hôtes, leur pouvoir pathogène et leur répartition géographique, ne sont pas identiques. Aussi, Dumler et ses collaborateurs proposent de reconnaître l'existence de variant au sein de cette espèce : un variant correspondant à l'espèce préalablement connue sous le nom de *Ehrlichia phagocytophila*, un variant correspondant à l'espèce préalablement dénommée *Ehrlichia equi* et un variant correspondant à l'agent EGH. Pour des raisons pratiques, dans la suite du texte, nous désignerons ces variants de la manière suivante : *Anaplasma phagocytophilum* biovar Phagocytophilum, *Anaplasma phagocytophilum* biovar Equi et *Anaplasma phagocytophilum* biovar EGH (Figure 1).

2) MORPHOLOGIE

Les souches de *Anaplasma phagocytophilum* se présentent sous la forme de bactéries à Gram négatif, de petite taille, souvent polymorphes (forme coccoïde ou ellipsoïdale), infectant les cellules de la lignée myéloblastique des mammifères, notamment les granulocytes neutrophiles et, dans une moindre mesure, les granulocytes éosinophiles. Les études de microscopie électronique révèlent l'existence de deux formes morphologiques au sein des morulas, des corps élémentaires ou corps initiaux denses et des corps réticulés. Les corps réticulés ont un diamètre pouvant atteindre 2 µm. Les morulas ne sont pas en contact avec les

mitochondries et elles ont généralement un diamètre compris entre 1,5 et 2,5 µm mais pouvant parfois atteindre 6 µm (Figure 11).

Des communautés antigéniques sont mises en évidence avec *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* et *Ehrlichia ruminantium*. La protéine majeure de membrane externe a un poids moléculaire compris entre 42 kDa et 49 kDa et sa séquence est comparable à celle des protéines homologues présentes chez *Anaplasma marginale*, *Ehrlichia ruminantium*, *E. canis*, *E.chaffeensis* et *Wolbachiapipientis*. La taille du génome est d'environ 1494 kb (*Anaplasma phagocytophilum* biovar EGH) et le G + C % est estimé à 41 kDa.

Anaplasma phagocytophilum se cultive *in vitro* dans les cellules IDE8 = ATCC CRL 11973 (cellules embryonnaires de *Ixodes scapularis*) ainsi que dans les cellules de la lignée HL-60 (lignée de promyélocytes leucémiques d'origine humaine) non différenciées ou différenciées en granulocytes neutrophiles.

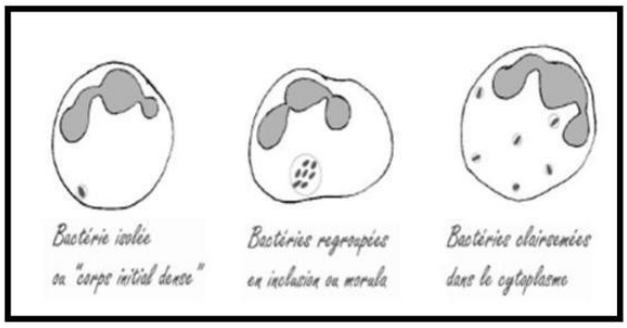

Figure 11 Morphologie d'*A. phagocytophilum* à l'intérieur des granulocytes infectés. (Chimier, 2006)

3) EPIDEMIOLOGIE

a) Répartition géographique

La prévalence d'*A. phagocytophilum* chez le chien a été étudiée dans différentes régions du monde à l'exception de l'hémisphère sud. La séroprévalence dépend de l'état de santé des chiens échantillonnés et de leur éventuelle exposition à des tiques. La séroprévalence d'*A. phagocytophilum* chez des chiens en provenance d'Amérique du nord et d'Europe est élevée et peut atteindre 50% et 55 % respectivement (Barutzki et al., 2006 ; Beall et al., 2008). Dans une étude réalisée en Suisse, 996 échantillons de sérum ont été prélevés chez des chiens entre mars 1991 et mars 1998, ainsi 7,5% étaient séropositifs pour *A. phagocytophilum* (Pusterla et al., 1998). Une étude de séroprévalence a été conduite en Tunisie : sur les 286 chiens testés par immunofluorescence indirecte, 25% se sont révélés séropositif pour *A. phagocytophilum* (M'ghirbi et al., 2009).

Les facteurs de risques liés à l'infection par *A. phagocytophilum* chez le chien incluent les variations saisonnières et la coïnfection avec d'autres pathogènes vectorisés. Ainsi, la saisonnalité dépend de celle du vecteur dans la région concernée et du climat qui y règne. Aux États- Unis, les cas d'infection par *A. phagocytophilum* apparaissent entre le mois d'avril et de juillet et plus rarement en octobre (Poitout et al., 2005). À Berlin, 17 parmi les 18 cas rapportés d'AGC ont été observés entre les mois d'avril et de septembre (Kohn et al., 2008). Ainsi la distribution saisonnière de la maladie est très probablement liée à la période d'activité des tiques.

b) Réservoirs

La musaraigne commune (*Sorex araneus*) qui est l'hôte de prédilection d'*I. trianguliceps* pourrait représenter un hôte réservoir important bien que négligé jusqu'à présent. Une étude britannique montre en effet que 18,7 % d'entre elles sont infectées par *Anaplasma phagocytophilum* et 30,3 % par *Babesia microti* alors que le campagnol agreste (*Microtus agrestis*) n'est infecté qu'à 6,4 % par *A. phagocytophilum* et à 30,4 % par *Babesia microti*. Les 2 espèces sont parasitées à la fois par *Ixodes ricinus* et *I. trianguliceps*, mais les

musaraignes portent 6 fois plus de larves d'*I. trianguliceps* et 2 fois plus de larves d'I. *ricinus* et globalement 2 fois plus de nymphes des 2 espèces. Ce qui suggère que la musaraigne pourrait constituer un excellent réservoir de maladies à tiques qu'il serait judicieux d'étudier (Bown et al., 2011).

Dans le même ordre d'idée, Keesing a publié une étude concernant la capacité de 14 espèces d'hôtes vertébrés réservoirs potentielles (10 mammifères et 4 oiseaux) à transmettre *A. phagocytophilum* à des *I. scapularis* non infectés. Son travail montre que la souris à pattes blanches est bien le réservoir principal, mais que d'autres espèces possèdent la même compétence et contribuent à ce titre à majorer le risque pour l'homme (Keesing et al., 2012).

Contrairement à ce qui a été observé en Tchéquie, Slovénie et au Japon, Michalik et ses collaborateurs rapportent une prévalence d'*A. phagocytophilum* à 12 % chez les sangliers en Pologne. Les séquences identifiées sont identiques à celles trouvées chez l'homme et *I. ricinus*, ce qui signifie que le sanglier pourrait, au moins dans certaines régions, être le réservoir naturel de la bactérie (De la Fuente et al., 2012).

c) Transmission d'*Anaplasma phagocytophilum*

L'examen de tiques européennes confirme qu'elles sont bien porteuses d'*Anaplasma*. En mars 1998, le Centre National de Référence des Rickettsioses a isolé l'ADN de l'agent de l'EGH chez *Ixodes ricinus* collecté en France. En 1999, Schouls détecte l'ADN de différentes espèces d'*Anaplasmataceae* dans 45 % des tiques prélevées sur des cervidés hollandais. *A. phagocytophylum* a été également retrouvé en Suisse chez les *Ixodes ricinus*, ainsi que chez 136 des 220 hérissons testés (Erinaceus europaeus) et 413 des 563 *I. ricinus* et 90 des 338 *I. hexagonus* qui les parasitaient (rtPCR) (Silaghi et al., 2012).

Une étude menée de mai à septembre 2006 en Bavière, portant sur 2862 tiques examinées par PCR, montre une prévalence moyenne d'*A. phagocytophilum* de 2,9%. En outre, la prévalence de la bactérie est deux fois plus importante chez les tiques capturées dans 3 des jardins publics de la ville de Munich. Le réservoir animal de la bactérie y diffère

notamment par la présence abondante de chiens. L'ADN d'*A. phagocytophilum*, d'*Ehrlichia sp*, de *Wolbachia sp* ainsi que d'une *Rickettsia* proche de *R. heilongjiangensis* a été trouvé parmi des tiques collectées en Meuse. Toutefois il n'est toujours pas possible de préciser si les agents américain et européen sont identiques ou très voisins (Silaghi *et al.,* 2008).

Selon une étude espagnole, il semblerait que l'abondance des bovins augmente la prévalence de *B. burgdorferi sensu lato*, et *A. phagocytophilum* chez les nymphes d'*I. ricinus* là où ils cohabitent avec les ongulés sauvages, toutefois l'accroissement de la population des bovins n'augmente que le risque d'anaplasmose pour les hôtes sauvages alors qu'elle le réduit pour la borréliose de Lyme (Ruiz-Fons et al., 2012).

D'autres espèces de tiques entretiennent probablement aussi des cycles sauvages tiques-rongeurs de la maladie. Au Portugal, l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été retrouvé chez *Ixodes ventalloi,* sans que la compétence de cette tique n'ait encore pu être démontrée. Plusieurs études des rongeurs forestiers britanniques suggèrent par contre qu'*Ixodes trianguliceps* pourrait être un vecteur compétent ; il semble même capable à lui seul d'entretenir le cycle sauvage de l'anaplasmose. Tout comme les stades préimaginales d'*I. ricinus*, *I. trianguliceps* parasite *Microtus agrestis*, le rongeur considéré comme le réservoir le plus probable d'*A. phagocytophilum*. La coexistence des 2 parasites sur le même hôte contribue sans doute largement à contaminer *I. ricinus* et à le transformer en vecteur secondaire, transmettant la bactérie aux animaux domestiques et à l'homme (Bown et al.,2006).

d) Cycle biologique chez la tique

La famille des *Anaplasmataceae*, comme celle des *Rickettsiaceae* appartient à l'ordre des *Rickettsiales* (sous-division alpha de la classe des *Proteobacteria*). Ces bactéries sont de petits cocci dont la paroi est proche de celle des bacilles Gram-négatif. Ce sont des parasites intra-cellulaires obligatoires, nécessitant l'ATP d'une cellule hôte afin de faire fonctionner leur métabolisme. Elles ont évolué en étroite association avec les tiques, puces, arthropodes et les douves des poissons.

A. phagocytophilum se multiplie chez les tiques, notamment au moment des mues et des périodes d'engorgement. Contrairement à d'autres *Rickettsiales* qui se maintiennent par transmission verticale, le maintien d'*A. phagocytophilum* dans la nature impose une transmission horizontale grâce au cycle animal-vecteur (absence de transmission transovarienne) (Levin et al., 1999) (Figure 12).

À défaut de constituer un réservoir de germes, les tiques jouent un important rôle d'amplification en permettant la multiplication des bactéries. La transmission de la bactérie nécessite que la tique reste fixée au moins 24 heures, elle est d'autant plus importante que la durée d'attachement est prolongée. Ce délai de transmission relativement bref s'explique par le fait que *A. phagocytophilum* se localise essentiellement dans les glandes salivaires de la tique (Nicholson et al., 2010).

Les tiques ont développé différents moyens pour survivre à des conditions difficiles de dessiccation et de froid. Elles ont notamment développé des protéines réduisant la croissance des cristaux de glace en formation (antifreeze glycoproteins : AFGPs) (Doucet, 2009). Il vient d'ailleurs d'être montré qu'*A. phagocytophilum* optimisait ses chances de survie en stimulant les gènes induisant l'expression de ces fameuses AFGPs qui protègent son hôte (Neelakanta et al., 2010).

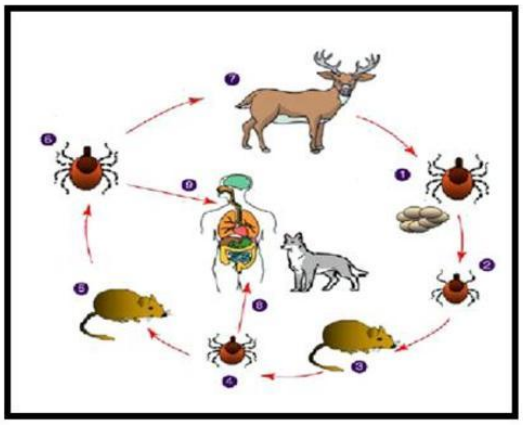

Figure 12 Cycle de transmission d'*A. phagocytophilum* (Nicholson et al., 2010).

4) EXPRESSIONS CLINIQUES

a) Symptômes

En pratique, il est toujours difficile de déterminer avec certitude la durée d'incubation de l'Anaplasmose Granulocytaire Canine (AGC). La durée est alors variable en fonction d'une inoculation naturelle ou expérimentale et dépendrait de la dose infectante. Elle est de 5 jours chez un chien infecté par transfusion de sang contaminé et de 12 jours chez des souris inoculées expérimentalement. Par ailleurs, il a été constaté que la durée d'incubation était de 18 jours lors d'une infection véhiculée par la tique adulte mais de 8 jours par la nymphe (Ewing et al.,1997).

Une étude expérimentale réalisée chez des agneaux a montré que la période d'incubation était significativement plus courte si la quantité de l'agent pathogène inoculée était plus importante. Ainsi, cette étude confirme que la durée d'incubation est étroitement liée à la dose inoculée (Stuen et Artursson ,2000).

L'infection à l'AGC échappe généralement au clinicien. En effet, le chien présente peu ou pas de symptômes. Lorsqu'ils existent, ils ne sont pas spécifiques et rendent le diagnostic difficile (Beall., et al.,2008 ; Kohn et al., 2008).

La séropositivité chez de nombreux chiens en bonne santé indique que l'infection peut être transitoire et sans signes cliniques. L'infection peut persister chez les animaux inoculés expérimentalement pendant des mois, mais elle est inconnue chez des animaux infectés naturellement et présentant des signes cliniques (Engvall et al., 2002).

Certaines études ont toutefois décrit des signes cliniques chez des chiens séropositifs à l'AGC. Dans une étude en Allemagne des chiens séropositifs à *A. phagocytophilum* et ne

présentant aucun signe de d'autres affections furent sélectionné. Par ailleurs, les chiens infectés par des agents infectieux divers ou ayant été soumis à des inoculations expérimentales ont été exclus de l'étude (Kohn et al., 2008). Ainsi, les auteurs ont décrit la présence d'une fièvre chez la totalité des chiens étudiés, une déshydratation chez 37%, une pâleur des muqueuses chez 12%, un amaigrissement chez 25%, enfin des boiteries et des difficultés à se mouvoir avec une palpation douloureuse au niveau du grasset droit chez 62% des cas étudiés (Poitout et al., 2005). Par ailleurs, Greig et ses collaborateurs ont également observé une splénomégalie, une hépatomégalie, une adénopathie, des convulsions et un déficit proprioceptif ainsi qu'une cardiomyopathie sévère (Greig et al.,1996).

D'autres symptômes pour le moins atypiques ont été noté en 2011 par Eberts et ses collaborateurs. Dans un effectif de 18 chiens, ils observèrent de l'épistaxis (Figure 14) et des vomissements ainsi qu'un accès paroxystique d'une durée de 3 jours pouvant persister jusqu'à 14 jours. La température oscillait entre 39.4 à 40,88 et plus de la moitié des chiens présentaient de l'arthrite et une lymphodénopathie. D'autres signes plus atypiques ont été également relevés et il s'agissait principalement d'un dysfonctionnement cérébral se traduisant par une incoordination motrice avec mouvement circulatoire orienté vers la gauche et enfin d'une gastrite aigue une hypertrophie utérine ainsi qu'un saignement chez la femelle (Eberts et al.,2011).

Il n'a pas été décrit des cas de mortalité contrairement à l'AGH humaine où une infection avérée chez des sujets âgés pourrait être mortelle. L'euthanasie est rare mais parfois proposée, même lorsqu'un traitement a été entrepris (Tozon et al., 2003 ; Bexfield et al., 2005). Dans la majorité des cas, quand le traitement est entrepris, il conduit à une amélioration rapide de l'état de l'animal, en deux à trois jours. L'existence d'un portage chronique asymptomatique a été prouvée uniquement expérimentalement, mais les cas de rechutes sont rares, la possibilité de réinfection existerait pour les chiens vivant dans des zones endémiques. (Greig et Armstrong, 2006). En l'absence de traitement, l'infection à *A. phagocytophilum* peut persister jusqu'à 5 mois et demi après l'inoculation (Egenvall et al, 2000)

b) Signes biologiques

Hémogrammes

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

Modifications biochimiques

Parmi les paramètres biochimiques, on note une tendance à l'hypoalbuminémie, une hyperglobulinémie et une élévation modérée des enzymes hépatiques (phosphatases alcalines principalement (Greig et al., 1996).

Figure 13 Épistaxis chez un chien atteint d'Anaplasmose granulocytaire canine (Little et al., 2010).

Histologie

Lepidi et ses collaborateurs, ont décrit des dommages tissulaires modérés tels qu'une destruction des follicules lymphoïdes au niveau de la rate ainsi qu'une accumulation d'agrégats de petits macrophage et enfin une apoptose au niveau hépatique ainsi que pulmonaire, ces deux lésions sont caractéristiques d'une atteinte par *A. phagocytophilum* (Lepidi et al., 2000). Parfois, d'autres organes comme les reins ou le cœur peuvent également présentés des lésions similaires. Par ailleurs, d'autres auteurs ont décrit une hyperplasie splénique et une hépatite mononucléaire non spécifique actives (Greig et al., 1996)

5) PATHOGENIE ET REPONSE IMMUNITAIRE

A. phgocytophilum est une bactérie intra cytoplasmique stricte qui se multiplie à l'intérieur des granulocytes de l'hôte infecté (Dumler et al.,2001 ; Mayer-Scholl et al.,2004).

Le principal mode de transmission est la morsure de tique qui a pour conséquence l'apparition du pathogène dans les tissus périphériques ou après l'afflux des granulocytes neutrophiles aux sites de morsure, la bactérie va utiliser ces granulocytes pour sa dissémination. Toutefois d'après Woldehiwet, les neutrophiles ne sont infectés qu'une fois arrivé dans le sang circulant et donc les premières étapes de la pathogenèse d'*A. phgocytophilum* restent à ce jour non élucidées et ce quel que soit l'hôte mammifères infectés (Woldehiwet et al.,2002) et plus particulièrement lors de la phase d'incubation qui apparait aux 4^{e} et 7^{e} jour post-inoculation. De plus, on note une bactériémie tout en ignorant la localisation exacte de la bactérie. Cependant des études démontrent que la bactérie peut être détectée dans les poumons durant cette phase (Snodgrass, 1974 ; Walker et Dumler, 1996).

D'autres études suggèrent que des variant d'*A. phgocytophilum* responsables de l'anaplasmose granulocytaire humaine sont susceptibles d'infecter les précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse avant les neutrophiles matures (Munderloh et al., 2004*)*. En revanche, chez les ovins on n'observe aucun signe d'infection des neutrophiles immatures (Woldehiwet et Scott, 1982), ce qui illustre la nécessité de mieux comprendre ce phénomène chez cette espèce animale.

Cines et ses collaborateurs (1998) ont démontré qu'*A. phagocytophilum* infecterait facilement les cellules endothéliales, ces mêmes cellules pourraient jouer un rôle non négligeable dans la pathogenèse, d'une façon directe en tant que cellules hôtes ou de façon indirecte en tant que cellules présentatrices de l'antigène et ainsi influer sur le processus inflammatoire en contrôlant la perméabilité vasculaire, le passage des leucocytes et la production des médiateurs de l'inflammation (Cines et al., 1998).

A. phagocytophilum pénètre dans la cellule infectée et se réplique dans un autophagosome like dépourvu de marqueurs endosomiales ou lysosomiales. (Webster et al., 1998 ; Mott et al., 1999).

En ralentissant les mécanismes d'apoptose induits et spontanés des neutrophiles, A. *phagocytophilum* prolonge sa durée de multiplication (24 h après l'infection). Ainsi en induisant le retard de l'apoptose on aura non seulement une sorte de niche, évitant au pathogène les actions du système immunitaire mais aussi une persistance et une augmentation du nombre des neutrophiles infectés dans le sang qui seront susceptible d'être transportés vers un autre hôte par d'autres arthropodes hématophages.

A. phagocytophilum a développé une capacité remarquable à contourner l'interdit et tromper les neutrophiles et leurs mécanismes immunitaires innés. La bactérie atténue ou inhibe activement un certain nombre de réponses immunitaires innées des cellules hôtes de mammifères. Pour cela, elle inhibe la fusion phagosomes-lysosome comme cité précédemment et limite les attaques oxydatives (Gokce et al., 1999 ; Ohashi et al., 2002 ; Choi et Dumler, 2003). De plus elle, remodèle le cytoplasme de la cellule hôte et libère de

l'espace pour sa croissance et augmente son apport en nutriments, se créant ainsi un havre de paix dans la cellule hôte (Rikihisa, 2011) (Figure 14).

Il semblerait également que la protéine p44 possède un rôle majeur dans l'adhésion ainsi que dans l'induction de la libération des cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL10 et l'INF δ) ce qui suggère que cette protéine contribue fortement à la pathogenèse de l'anaplasmose granulocytaire canine.

D'autre part, la pérennisation d'*A. phagocytophilum* est associée aux propriétés de sa protéine de virulence AptA (*A. phagocytophilum* toxin A) qui active la protéine kinase des mammifères Erk1/2. Cette activation agit sur la protéine de filament intermédiaire de type III, la vimentine, en provoquant sa réorganisation autour des inclusions bactériennes. Cette modification prolonge la survie intracellulaire des bactéries (Sukumaran et al., 2011).

Par ailleurs, *A. phagocytophilum* possède des gènes codant des systèmes de sécrétions de type IV qui permet l'infection des cellules hôtes. En effet, la protéine AnkA (ankyrin-repeat-rich protein A) semble être un effecteur sécrété dans le cytoplasme de la cellule cible, elle y activerait la voie de signalisation cellulaire AbI-1 et stimulerait l'activité de l'AbI-1kinase (Rennoll-Bankert et Dumler, 2012).

En plus des neutrophiles, *A. phagocytophilum* peut infecter d'autres cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques, entrainant ainsi une cytopénie (Klein et al., 1997).

La plupart des souches d'*A. phagocytophilum* ne semblent pas infecter ou interagir directement avec les plaquettes médiées par les anticorps. (Bexfield et al.,2005 ; Borjesson et al., 2005), En effet, l'anémie-hémolytique et la thrombopénie peuvent être expliquées par un phénomène de séquestration dans la rate (Borjesson et al., 2001). Ce processus infectieux est une source antigénique pour la formation de complexes immuns. Ainsi, l'antigène ou les complexes immuns circulants sont déposés sur la membrane synoviale, ce qui entraine une

inflammation. Cette dernière est donc le résultat d'une réaction d'hypersensibilité de type III associée à une polyarthrite à médiation immunitaire (Bennet et May, 1995).

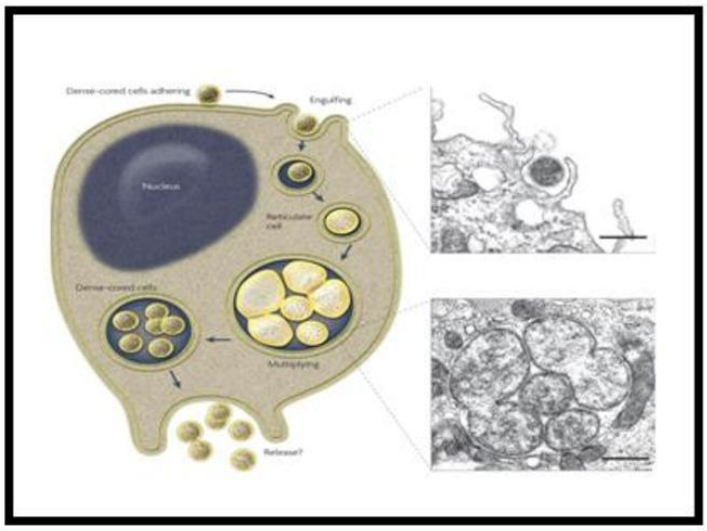

Figure 14 Cycle de multiplication d'*A. phagocytophilum* dans un neutrophile (Zhang, 2007).

Le mécanisme permettant à la bactérie de sortir des glandes salivaires de la tique pour infecter l'hôte est peu connu. De nombreux facteurs sont impliqués dans l'efficacité de la transmission de la bactérie à l'hôte. La réussite de la transmission de la tique infectée à un hôte sain nécessite une quantité de bactéries minimale. Des études expérimentales réalisées sur le mouton montrent qu'une quantité minimale de 4,3 cellules hôtes infectées est nécessaire pour avoir une infection (Stuen et Artursson, 2000).

En plus de ce seuil, d'autres facteurs associés aux défenses immunitaires de l'hôte sont impliqués dans l'efficacité de la transmission de la tique à l'hôte vertébré. En effet, les mammifères acquièrent une résistance aux tiques qui augmente avec la fréquence de morsures. Ainsi les moutons les plus jeunes sont plus sensibles aux tiques, la transmission d'*A. phagocytophilum* est donc plus efficace (Ogden et al, 2002). De plus, les hôtes infectés par *A. phagocytophilum* développent des anticorps contre la bactérie et sont partiellement protégés des réinfections. La diversité antigénique des souches permet la réinfection des hôtes malgré la présence d'anticorps.

Comme dans la tique, *A. phagocytophilum* s'adapte aux cellules hôtes pour survivre et se propager. Dans un premier temps, elle recrute les granulocytes en augmentant la transcription des IL-8 (Akkoyunlu et al., 2001), puis elle détourne le système immunitaire en diminuant la production d'anion superoxide, la fusion des lysosomes, l'autophagie et les signaux IFN-γ, qui permettent aux neutrophiles d'éliminer les bactéries intracellulaires (Woldehiwet, 2008). D'autre part, *A. phagocytophilum* augmente sa survie en retardant les mécanismes de l'apoptose (Yoshiie et al., 2000).

Le génome d'*A. phagocytophilum* est composé de nombreux gènes impliqués dans les interactions avec les cellules hôtes. Il possède plus de 110 gènes codants des protéines majeures de surface permettant de reconnaître et d'adhérer aux cellules cibles, et de bloquer l'action des anticorps produits par l'hôte (Rikihisa, 2010).

Parmi ces gènes il y a les gènes msp2/p44 dont l'expression évolue rapidement pour limiter la reconnaissance de la bactérie par les anticorps de l'hôte. Les études in vitro ont permis d'évaluer le taux d'évolution du site d'expression de msp2 entre 1 et 2% par semaine chez la souris (Rikihisa, 2010).

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

6) DIAGNOSTIC

Le diagnostic des infections dues aux bactéries *Anaplasmataceae* chez le chien repose sur le croisement de données concernant la probabilité d'exposition aux tiques, l'observation de signes cliniques compatibles et les résultats d'analyses de laboratoire (hématologie, biochimie, sérologie et/ou PCR). Un résultat de sérologie et/ou PCR positif doit toujours être interprété avec précaution car d'autres agents pathogènes peuvent également être présents.

Les tiques peuvent en effet être porteuses et donc transmettre à leurs hôtes plusieurs agents pathogènes simultanément.

Les éléments du diagnostic (tant clinique que biologique) associés à une infection par un agent unique peuvent être significativement différents de ceux retrouvés lors d'infections multiples. En particulier, des maladies comme la borréliose de Lyme et l'anaplasmose granulocytaire font appel au même vecteur et ont des signes cliniques similaires qui peuvent conduire à une erreur diagnostique de l'un au profit de l'autre et inversement lors de coïnfection (Stafford et al.,1999 ; Andelson et al.,2004).

a) Clinique

Il est difficile du fait des manifestations variables de l'anaplasmose granulocytaire canine, les symptômes ne sont guère spécifiques. Néanmoins, cette pathologie devrait être envisagée dès qu'un chien est présenté en consultation pour un syndrome fébrile avec une exposition antérieure à des tiques et/ou lors d'une saison à forte activité de tiques, ces éléments bien qu'en apparence peu déterminant, seraient la clé d'un diagnostic épidémio-clinique qui pousserait le clinicien à faire des examens plus poussés.

Ces données épidémiologiques seraient appuyées lors de l'examen clinique par une hyperthermie (>40°), un abattement, de l'inappétence voire de l'anorexie et des signes de myalgie qui s'exprimeraient par une appréhension aux déplacements en raison des boiteries et une adénopathie modérée. Plus rarement une toux sèche non productive ainsi qu'une polydipsie, des troubles digestifs (vomissements, hépatomégalie, splénomégalie) et un dysfonctionnement nerveux peuvent être des éléments indicateurs (Chabane 2009).

b) Examen cytologique et culture

Le diagnostic peut être établi lors d'un examen direct d'un frottis sanguin par l'observation des morulas dans les lymphocytes, monocytes, granulocytes ou plaquettes. La sensibilité de l'examen direct peut être améliorée en effectuant un concentré leucocytaire ou

un frottis sur sang capillaire. Les morulas peuvent également être observées sur des ponctions de nœuds lymphatiques ou de rate. La détection des morulas reste une méthode relativement difficile et chronophage qui doit être réalisée par un personnel expérimenté.

Lors d'une inoculation expérimentale chez un chien, on a observé au 4^{e} jours PI, des inclusions intra cytoplasmique dans des granulocytes du sang périphérique avec une persistance de 4-8 jours (Egenvall et al.,1998) (Figure 15).

La sensibilité de cette technique est minime en raison de la faible proportion de cellules parasitées et du caractère fugace de la bactériémie bien qu'une présence de morula dans le sang particulièrement dans une région endémique serait évocatrice d'une maladie vectorielle. La présence de morula n'est décelable qu'au stade aigue de l'infection. En effet, le pourcentage de granulocytes neutrophiles contenant des inclusions intracytoplasmiques lors d'une infection aiguë chez le chien varie de 7 à 32% (Poitout et al.,2005). Toutefois, Egenvall et al., 2000 ont décrit une détection plus aisée de morula après une corticothérapie.

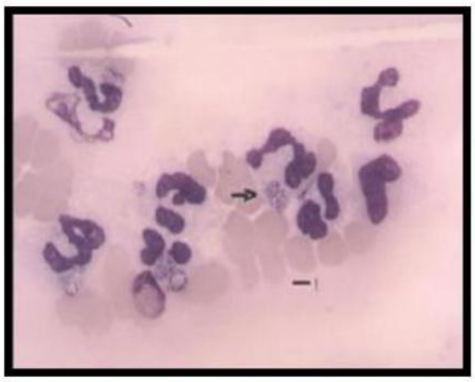

Figure 15 Morula d'*Anaplasma phagocytophilum* (Lester et al., 2005).

A. phagocytophilum est une bactérie intracellulaire stricte dont la culture et l'isolement sont difficiles, car ils ne se font pas sur milieux inertes tels que les milieux gélosés. Elle se cultive sur des cellules leucocytaires humaines HL-60 : human promyelocytic leukemia cell lines (HL-60) et sur des cellules de lignée de tique (Aguero-Rosenfeld et al.,2002) et sur des

cellules CML (Bayard et al. ,2004). Selon Bayard et ses collaborateurs, il a été décrit que la croissance d'*A.phagocytophilum* est meilleure sur les cellules CML en comparaison aux cellules HL-60, ceci suggère qu'*A. phagocytophilum* infecte préférentiellement les granulocytes matures.

Bien que la culture peut être le diagnostic le plus sensible pour la détection de l'infection aiguë chez l'homme, cette méthode n'est pas systématiquement utilisée chez les chiens pour des fins de diagnostiques et cela en raison des contraintes ainsi que des difficultés liées à la méthode (Bayard et al.,2004).

c) Bilan biochimique

En biochimie, on relèvera une tendance à l'hypoalbuminemie et une hyperproteinemie ainsi qu'une augmentation des enzymes hépatiques phosphatases alcalines. La moitié des chiens présentent une augmentation de l'activité de l'amylase (Bakken, et al.,1994). En hématologie, on observera une lymphopénie (Cockwill et al.,2009) et une forte thrombopénie, le taux des plaquettes serait de l'ordre de 51.000 / µl (Mazepa et al., 2010).

d) Diagnostic sérologique

Diverses techniques sérologiques ont été développées à des fins de diagnostic. En 1993, Corstvet et ses collaborateurs ont décrit un test immuno-enzymatique, utilisant des anticorps monoclonaux et capable de détecter des antigènes d'*A. phagocytophilum* dans le plasma de chevaux expérimentalement infectés (Corstvet et al., 1993).

Les anticorps spécifiques peuvent être également détectés par immunofluorescence indirecte, en utilisant des antigènes d'*A. phagocytophilum* ou moins fréquemment d'*A. platys*. La séroconversion est observée dans un délai de 1 à 4 semaines après l'inoculation. De plus, en zone d'enzootie, la séropositivité peut être le reflet d'une exposition ancienne et n'avoir aucun rapport avec une infection aiguë. Il est donc recommandé, dans ces cas, de répéter la

sérologie à une ou plusieurs semaines d'intervalle. Des réactions croisées peuvent être observées selon la zone géographique et les agents pathogènes prédominants dans la région.

Le titre d'anticorps contre *A. phagocytophilum* diminue en 6 à 9 mois après un traitement antibiotique approprié. Si le titre d'anticorps est suivi au cours du temps, les tests sérologiques doivent être réalisés par le même laboratoire pour autoriser une étude comparative. Les examens sérologiques font appel à une souche de l'un des trois biovars d'*A. phagocytophilum* cultivée sur des cellules HL-60. La nature de la souche à utiliser pour obtenir les meilleurs résultats reste à déterminer et elle pourrait varier en fonction de l'espèce animale testée.

Le diagnostic nécessite l'examen de 2 voire même de 3 sérums, l'un prélevé au tout début de la maladie, un deuxième prélevé 3 à 4 semaines plus tard et un troisième prélevé 6 à 8 semaines après l'apparition des premiers symptômes. Les tests les plus utilisés sont des tests d'immunofluorescence mais l'existence de communautés antigéniques entre *A. phagocytophilum, E. canis*, *E. chaffeensis* et *E. ruminantium* complique l'interprétation des résultats. (Breitshwardt et al., 1998 ; Poitout et al., 2005 ; Barutzki et al., 2006 ; Severo et al., 2012).

Chez le chien, les IgG sont décelables dès les 8 premiers jours suivant une primo infection et 2-5 jours après l'apparition des morulas. Ils peuvent persister pendant plusieurs mois (Egenvall et al., 2000). Chez l'homme, il a été décrit une persistance des anticorps pendant près de 3ans (Bakken, et al., 2008). Lors de forme aigue, les anticorps pourraient ne pas être détectés, un chien peut présenter des signes cliniques tout en étant séronégatif, cela s'explique par une sérologie réalisée précocement, c'est-à-dire avant que le chien n'a eu le temps de développer une réponse immunitaire. La séropositivité est le reflet d'une exposition initiale, il est donc utile de réaliser des dilutions en série des titres obtenus au 1/50 en IFI (Egenvall et al.,1997). Le clinicien est donc tenu d'établir son diagnostic tout en tenant compte de l'ensemble des données épidémiologiques tels qu'une exposition de l'animal aux tiques et des manifestations cliniques particulièrement, s'il n'a pas accès aux méthodes de biologie moléculaire.

D'autres méthodes sérologiques ont été développées telles que les techniques immuno-enzymatiques (ELISA). En utilisant un antigène recombinant p44, cette technique est adaptée pour tester le sérum des chiens mais aussi des chevaux (Magnarelli et al., 2001). Des réactions croisées entre les différentes espèces d'*Anaplasma* peuvent survenir. En effet l'utilisation des anticorps monoclonaux (Msp5) a montré d'importantes réactions croisées entre *A. phagocytophilum et A. marginale* au test ELISA, mais aucune réaction croisée n'est détectée lors de l'utilisation d'un test ELISA compétitif (Strik et al., 2007). Par ailleurs, les chiens positifs à *A. platys* ont montré une positivité sérologique à *A. phagocytophilum* en utilisant le test recombinant MSP2 (Bowman et al., 2009).

Des techniques immuno-enzymatiques, utilisant comme antigènes des protéines de surface obtenues par recombinaison, sont en cours d'évaluation et semblent donner des résultats prometteurs notamment pour différencier les infections à *A. phagocytophilum* à celles *d'E. canis* (Severo et al., 2012).

Par ailleurs, des kits de détection développés par IDEXX sont mis à la disposition des praticiens (Figure 16). Ils utilisent une protéine recombinante Msp2/p44 pour la détection d'anticorps contre *A. phagocytophilum*. Néanmoins des résultats positifs en utilisant ce test ne responsabiliserait pas catégoriquement *A. phagocytophilum* et comme pour le test IFI, des résultats négatifs peuvent survenir chez des chiens présentant une maladie aiguë. (Chabanne, 2009).

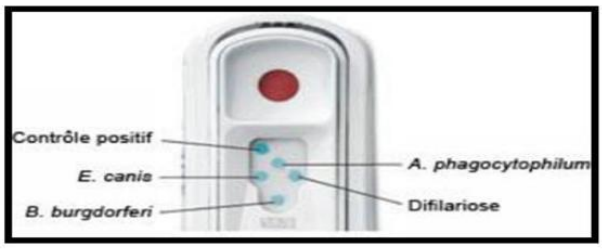

Figure 16 Les cinq spots permettant l'interprétation du SNAP® test 4Dx® (IDEXX Laboratoires, 2012).

Une étude comparative a été menée par Egenvall et ses collaborateurs (1996) a permis de comparer l'efficacité des différentes méthodes à savoir l'IFI, la PCR (ARN 16s) et l'étude cytologique des frottis. Ainsi, 73% des chiens séropositifs avaient une PCR et une cytologie positive alors que 94% des chiens positifs en cytologie avaient une PCR positive. L'utilisation de multiples méthodes de diagnostic d'AGC est nécessaire pour confirmer avec certitude le diagnostic de l'anaplasmose granulocytaire canine.

e) Diagnostic moléculaire (PCR)

Les techniques de biologie moléculaire rendent le diagnostic plus précis car ils nous offrent l'avantage de différencier d'une manière très précise les maladies infectieuses qui présentent les mêmes manifestations cliniques et hématologiques (Beall., et al, 2008).

La détection d'ADN d'*A. phagocytophilum* par PCR est réalisée dans les laboratoires spécialisés. Un résultat PCR positif permet de confirmer, avec quasi-certitude, une infection. A l'inverse, un résultat PCR négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection. En effet, un résultat peut être négatif si l'échantillon testé n'est pas prélevé dans un organe infecté. La localisation des bactéries peut être réduite à certains compartiments de l'organisme et un résultat peut également apparaître négatif si la PCR est réalisée à un moment où la charge bactérienne est en forte décroissance, par exemple après le début d'un traitement. (Egenvall et al.,1998 ; Beall, et al.,2008 ; Granick, et al.,2009).

La majorité des tests PCR réalisés afin d'identifier *A. phagocytophilum* ciblent le gène ARN16S ou le gène de la protéine de surface externe msp2 (p44). Ce dernier est plus spécifique à *A. phagocytophilum* contrairement au gène ARN16s qui lui peut détecter d'autres espèces d'*Anaplasma* voir d'autres bactéries comme *Bartonella henselae* (Egenvall et al.,2000).

Drazenovich et ses collaborateurs (2006) ont décrit une nouvelle technique Taq-MAN PCR qui cible le gène MSP2. Cette dernière présente une grande sensibilité et spécificité pour différentes souches d'A. *phagocytophilum* (Drazenovich et al.,2006)

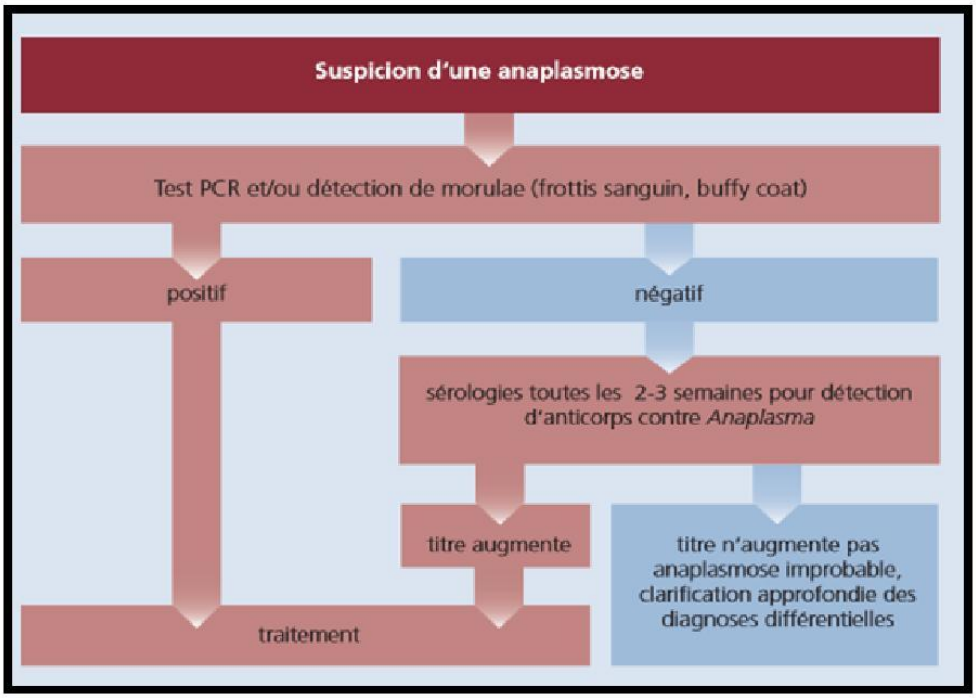

Figure 17 Diagnostic de l'anaplasmose granulocytaire canine

7) TRAITEMENT

Le traitement de l'anaplasmose granulocytaire repose sur l'utilisation d'agents anti-rickettsiens et d'une thérapeutique de soutien (Horowitz et al., 2001 ;Maurin et al.,2003). Ainsi, des études ont montré qu'une injection unique d'une forme à libération prolongée de doxycycline, protège complètement les souris contre les infections à *A. phagocytophilum* véhiculée par des tiques (Zeidner et al., 2004, Massung et al.,2005).

De plus, différents auteurs ont décrit une sensibilité à la doxycycline, la rifampicine, la levofloxacine, l'ofloxacine et la trovafloxacine (Klein et al.,1997 ; Horowitz et al.,2001 Cohn

et al.,2003 ; Poitout et al.,2005) et une absence de sensibilité aux macrolides (clarithromycine), à la pénicilline (amoxicilline), à la gentamicine, à la clindamycine et enfin aux triméthoprime sulfamides (Horowitz et al.,2001; Maurin et al.,2003; Branger et al.,2004).

Les tétracyclines restent la classe d'antibiotique de choix pour le traitement de l'anaplasmose granulocytaire canine et permettent un rétablissement spectaculaire pour les formes aiguës en 24 à 48 heures, dans la plupart des cas. Elles inhibent la synthèse des protéines au niveau ribosomial (Chopra et Roberts, 2001). Après traitement, le taux plaquettaire se normalise en une à deux semaines (Caron et Hernandez, 2011). La molécule employée par consensus est la doxycycline (5 à 10 mg/kg/j par voie orale) une à deux fois par jour pendant 2 semaines. La doxycycline possède en outre l'avantage d'être active contre *Borrelia burgdorferi*, l'agent de la maladie de Lyme, qui est fréquemment co-transmise avec l'anaplasmose granulocytaire entrainant des manifestations plus longue (Duffy et al.,1997 ; Stafford et al.,1999 ; Krause et al.,2002 ; Andelson et al.,2004) et demeure donc le traitement de choix. Cependant, dans certains cas on préconise la rifampicine (Klein et al.,1997 ; Horowitz et al., 2001) ou des quinolones (lévofloxacine) (Martin, 2004). Comme alternative pour les sujets jeunes, les femelles gestantes ou présentant une intolérance à la doxycyline.

Tableau 1 Traitement requis lors d'Anaplasmose granulocytaire canine.

Molecule	Dose (mg/kg)	administration	Interval administration	Durée traitement/jour
Tetracycline	22	PO	8	14-21
Doxycycline	5-10	PO(IV)	12-24	10-21
Minocycline	10	PO(IV)	12	10
Chloramphenicol	25-50	PO(IV,SC)	8	14-21

Légendes : IV : voie intraveineuse ; PO : voie orale ; SC : voie sous-cutanée ; Tableau : Traitement antibiotique de l'anaplasmose granulocytaire canine (d'après Diniz & Breitschwerdt., 2012).

8) PROPHYLAXIE

Aucun vaccin n'est disponible dans le commerce, du fait de la présence de régions hypervariables dans le génome d'*A. phagocytophilum*. Cette caractéristique confère à l'agent pathogène la possibilité d'avoir des protéines de surface changeantes et donc d'échapper au système immunitaire. Ainsi, il est très difficile d'envisager l'élaboration d'une vaccination. Cependant, la découverte de protéines de surface stables permet d'espérer l'élaboration d'un vaccin dans les années à venir comme cela a pu être possible pour *A. marginale* chez les bovins (De Andrade et al.,2004)

Actuellement, aucun moyen médical de prévention n'est disponible contre les infections dues à *A. phagocytophilum* chez le chien. La méthode principale de prévention de ces infections est basée sur une protection active contre les tiques. Grâce notamment à l'utilisation de molécules antiparasitaires. Les molécules les plus utilisées sur le terrain sont la deltaméthrine en collier (Scalibor®) suivie par le fipronil (Frontline®)(Drouffe, 2007). On peut également utiliser de l'imidaclopride associée à de la perméthrine (Advantix®) (Blagburn et al., 2004). De plus, il convient de faire attention au facteur de risque principal, à savoir la morsure de tique, surtout dans les périodes à forte activité de tiques (printemps et automne)

Une autre orientation serait l'élaboration d'un vaccin qui contrôlerait l'infestation des tiques ou qui empêcherait les tiques d'en être vecteur (De la fuente et al.,2006) à titre d'exemple *A.phagocytophilum* ne peut pas infecter les glandes salivaires des nymphes d'*I. Scapularis* en absence du gène de la 1.3-fucosyltransferase (Pedra et al .,2008).

En conclusion, l'éradication totale de la maladie semble difficilement envisageable, étant donné son réservoir qui est principalement constitué de bovins et d'animaux sauvages.

Étude de l'espèce *Borrelia burgdorferi sensu lato*

1) TAXONOMIE

Les spirochètes représentent phylogénétiquement un des 11 phylums des eubactéries (Woese, 1987). Les *Borrelia* appartiennent à la famille des *Spirochaetaceae*. Jusqu'à la découverte du spirochète responsable de la borréliose de Lyme, la nomenclature du genre *Borrelia* comprenait uniquement les agents des fièvres récurrentes.

Actuellement les *Borrelia* associées à la borréliose de Lyme appartiennent au complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato.* En effet, au sein de ce complexe il n'y a pas d'association stricte vecteur-*Borrelia.* Des études portant sur l'homologie d'ADN entre les souches ont montré l'existence de différentes espèces au sein de *B. burgdorferi* devenu *B. burgdorferi sensu lato* : *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garini* et *Borrelia afzelii* (Postic, 1990 ; Baranton, 1992); ces espèces sont reconnues comme pathogène pour l'homme (Van Dam et al., 1993 ; Wang et al.., 1999). Depuis, le nombre d'espèces identifiées en utilisant différentes approches moléculaires ne cesse de croître ce qui révèle la grande diversité génétique des *Borrelia* associées à la maladie de Lyme (Wang et al., 1999). Actuellement, on distingue 12 géno-espèces faisant parties du complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Aguero-Rosenfeld et al., 2005)

2) MORPHOLOGIE

Borrelia burgdorferi se présente sous forme d'une cellule hélicoïdale dont la longueur est comprise entre 10 et 20 µm et la largeur entre 0.18 et 0.25 µm. Modérément colorable par le Giemsa, cette bactérie est lentement mobile mais capable de rotation et de flexion entre lame et lamelle. Les *Borrelia*, sont caractérisées par une ultra structure très particulière, unique au sein des Eubactéries. Le corps bactérien est limité par une couche amorphe, et une membrane externe multi-lamellaire constituée de peptidoglycane. Les flagelles

(filaments ou fibrilles axiaux) sont aux nombre de 7 à 11 et localisés entre l'enveloppe externe et le corps bactérien.

L'isolement de cette bactérie est possible dans le milieu de Kelly modifié et à une température optimale de 33 à 35°C mais actuellement, le milieu couramment utilisé est le milieu BSK II qui permet d'atteindre une concentration de 1 à 4 x 10^8 bactéries /ml à partir de 1 à 2 spirochètes. La croissance y est de type micro-aérophile (4% d'O_2) avec un temps de génération variant de 6 à 12 heures (Barbour 1984 ; Barbour et Hayes, 1986).

Borrelia burgdorferi est le premier spirochète dont le génome a été entièrement séquencé. D'une taille d'environ 1,5 Mb, il est constitué d'un chromosome linéaire de 910.725 Pb avec un G+C de 28.6% et de 21 plasmides (9 circulaires et 12 linéaires) d'un poids global de 610.694 Pb. Ces plasmides se comportent comme de véritables mini-chromosomes et leur grand nombre permet un nombre important de recombinaisons (Fraser et al., 1997 ; Casjens et al., 2000). L'étude des plasmides a montré qu'ils portaient l'essentiel des gènes codant pour des protéines de surface. Le codage des gènes de *B. burgdorferi* n'est pas stable, il permet des recombinaisons et des réarrangements inter et intra plasmidiques. Certaines de ces recombinaisons entraînent des modifications au niveau des protéines de surface qui permettent à la bactérie d'échapper au système immunitaire de son hôte et de coloniser les tissus (Fikrig *et* al., 1998 ; Schwan et Piesman, 2000).

3) EPIDEMIOLOGIE

a) Répartition géographique

Figure 18 Distribution géographique de la borréliose de Lyme et de son vecteur

(Les étoiles indiquent des pays pour lesquels seuls de rares cas de borréliose de Lyme ont été rapportés)

La borréliose de Lyme est la maladie à transmission vectorielle la plus décrite dans l'hémisphère nord. Elle survient en Europe, en Amérique du Nord, en Asie ainsi que dans quelques pays du Maghreb (Figure 23), notamment l'Algérie ou toutefois *Ixodes ricinus* qui est le principal vecteur de *B. burgdorferi* est rarement rencontré (Azzag et al., 2015). En générale, sa répartition suit donc la distribution géographique de son vecteur, les régions humides et boisées (Figure 18). En effet, la séroprévalence de *B. burgdorferi* chez le chien dépend directement de l'aire de répartition des tiques du genre *Ixodes* mais aussi de leur densité. En effet, la répartition mondiale de la maladie de Lyme canine se superpose à celle du vecteur arthropode et concerne particulièrement les pays à climat tempéré. Aux États-Unis, la séroprévalence des chiens est estimée à 2% dans les régions non endémiques et atteint parfois les 100% dans les ragions endémiques (Rand *et al*., 1996 ; Littman, 2003). En Europe, de nombreux travaux visant à établir la séroprévalence de la maladie Lyme chez le chien ont été menés et cela dans différents pays tels que la Suède, l'Allemagne, Pays bas, Espagne et Belgique (Goossens *et* al., 2001 ; Skotarczak, 2002).

Par ailleurs, ces différentes études n'ont pas révélé de prédisposition ou de réceptivité liées à la race ou encore au sexe de l'animal, mais il est évident que la fréquence d'exposition aux morsures de tiques des chiens de chasse augmente leur risque de contracter la maladie de Lyme. Les chiens âgés de moins de cinq ans développent des formes plus graves au contraire des adultes qui s'immunisent par des contacts répétés au cours de leur vie (Levy, 2002). Une étude basée sur des techniques moléculaires et sérologiques a montré une faible incidence de la maladie de Lyme, chez des chiens de diverses origines (propriétaires et chiens errants). En effet, Azzag et ses collaborateurs ont décrit une prévalence de 5.2% ; 11/213 de chien séropositifs pour *B. burgdorferi s.l.*, des résultats comparables à d'autres études dans la région (Espagne) Amusategui et al., 2008).

D'autres parts, plusieurs études basées sur des critères sérologiques (IFI/ELISA) ont permis d'obtenir des prévalences. En IFI, 1.7 % parmi 579 chien ont été positifs en Alabama, USA (Wright et al., 1997), deux études en Espagne portant respectivement sur 649 et 466 chiens ont permis d'obtenir des séroprévalences dans l'ordre de 15% et 0.6% (Amusatequi et al., 2008 ; Solano-Gallego et al., 2006). En outre, dans une étude au moyen orient portant sur un effectif de 40 chiens, Baneth et ses collaborateurs (1998) ont obtenu une prévalence de 10%. Au Minnesota, Beal et ses collaborateurs (2008) ont révélé un taux de séroprévalence de 11% chez une population de 731 chiens, alors que dans une étude menée en Californie, en Oregon et à Washington le taux de prévalence était de 1.2% (Carrade et al., 2011). D'autre part, au Pays bas, Goossens et ses collaborateurs (2001) ont obtenu un taux de prévalence de 18% dans une étude qui a regroupée 445 chiens. D'autres études reposant sur des tests de détections rapides (IDEXX) menés dans différentes régions du monde ont obtenus des résultats similaires. En effet, Rand et ses collaborateurs ont obtenu 12.7% de prévalence sur une population de 1087 chiens, dans le Maine, USA. En revanche, une autre étude menée dans différente ville en Chine, dont Beijing, Shenzhen et Shangani est revenue avec un taux de prévalence de 0.17% parmi 600 chiens (Xia et al., 2012). En Europe, Barth et ses collaborateurs (2012) ont obtenu 4.9% chez une population de 448 chiens, Mircean et ses collaborateurs (2012) ont obtenu pour leurs parts, 0.5% parmi 1146 chiens.

D'autres études ont été menées sur des critères moléculaires, parmi celles-ci, Wagner et ses collaborateurs (2012) ont obtenu 23% de séropositivité pour 451 chiens analysés.

b) Transmission de *Borrelia burgdorferi*

La borréliose de Lyme est une zoonose transmise par un arthropode hématophage du genre *Ixodes* appartenant au complexe *Ixodes ricinus*. Selon les zones géographiques, il existe différentes espèces de tiques notamment *I. scapualris* au Nord-Est et Sud Est des Etats-Unis et au Canada, *I. pacificus* dans l'Ouest des Etats-Unis, *I ricinus* en Europe tempérée, *I. persulcatus* en Europe de l'Est et en Asie et *I. ovatus* au Japon. Il existe également des vecteurs secondaires permettant l'entretien du cycle qui constituent alors un réservoir sauvage (*I. dentatus, I. neotomae, I. spinipalpis, Pholeoixodes hexagonus, Ixodes uriae*) (Pantchev et al., 2009).

Ixodes ricinus peut se nourrir sur tous les vertébrés présents dans son environnement. On retrouve le plus souvent des larves sur les petits mammifères, les nymphes sur des mammifères de taille moyenne et les adultes plutôt sur des grands animaux de type ongulés. La répartition n'est ni homogène ni aléatoire.

La majorité des tiques sont agrégées sur une petite portion de l'hôte. L'agrégations simultanée de nymphe et de larve de tique sur un même hôte favorise la transmission systémique si un temps suffisant s'écoule pour permettre le développement de l'infection dans l'hôte et ainsi l'infection de la larve (Figure 19) (Mannelli et al., 2012). *Ixodes ricinus* sera plus longuement détaillé ici car il constitue le vecteur principal de la maladie en Europe occidentale.

La transmission de *Borrelia* peut survenir quelle que soit le stade de développement de la tique larve, nymphe ou adulte. Toutefois, la transmission par les larves s'avère exceptionnelle et d'autant moins probable que le passage vertical, transovarien des *Borrelia* est exceptionnel (Magnarelli et al., 1987 ; Bellet-Edimo et al., 2005). La transmission par un adulte mâle est elle aussi très peu probable, car celui-ci ne prend que très exceptionnellement un repas, sa présence sur le mammifère est animée par le besoin de se reproduire (Perez-Eid, 2007).

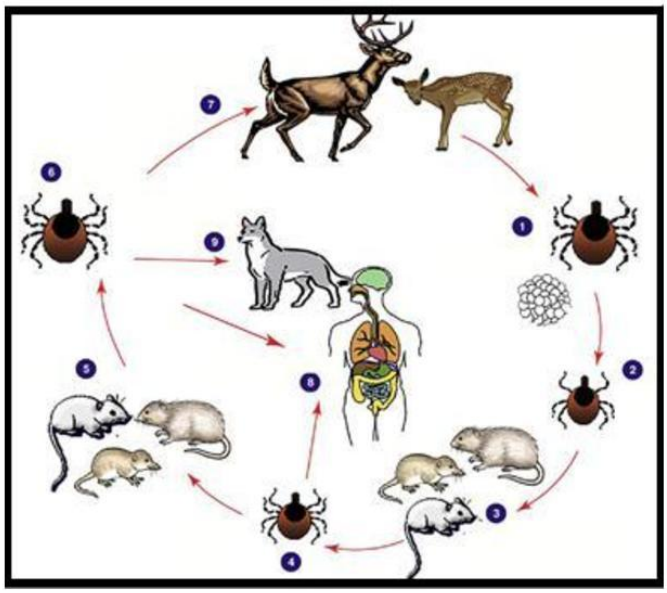

Figure 19 Cycle de transmission de *Borrelia burgdorferi* (adaptée et modifiée de Little et al., 2010)

Le taux d'infestation des tiques par *Borrelia* et de ce fait le risque de transmission de la bactérie augmente au fur et à mesure des stades de développement des tiques. Néanmoins, ce sont les nymphes qui sont le plus souvent responsables de la transmission de la borréliose de Lyme à l'homme (Nahimana et al., 2004). En effet, leur densité en zone endémique est élevée, jusqu'à 10 voire 30 fois celle observée pour les adultes, et leur taux d'infestation (8 à 20 % selon la région) est presque aussi élevé que celui des adultes (Matuschka et al., 1992). En outre, leur petite taille rend leur détection sur la peau beaucoup plus difficile et tardive que pour les adultes femelles.

La transmission sanguine est la meilleure transmission des spirochètes des réservoirs aux tiques. En outre, la transmission est meilleure si l'infection des nymphes est active au printemps et que les larves sensibles sont actives l'été de la même année, c'est-à-dire que les réservoirs sont tout d'abord infectés par les nymphes puis transmettent l'infection aux larves (Krupka et al., 2007 ; Mannelli et al., 2012).

Par ailleurs, Borrelia peut être transmise lorsqu'une tique engorgée est à proximité de la peau de l'hôte sans infection systémique ce qu'on appelle la transmission par co-feeding. Ce mode de transmission entre une nymphe infectée et une larve saine peut survenir lors d'une infestation simultanée d'un vertébré et est favorisée par un regroupement de tiques sur la peau de l'hôte. Ce mode de transmission, bien que minoritaire en comparaison à la transmission systémique, devrait être réévalué notamment l'implication de certains ongulés dans le cycle. En outre, il a été récemment montré que pour *B. afzelii*, ce mode de transmission contribue au maintien de la diversité génotypique dans une population de tique locale et peut être plus significatif que ce que l'on pensait (Mannelli et al., 2012).

La transmission transovarienne des spirochètes est rare. Néanmoins, elle peut contribuer significativement à l'entretien de l'infection chez les petits rongeurs. En effet, les souris et les campagnols servent d'hôtes à de nombreuses larves et ce mode de transmission peut augmenter le niveau d'infection larvaire. En outre, dans certaines régions, ce mode de transmission est même nécessaire pour le maintien de l'infection car la fréquence de morsure des nymphes sur les rongeurs est insuffisante (Mannelli et al., 2012).

c) Réservoir et espèces sensibles

Un réservoir est, par définition, un système écologique, un biotope dans lequel un agent infectieux survit indéfiniment. Il inclut donc l'ensemble des populations hôtes ainsi que les hôtes intermédiaires ou vecteurs, le plus souvent invertébrés (Savey and Dufour, 2004).

Les espèces réservoirs doivent être capables d'acquérir le spirochète à partir d'une tique infectée, permettre à l'agent de se multiplier et se développer et de persister dans leur corps et de transmettre l'agent à une autre tique lors de son repas sanguin sur celui-ci (Mannelli et al., 2012).

Parmi les nombreux réservoirs animaux, les rongeurs jouent le rôle de véritables réservoirs car leur infection reste inapparente. D'autre part, les cervidés, quant à eux, ont davantage un rôle d'entretien et de dissémination des tiques mais cela reste controversé. En effet, les cervidés seraient des réservoirs incompétents mais des marqueurs biologiques de la

présence de tiques. Ils servent d'hôtes pour un grand nombre de tiques et contribuent significativement au maintien de la population vectorielle (Mannelli et al., 2012). Les lièvres (*Lepus* spp) et hérissons (Erinaceus europaeus) sont des réservoirs compétents pour de nombreux génotypes (Mannelli et al., 2012). Les blaireaux (*Meles meles*) et le renard roux (*Vulpes vulpes*) peuvent en théorie constituer également des réservoirs mais bien que des spirochètes aient été retrouvés dans la peau et dans le sang des renards (capacité de transmettre l'infection aux tiques), il n'a pas été prouvé qu'ils étaient des réservoirs compétents (Gerber et al., 2007).

4) EXPRESSIONS CLINIQUES

En dépit d'une séroprévalence élevée à *B. burgdorferi* chez les chiens dans les régions endémiques, les manifestations cliniques sont rares. Des études ont montré que des animaux exposés à des morsures de tiques développent dans 5% des cas des signes cliniques. Cependant, dans les infections expérimentales, 75% des chiens inoculés expriment la maladie (Appel *et al*., 1993).

Par ailleurs, la possibilité d'une transmission simultanée de plusieurs agents infectieux par des tiques co-infectées n'est pas à écarter et peut brouiller un tableau clinique par des formes cliniques atypiques et rendre difficile l'établissement d'un diagnostic précis.

Les manifestations cliniques les plus fréquentes de la maladie de Lyme chez le chien est une arthrite d'apparition rapide et récurrente, évoluant le plus souvent sur une seule articulation. Les articulations les plus fréquemment atteintes sont en premier lieu les carpes, puis le coude. À la palpation, les articulations atteintes sont légèrement gonflées, chaudes et douloureuses (Figure 20) (Littman, 2003).

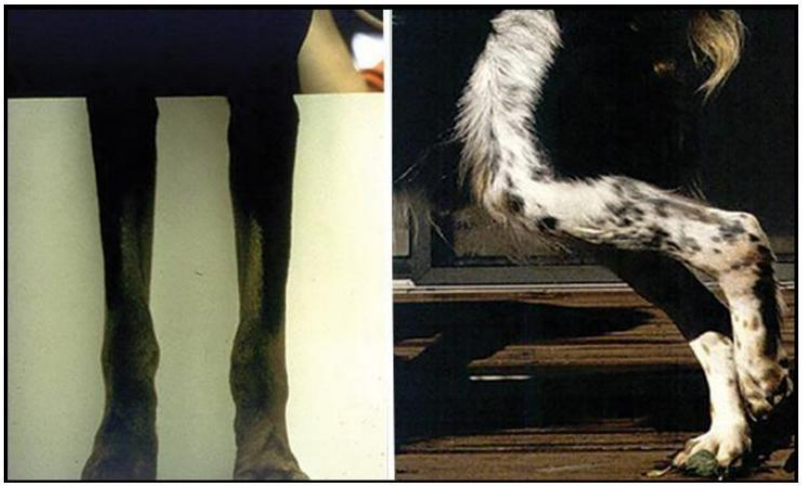

Figure 20 Arthrite chez un chien atteint de borréliose de lyme (Hammon, 2015)

Le tableau clinique de la phase aiguë associe habituellement aux signes articulaires des symptômes généraux tels que de l'hyperthermie de 38.8°C à 40.5°C, de l'anorexie, de la léthargie et des adénites (Krupka et Straubinger, 2010).

L'érythème migrant, observé chez l'homme, est très rarement retrouvé chez le chien. Ceci pourrait être dû au pelage qui masque les signes cutanés. D'autres signes cliniques non spécifiques tels qu'un rash cutané ou de l'urticaire peuvent être observés. D'autres auteurs ont décrit l'existence de lésions érythémateuses au point de fixation des tiques (Summers et al., 2005).

Les formes chroniques se caractérisent par la présence d'arthrite et de boiteries, plus ou moins permanente, des signes de glomérulonéphrite se traduisant par de la protéinurie et une élévation du taux plasmatique de l'urée-créatinine (Grauer *et al.*, 1988). Par ailleurs, l'atteinte cardiaque se manifeste par de l'endocardite et des arythmies ventriculaires.

5) PATHOGENIE

L'antigénicité de *Borrelia burgdorferi* change au cours de son cycle de vie, particulièrement pendant le gorgement de la tique. Cette modification permet une adaptation de la bactérie à son vecteur et un échappement à la réponse immunitaire de l'arthropode. L'intérêt va être porté aux protéines majoritairement impliquées dans la pathogénie de la maladie de Lyme. Les protéines de surface, les protéines de membranes ainsi que les protéines régulatrices du complément. Les protéines les plus impliquées dans la pathogénie de la borréliose sont les protéines de surface Osp (Manneli et al., 2012). Nous verrons plus en détails ci-dessous le pouvoir pathogène de *B. burgdorferi* durant la triade acquisition chez la tique, transmission à l'hôte et son comportement chez l'hôte.

L'infection de la tique a lieu soit lors d'un repas sanguin sur un vertébré contaminé soit par transmission transovarienne mais uniquement en cas d'infection généralisée aux ovaires. Le repas sanguin de la tique *Ixodes ricinus* dure environ 96 heures. Au cours des 24 premières heures, la bactérie pénètre au sein de l'organisme de la tique et se multiplie dans l'hémolymphe. La bactériémie reste tout de même faible et peu de germes sont retrouvés dans les tissus après cette phase. Par la suite, elle migre de façon continue au sein de l'intestin de la tique et reste au niveau des caecums latéraux jusqu'au prochain repas sanguin.

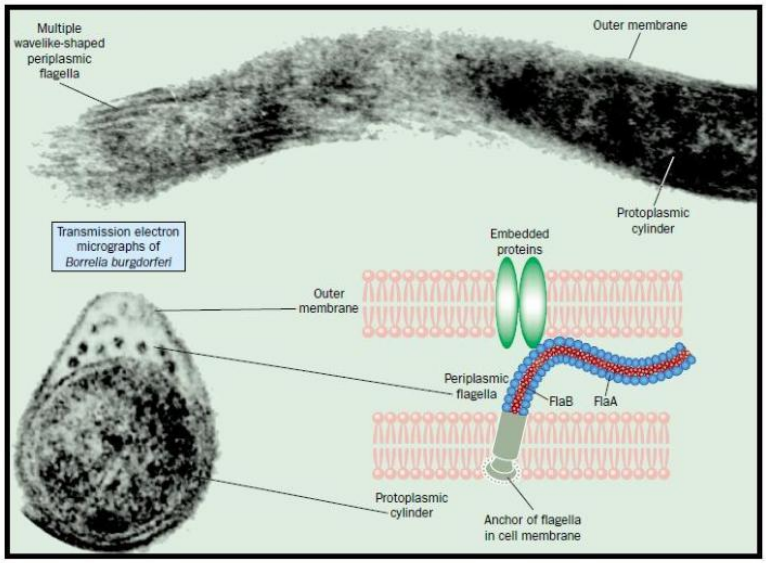

Figure 21 Morphologie des spirochètes *Borrelia burgdorferi* (Singh et Hermann, 2004)

.

Plus précisément, les spirochètes forment des petits amas dans les espaces intercellulaires du mésentéron et dans les microvillosités de sa bordure en brosse. Pour survivre au sein de la tique, le spirochète doit être capable de s'adapter au métabolisme de la tique et de persister au moment des repas sanguins et des mues. Pour ce faire, il existe des mécanismes d'adaptation à l'aide notamment par certaines protéines appelées protéines de surface (Mannelli et al., 2012).

Pour éviter sa destruction par le système immunitaire de l'hôte la première stratégie *de B. burgdorferi sl* consiste à modifier la synthèse de ces protéines de surface. Parmi celles-ci, on retrouve OspA qui est une protéine qu'on retrouve chez toutes les espèces de *Borrelia burgdorferi* avec un poids moléculaire compris entre 31 et 33 kDa (Baranton et al., 1992). Elle est produite par la bactérie lorsqu'on la retrouve dans l'intestin de la tique mais toutefois elle est faible en quantité au moment de l'engorgement (Figure 22). En effet, une souche de *Borrelia* déficiente en OspA et OspB est capable d'infecter une souris et de générer une arthrite sans pouvoir coloniser l'intestin de la tique. Ceci souligne le rôle important des protéines de surface O dans le maintien du spirochète au sein du vecteur.

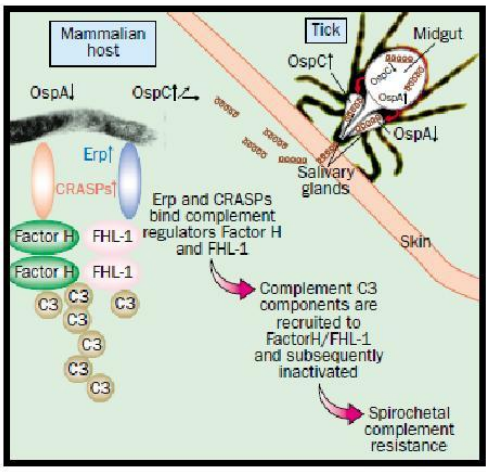

Figure 22 Régulation de l'expression des gènes de *Borrelia burgdorferi* chez ses différents hôtes (Singh et Hermann, 2004)

Plus précisément, OspA joue un rôle dans l'adhérence du spirochète à l'intestin de la tique en se liant à des protéines TROSPA. De plus, elle a déjà été retrouvée liée à elle-même, facilitant ainsi l'adhérence spirochète-spirochète et ainsi toute interaction (Mannelli et al., 2012).

Afin d'effectuer son repas sanguin, la tique enfonce son hypostome au sein de l'épiderme de l'hôte et libère simultanément par sa salive des substances vasoactives, anticoagulantes et cytolytiques. L'ancrage de son rostre dans la peau est assuré par un cément composé de glycoprotéines polymérisant au contact de l'air. Au cours des 24 à 72 premières heures appelées phase lente du repas sanguin, une multiplication des bactéries se produit au sein de l'intestin de la tique. Suite à cette prolifération bactérienne, une dissémination des spirochètes depuis l'intestin jusqu'aux glandes salivaires de la tique est observée. La transmission à l'hôte est alors possible à travers la salive enrichie en bactéries.

Les protéines de surface sont les principaux moyens impliqués dans la transmission. En effet, au cours de l'engorgement de la tique, il a été montré une sous-expression du gène Ospa et une surexpression du gène OspC. Cette régulation des gènes, est probablement liée à des variations thermiques, permettant au spirochète d'atteindre les glandes salivaires et ainsi de pouvoir être transmis à l'hôte. La protéine OspC se lie à une protéine salivaire de la tique et assure ainsi une transmission mécanique. A ces protéines s'ajoute la protéine salivaire Salp15 impliquée également dans la transmission du spirochète. En effet, son pouvoir immunosuppresseur a été démontré, ainsi la production de peptides antimicrobiens générés par *Borrelia burgdorferi* est bloquée, protégeant ainsi contre la réponse immunitaire innée cutanée de l'hôte (Mannelli et al., 2012).

6) RÉPONSE IMMUNITAIRE

Les réponses immunitaires innées dans la borreliose de Lyme constitue la principale barrière de défense et d'élimination contre les pathogènes, en outre il s'avère aussi une rampe de lancement pour l'immunité adaptative.

La transmission du spirochète dans la peau par la tique active le complément et conduit à une lyse à des spirochètes médiés par le complément (Breitner-Ruddock et al., 1997). Malheureusement, beaucoup de souches de *Borrelia* ont évolué de manières à résister au système du complément, en effet *B.burgdorferi s.s* et *B.afzelii* peuvent lier le facteur H, produit par le système du complément évitent ainsi l'opsonisation des OspE médiée par le complément, les complexes d'attaque membranaire et la phagocytose. Ainsi, elles s'échappent de cette première ligne de défense (Alitalo et al., 2002).

Les cellules du système immunitaire inné, par ex. monocytes, macrophages, cellules dendritiques (DC) et granulocytes, rencontrent *B.burgdorferi* au site d'inoculation où le spirochète y reste habituellement localisé pendant un certain temps. À travers, la reconnaissance de ses PAMPs, les cellules du système immunitaires identifient la présence du pathogène, en partie à travers des récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRR) comme les récepteurs Toll-like (TLR) (Medzhitov and Janeway, 2000) (Figure 23). Les TLR reconnaissent différents ligands microbiens tels que les lipoprotéines, les lipopolysaccharides (LPS), l'acide lipotechoïque (LTA) et le peptidoglycane de la paroi cellulaire (O'Neill, 2004 ; Zarember and Godowski, 2002). *B.burgdorferi* contient une proportion élevée de lipoprotéines qui sont reconnues par les TLR2 (Hirschfeld et al., 1999), les TLR1 (Alexopoulou et al., 2002) ou les TLR6 (Bulut et al., 2001) dans un complexe hétérodimère, qui sont particulièrement importante pour la reconnaissance du spirochète par les macrophages, les neutrophiles et les naturals killers (NK).

Par ailleurs, d'autres composants présents sur la surface du spirochète sont une cible pour la reconnaissance par le système immunitaire innée. En effet, les flagellines sont l'élément principal du flagelle du spirochète, (Shapiro and Gerber, 2000) contiennent une séquence stimulante pour le TLR-5 (Jacchieri et al., 2003).

Par le biais de cette reconnaissance, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques peuvent éliminer les spirochètes par phagocytose, (Montgomery and Malawista, 1996 ; Montgomery et al., 1994). Par ailleurs, la reconnaissance de *B.burgdorferi* conduit également à la libération de médiateurs comme les cytokines et les chimiokines, par ex. le

facteur de nécrose tumorale TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8 et de l'IL-12, par des monocytes, des macrophages, des neutrophiles et les cellules dendritiques (Dennis et al., 2009; al., 1995; Suhonen et al., 2003, Steere et al., 2004).

La sécrétion de cytokines et de chimiokines est une étape importante dans le recrutement d'autres composants de la réponse immunitaire innée de l'hôte au site d'inoculation. Les cytokines et les chimiokines affectent le flux sanguin et l'expression de molécules adhésives sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, et permettent aux leucocytes de migrer dans le tissu infecté. Les cellules dendritiques activées par les TLR serviront de cellules présentatrices d'antigène (APC) et apprêteront des antigènes lipidiques aux cellules T, cette dernière population de cellules, une fois activées aura pour mission de servir de pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Banchereau et al., 2000).

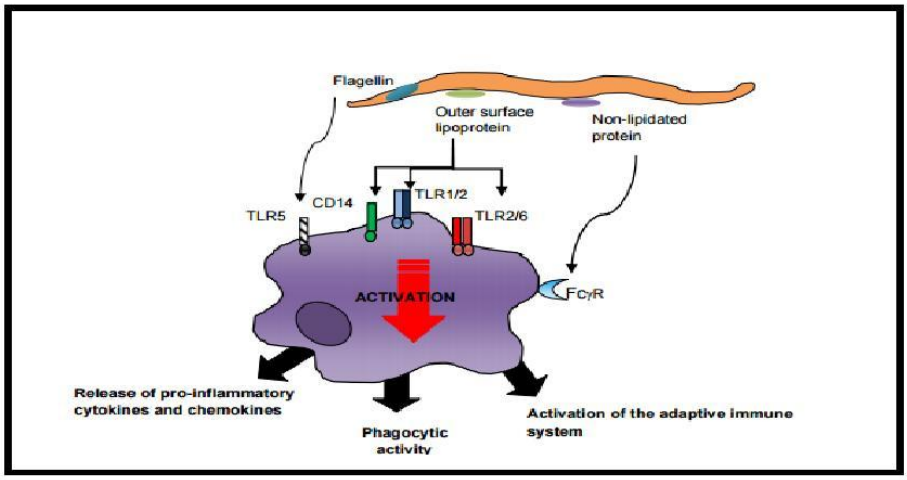

Figure 23 Reconnaissance innée de *Borrelia burgdorferi*

Des études ont montré que *B.burgdorferi* est un inducteur puissant de la libération de cytokine et de chimiokine à partir de monocytes. Les monocytes en contact avec *B.burgdorgferi* libèrent des cytokines pro-inflammatoires tels que IL-lß, IL-6 et TNF-a (Radolf et al., 1995) et des taux élevés de chimiokines et de protéine chimiotactique 1 (MCP-1 / CCL2) et IL-8 / CXCL8 (Sprenger et al., 1997).

La réponse immunitaire adaptative contre *B.burgdorgferi* implique à la fois une réponse humorale et cellulaire. Les réponses des cellules T indépendantes et dépendantes sont importantes lors de la réponse immunitaire adaptative pour l'abattage des spirochètes. Les lipoprotéines exprimées par *B.burgdorferi* induisent des réponses immunitaires humorales indépendantes des lymphocytes T adaptatives (McKisic and Barthold, 2000), alors que les réponses immunitaires aux protéines spirochéales non lipidées sont plus susceptibles d'être dépendante des lymphocytes T (Fikrig et al., 1997, Hanson et al., 1998).

La combinaison des réponses immunitaires indépendantes dépendantes des lymphocytes T conduit à la production d'anticorps anti-Borrelia spécifiques. Les anticorps jouent un rôle important dans l'élimination de *B.burgdorgferi* par opsonisation des spirochètes, conduisant à l'activation de la voie classique du complément et l'augmentation de la phagocytose des spirochètes (Kochi et al., 1991, Modolell et al., 1994). Les IgM spécifiques d'OspC ou la protéine flagellaire de 41 kDa de *B.burgdorferi* (Vaz et al., 2001) sont les premiers anticorps à apparaître dans les quelques jours suivants l'infection (Shapiro et Gerber, 2000). 6à8 semaines après, les IgG spécifiques de divers peptides spirochetaux provenant de, par ex. Les OSPs et les protéines flagellaires (Steere, 1989) apparaissent. Malgré une réponse immunitaire active contre *B.burgdorferi*, l'infection peut persister. Ceci peut être possible en évitant le système du complément (Alitalo et al., 2002), en modifiant ou en minimisant l'expression de ses protéines de surface (Hefty et al., 2002). En effet, on a observé dans un modèle murin que le développement d'anticorps spécifiques d'OspC se produit assez tôt et a pour conséquence une régulation à la baisse de cette protéine à la surface des spirochètes (Liang et al., 2002).

La réponse immunitaire diffère d'un sujet adulte à un sujet plus jeune En effet, chez l'adulte, la réponse immunitaire se caractérise avec un nombre élevé de cellules sécrétant IFN-ß spécifiques de *Borrelia* et de faibles taux d'IL-4 (Ekerfelt et al., 1997, Gross et al., 1998, Grusell et al., 2002, Oksi et al., 1996, Widhe et al., 2004) lors que chez les sujet plus jeune semblent avoir une réponse immunitaire plus équilibrée avec une sécrétion élevée de

À la fois IFN-λ et IL-4 (Widhe et al., 2005).

Dans la triade : hôte, tique et *Borrelia*, la salive secréter par la tique est un élément essentiel pour la transmission et d'induction de l'infection. En effet elle contribue à augmenter la virulence des spirochètes transmis. Les effets de la salive de tique sur l'immunité de l'hôte s'ajoutent aux propres mécanismes d'échappement développés par *Borrelia* pour survivre au sein de l'hôte. À ce titre, la protéine Salp15 dont l'interaction forte et spécifique avec OspC permet de protéger directement la bactérie contre l'effet bactéricide des anticorps neutralisants de l'hôte (Ramamoorthi et al., 2005 ; Hovius et al., 2008). Les effets immunosuppresseurs pléiotropes de Salp15 induisent au niveau du site de l'inoculation l'inhibition de la réponse immunitaire innée et de la synthèse des peptides antimicrobiens (Marchal et al., 2011), des cellules dendritiques (Hovius et al., 2008) ainsi que lymphocytes CD4+ (Anguita et al.,2002) .

D'autre part, la bactérie *Borrelia* transmise par la piqure de tique dispose d'une panoplie de moyen pour subvertir le système du complément. Le duo Borrelia-Salp15 permet d'inhiber le dépôt du complexe d'attaque membranaire à la surface de la bactérie et in fine la lyse de la bactérie par un mécanisme médié par le complément (Schuijt et al., 2008).Les protéines de la salive de tique Salp20 ou les protéines Isac/Irac contribuent aussi à la protection indirecte de *Borrelia* contre l'action du complément (Hovius et al., 2008).*Borrelia* arrive à contrecarrer un des composant les plus important de la réponse immunitaire innée contre les microorganismes en générale en exprimant à sa surface plusieurs protéines (comme les protéines CRASPs, Erps, ou OspE) qui peuvent lier le facteur H de l'hôte qui est un inhibiteur spécifique de la convertase de la voie alternative du complément (Coburn et al., 2013). Un dernier mécanisme entreprit par *Borrelia* pour modérer l'action du complément consiste en la capacité d'adhérer aux protéines du soi inhibiteur du complément.

Un autre mécanisme important d'échappement à la réponse humorale a été décrit. En effet, la lipoproteine de surface OspC qui est nécessaire à la transmission, l'initiation ainsi que la désamination de l'infection est fortement immunogène (Ramamoorthi et al., 2005) Durant les premières étapes de l'infection OspC est initialement masquée par la protéine de la salive de tique Salp15, permettant d'échapper temporairement aux effets bactéricides des anticorps. Par la suite, la bactérie répond par une inhibition de la synthèse de l'antigène OspC (Liang et

al., 2002) avec une surexpression d'une autre lipoproteine de surface (VlsE) dont ses variations antigéniques permettent d'échapper aux anticorps anti-VlsE (Palmer et al., 2009).

Par ailleurs, plusieurs études ont suggéré la présence de *B. burgdorferi* sur le site de l'inflammation lors des nombreuses manifestations cliniques de la maladie de Lyme. *B. burgdorferi* ne produit pas de toxines, mais une capacité immunomodulatrice. Les effets *de B. burgdorferi* sur cellules locales peuvent conduire à la suppression de la réponse immunitaire. En effet, des études ont relevés une diminution de l'expression de marqueurs du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur les cellules de Langerhans dans la peau des patients souffrant d'accrodermatite chronique atrophiante (Silberer et al., 2000).

B. burgdorferi augmente l'expression de l'adhésion moléculaire des cellules neurales sur les cellules endothéliales (Sellati et al., 1995). Après l'inoculation de *B. burgdorferi* dans la peau, la bactérie peut se déplacer à travers la matrice extracellulaire. *B. burgdorferi* peut se lier aux composants de matrice extracellulaire, dont les cellules épithéliales dérivés de protéoglycanes, en interagissant avec la décorine (Guo and Norris, 1995), les glycosaminoglycanes (Leong et al., 1995) et la fibronectine (Guner, 1995, Kopp et al., 1996).

De nombreuses études ont montré que *B. burgdorferi* peut s'attacher aux cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) in vitro. Cette pénétration peut être soit entre ou à travers les HUVEC (Comstock and Thomas, 1991). Les HUVEC exposées à *B. burgdorferi* in vitro en culture montrent une augmentation l'expression de l'E-sélectine, l'adhésion des cellules vasculaires et des molécules d'adhésions intercellulaire.

Les fibroblastes synoviaux semblent régulariser à la baisse les molécules d'adhésions cellulaires après contact avec *B. burgdorferi* ou alors ne semble pas affectées. En effet, l'expression des molécules d'adhésions cellulaire vasculaire n'a pas été modifiée dans ces cellules après Infection par *B. burgdorferi*. En outre, l'expression de l'oxyde nitrique synthase n'a pas été altérée par l'infection (Girschick et al., 1999). Il est particulièrement intéressant de relever que les synoviocytes régulent fortement à la hausse ces molécules pendant une réponse inflammatoire. Ainsi, ces immunomodulateurs locaux pourraient être une

conséquence de la présence de *B. burgdorferi* qui persiste dans le cytosol des cellules articulaires (Girschick et al., 1996). Cependant, la persistance intracellulaire du spirochète n'a pas été encore démontrée de façon constante in vivo. Malgré une immunité humorale et cellulaire robuste contre *B. burgdorferi* chez la plupart des individus, l'évolution chronique, même après plusieurs traitements antibiotiques. La pathogenèse de la maladie de Lyme demeure un sujet de discussion, elle se concentre actuellement sur les concepts d'infection et / ou auto-immunité.

Récemment, l'inflammation des articulations a été attribuée à l'auto-immunité (Gross et al.,1998 ; Steere et al., 2001). Il existe de fortes preuves que les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de l'arthrite lors de la maladie Lyme. Il a été démontré que la prolifération de la réponse des lymphocytes T spécifiques de *B. burgdorferi* isolé du liquide synovial ou du sang périphérique des individus adultes (Krause et al., 1991 ; Zoschke et al., 1991) et des jeunes individus atteints d'arthrite lors de maladie de Lyme, était élevé (Huppertz et al., 1996 ; Rutkowski et al., 1997). En outre, les lymphocytes T d'individus atteints de maladie d'arthrite associés à la borréliose réagissaient plus vigoureusement à la stimulation avec des antigènes de *B. burgdorferi* en comparaison avec des lymphocytes T provenant d'individus adultes touchés par des formes bénignes d'arthrite de Lyme (Yoshinani and Reinhardt, 1991 ; Lengl-Janssen et al., 1994).

Une étude menée par Gajdusek en 1985 a suggéré que la résistance à l'antibiothérapie lors de borréliose de Lyme soit médiée par la génération de l'autoimmunité, directement ou indirectement par la bactérie et soit basé sur le mimétisme moléculaire. En effet, que l'axonopathie rencontré lors de maladies neurologiques de la borréliose pourrait résulter d'une production d'anticorps anti-axonale. Les anticorps IgM mis en évidence dans des sérums d'individus atteints d'une maladie neurologique de Lyme le suggère (Shapiro and Gerber, 2000).

D'autres études portant sur les liaisons génétiques chez des adultes atteint d'arthrite de Lyme ont démontré un lien avec les molécules DR2 et DR4 du CMH de classe II (Steere and Dwyer, 1990). En outre, la durée de détection des anticorps anti-OspA est corrélée avec la

durée de leurs arthrite (Kalish et al., 1995). Les cellules T auto réactives maintiennent l'inflammation locale (Kawadt et al., 1995).

7) DIAGNOSTIC

a) Clinique

Un grand nombre de chiens infestés ne présentent aucun symptôme. La phase d'incubation est longue (2 à 5 mois). Dans la forme aiguë, le signe principal est généralement une boiterie d'apparition brutale, douloureuse (voire très douloureuse), intermittente et due à une arthrite se développant sur une seule articulation (plus souvent le carpe ou le tarse). Il peut arriver que plusieurs articulations soient touchées successivement (on parle alors de polyarthrite). La boiterie est souvent associée à de la fièvre, un abattement, une atteinte ganglionnaire locale et parfois des vomissements. Dans la forme chronique, la boiterie est moins sévère et d'autres symptômes peuvent être présents : myopathie, douleurs diffuses, troubles cardiaques, rénaux et nerveux (Green et al., 1988).

b) Isolement et culture

L'observation d'une bactérie ayant la forme d'un spirochète à partir de différents produits pathologiques (liquide synovial, liquide céphalo-rachidien, urine, sang périphérique) peut être réalisée sous microscopie à fond noir. Cependant, cet examen direct n'est possible que si la quantité de bactéries est importante. Cette limite de sensibilité explique que l'examen est positif dans moins de 40% des cas (Greene, 1991 ; Levy and Dreesen, 1992).

La culture n'est pas de pratique courante. Le temps d'incubation est long, et l'examen à fond noir des cultures doit être hebdomadaire. De plus, cette méthode a montré peu de spécificité et de sensibilité dans le diagnostic de la maladie de Lyme chez le chien.

c) Diagnostic sérologique

Compte tenu du manque de sensibilité de la microscopie ou de la culture, la détection indirecte de *B. burgdorferi sensu lato* par la recherche d'anticorps spécifiques dans le sérum sanguin
est devenue un outil important dans le diagnostic de la maladie de Lyme chez le chien.

Chez des chiens expérimentalement infectés, les anticorps sont détectés à partir de la 2ème à la 4ème semaine qui suit l'inoculation. Chez des sujets naturellement infectés, les immunoglobulines M persistent au moins 9 mois et les immunoglobulines G plusieurs années (Appel *et al*., 1993 ; Littman, 2003).

Actuellement, il existe deux méthodes de diagnostic indirect : des méthodes quantitatives et des méthodes qualitatives. Les premières ont pour but de mettre en évidence la présence d'anticorps à des taux significatifs, les techniques les plus utilisées sont : l'immunofluorescence indirecte (IFI) et les techniques immuno-enzymatiques (ELISA).

Les méthodes qualitatives sont principalement représentées par le Western-blot. Il s'agit d'une méthode de confirmation qui a pour but d'étudier la nature des antigènes reconnus par le sérum après analyse initiale par les méthodes quantitatives.

L'Immunofluorescence Indirecte (IFI) et l'ELISA

Ce sont les deux tests les plus couramment utilisés en pratique vétérinaire. Ces méthodes font appel soit à une cellule entière de *Borrelia burgdorferi sensu lato* (IFI) soit à un antigène tel que l'OspA, l'OspC, l'OspF ou le peptide C6 (ELISA). Dans une récente étude, Wagner et collaborateurs ont évalué la réponse immunitaire chez des chiens expérimentalement infectés, en utilisant différents antigènes de surface. Ces derniers, ont conclu que les antigènes C6 et OspF étaient les marqueurs les plus robustes et les plus spécifiques de l'infection (Wagner et al., 2012).

Cependant bien que ces deux techniques soit peu couteuses et bien adaptées au diagnostic de routine, elles présentent certains inconvénients tels que la présence de réactions croisées entre les borrélies avec *Leptospira interrogans*, *Treponema pallidum* ou encore certaines Rickettsies (Parola et Raoult, 2001). Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus chez des chiens vaccinés contre la leptospirose car les techniques IFI et ELISA ne permettent pas de faire la distinction entre les anticorps spécifiques et les anticorps vaccinaux (Wittenbrink et al., 1996). Par ailleurs, des résultats faussement négatifs peuvent aussi exister lorsque les tests sérologiques sont réalisés sur un animal présentant une séroconversion ou encore traité préalablement par antibiothérapie (Levy et Dreesen, 1992).

La présence de porteurs asymptomatiques peut également rendre le diagnostic de la maladie de Lyme chez le chien difficile à interpréter. En effet, une étude a montré que 50 à 90% des chiens vivant dans une région endémique étaient séropositifs mais ne présentaient aucuns signes cliniques évocateurs de la maladie de Lyme (Levy et Dreesen, 1992).

Par ailleurs, des kits de diagnostic rapide sont commercialisés. Ils sont basés sur l'utilisation d'un antigène "peptide de synthese C6", obtenu à partir d'une zone conservée (IR-6) de la lipoproteine VlsE (Liang et Philipp, 1999).

Le western-blot

Le western-blot ou immuno-empreinte permet de mettre en évidence les anticorps spécifiques contre certains antigènes de *Borrelia burgdorferi*. Cette technique est surtout utilisée pour confirmer les tests sérologiques classiques IFI et ELISA. De plus, elle permet de faire la distinction entre les chiens vaccinés et ceux naturellement immunisés. En effet, un chien vacciné présente une reconnaissance marquée aux protéines de poids moléculaire variant de 31 à 34 kDa ; elles correspondent à OspA et OspB. À l'inverse, un chien naturellement immunisé présente une reconnaissance faible face à ces deux antigènes, mais la réponse est étendue à un spectre beaucoup plus large de protéines (de 15 à 100 kDa) (Hauser et al., 1997 ; Hauser et al., 1999).

Toutefois, cette méthode est coûteuse et difficile à mettre en œuvre pour un diagnostic de routine. Il existe aussi des problèmes de reproductibilité lors de l'électro-transfert mais surtout, il est très difficile de fixer des critères de positivité quantitatifs. La valeur prédictive de chaque bande étant souvent différente. En l'absence de consensus quant à l'interprétation des résultats (à l'instar de ce qui se passe en médecine humaine), cette approche est très peu appliquée pour le diagnostic de la maladie de Lyme en médecine vétérinaire.

En conclusion, malgré une utilisation simple et un cout peu élevé, les tests sérologiques présentent certaines limites et inconvénients qui diminuent la fiabilité du diagnostic, aussi il convient donc face à une sérologie positive d'associer les données épidémiologiques, les signes cliniques et biologiques avant de confirmer avec certitude un cas de maladie de Lyme chez un chien.

d) Diagnostic moléculaire

Le séquençage du génome de *Borrelia burgdorferi sensu lato* a été mis à profit pour développer
la technique PCR et ceci en ciblant des fragments de gènes chromosomiques ou plasmidiques. Cette méthode moléculaire permet une identification spécifique de la bactérie, sa sensibilité est de l'ordre de 80% pour l'analyse du liquide synovial mais demeure faible pour les autres types de prélèvements tel que le sang, le LCR et les urines (Sraubinger, 2000; Skotarczak et al., 2003). Cependant la technique PCR peut conduire à des interprétations erronées si elle est utilisée comme seul outil de diagnostic et sans tenir compte des données sérologiques et des signes cliniques. De même, le risque de faux positifs par contamination ou de faux négatifs par présence d'inhibiteur ou d'enzymes dégradant l'ADN, représentent des inconvénients supplémentaires pouvant rendre l'analyse des résultats difficiles (Krupka and Straubinger, 2010).

Malgré son coût élevé, la technique PCR demeure un outil indispensable pour la détection et la différenciation des espèces ou souches de *Borrelia* lors d'enquêtes épidémiologiques.

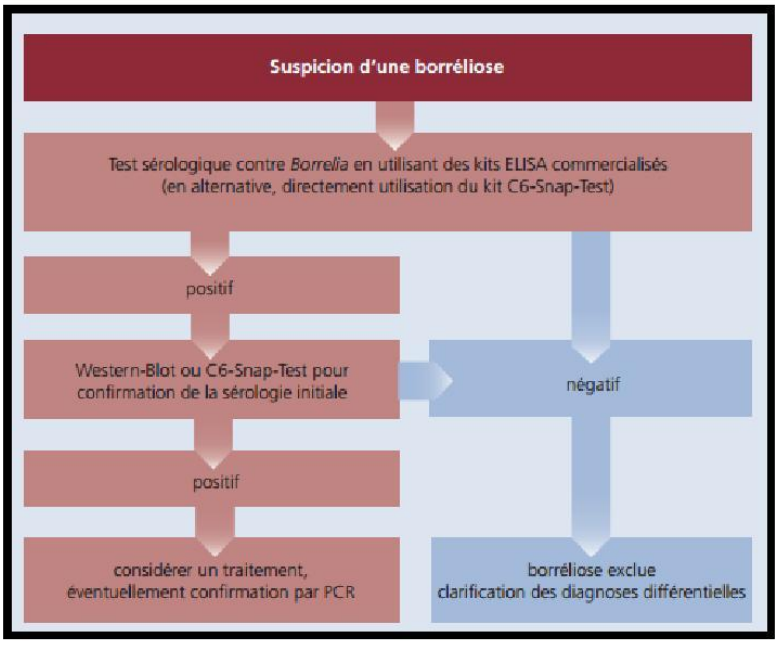

Figure 24 Conduite à tenir lors de suspicion de borréliose

8) TRAITEMENT

En cas de borréliose de Lyme avérée, l'objectif principal du traitement est la résolution complète des symptômes en relation avec l'infection à *Borrelia*, et la prévention d'une progression vers une forme tardive de la maladie. Le traitement repose sur une antibiothérapie qui vise à éliminer les spirochètes présents dans les sites lésionnels. En outre, les molécules actives utilisées en pratique clinique appartiennent à 3 familles d'antibiotiques : les β-lactamines, les cyclines et les macrolides, qui ont toutes une bonne activité in vitro sur les différentes espèces de *Borrelia* (Hansmann, 2009). En outre, La diffusion tissulaire cutanée et articulaire de ces 3 familles d'antibiotiques est équivalente. Toutefois, la diffusion dans le LCR des céphalosporines de 3e génération injectables est meilleure que pour les autres molécules. Ainsi, le choix de la molécule, son mode d'administration et la durée du traitement sont à établir en fonction du stade évolutif de l'infection. En effet, des recommandations thérapeutiques ont été établies par type de manifestation clinique (SPILF, 2006).

Par ailleurs, la surveillance post-thérapeutique est avant tout clinique ; la sérologie n'est d'aucune utilité pour le suivi des patients traités. Des essais thérapeutiques contrôlés ont permis d'établir que des durées de traitement supérieures à celles qui sont actuellement recommandées ne permettent pas d'améliorer la réponse clinique au traitement administré (Klempner et al., 2001).

L'échec de l'antibiothérapie administré doit avant tout conduire à vérifier que le patient répond bien à l'ensemble des critères diagnostics reconnus, que le traitement administré était bien conforme aux recommandations actuelles, et que l'observance de celui-ci a été bonne.

La persistance d'une symptomatologie fonctionnelle (asthénie, algies diffuses, plaintes cognitives) sans manifestation objective à l'examen clinique chez un individu correctement diagnostiqué et traité pour une borréliose de Lyme (encore appelée syndrome post-Lyme) ne devrait pas faire l'objet d'un traitement antibiotique prolongé ou d'une nouvelle cure d'antibiotiques, car la responsabilité d'une infection active à *Borrelia* dans ce syndrome n'est pas établie (Halperin et al., 2013).En effet, dans le cas d'un syndrome post-Lyme, une exploration médicale à la recherche d'une autre étiologie devrait être envisagée, et lorsqu'aucun traitement spécifique ne peut être proposé, une prise en charge symptomatique de ces individus est requise.

9) PROPHYLAXIE

En zone d'endémie, la prévention contre la borréliose de Lyme repose essentiellement sur une protection mécanique et peut être complétée par l'utilisation de répulsifs à usage cutané naturels (comme le citriodiol : la citronnelle) ou de synthèse (comme le DEET ou la picaridine). Toutefois, l'efficacité de ces répulsifs est limitée par et leur toxicité potentielle (SPILF, 2006).

Lors d'exposition à une piqûre de tique, la prévention secondaire repose sur le retrait des tiques présentes sur la peau. En effet, c'est la méthode de prévention la plus efficace. Toutefois, pour une efficacité maximale ce retrait doit être effectué le plus précocement

possible, car si le risque global de transmission en zone d'endémie après piqûre de tique est faible (de 1 à 4 %), celui-ci augmente en fonction de la durée d'attachement de la tique (Gray, 1999). La détection des tiques doit se faire par un examen minutieux de l'ensemble du revêtement cutané, avec une attention particulière pour les sites de prédilection chez le chien sont la tête, le cou et le dos. En effet, la tique s'y attachera solidement pour le temps de son repas qui dure de 3 à 14 jours pour ensuite se détacher et se laisser tomber. Il est recommandé de retirer les tiques fixées à la peau à l'aide d'une pincette en prenant soin d'attraper la tique au plus près des pièces buccales et d'effectuer une traction en sens inverse de la piqûre ou d'un « tire-tique » (par un mouvement de rotation après avoir logé la tique dans la fente du crochet) (SPILF, 2006). En outre, les autres méthodes de retrait incluant l'application d'éther, d'alcool et d'huiles sont déconseillées, car elles sont susceptibles de faire régurgiter la tique et d'augmenter le risque de transmission de *Borrelia*. A cet effet, il est recommandé de désinfecter le site de piqûre de tique après le retrait et non pas avant. De plus, le site de piqûre doit ensuite être surveillé pendant 4 semaines pour dépister l'apparition d'un éventuel érythème migrant. L'antibioprophylaxie systématique après piqûre de tique n'est pas recommandée en Europe (SPILF, 2006).

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1) OBJECTIFS

Tous les travaux de recherche présentés dans ce document ont été réalisés au sein de trois structures : le Laboratoire de Microbiologie-Immunologie de l'École Vétérinaire d'Alger (ENSV), le Service de Parasitologie de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA) et l'Institut National de Médecine Vétérinaire (INMV).

L'objectif principale de ce travail a été d'estimer la prévalence des anticorps anti-*Anaplasma phagocytophilum*, *anti-Borrelia burgdorferi* et anti-*Ehrlichia canis* sur la base d'un échantillon représentatif d'une population de chiens de fourrière par la technique de référence IFI ou « Immunofluorescence Indirecte » et différentes espèces de canidés sauvages. De plus, grâce aux données récoltées lors de l'échantillonnage des individus, il était également intéressant de réaliser une étude descriptive épidémiologique à partir des cas séropositifs pour les agents bactériens cités ci-dessus.

Dans une seconde étape, nous avons comparé les résultats de sérums positifs obtenus par IFI en utilisant le test rapide, KIT VIA.

Un autre objectif a été celui de rechercher les anticorps antinucléaires chez tous les chiens de fourrière préalablement testé par IFI.

2) DÉROULEMENT GÉNÉRAL

a) Population de canidés inclus dans l'étude

Concernant les canidés domestiques, l'étude a été menée de juillet 2015 à Février 2016. L'étude est réalisée en aveugle sur 96 chiens provenant de la fourrière canine d'Alger.

L'âge des chiens a été estimé en fonction de la morphologie et de la denture. La prise de sang a été réalisée à partir de la veine céphalique, ainsi qu'en intracardiaque pour les chiens euthanasiés de façon stérile après une désinfection minutieuse de la zone de ponction à l'aide d'alcool à 70°. 4 millilitres (mL) de sang ont été recueillis sur tube sec puis centrifugés au laboratoire à 1500 g pendant 10 minutes. Des aliquots ont été réalisés, identifiés et conservés à –20°C. Ces aliquots ont été décongelés à température ambiante en fonction des besoins de l'étude.

Figure 25 Prise de sang intracardiaque d'un chien à la fourrière canine El Harrach

D'autre part, les sérums d'une population de canidés sauvages ont également été testés vis à vis des mêmes agents pathogènes avec la même technique d'analyse sérologique. Ces canidés sauvages ont été prélevés sur le site du Centre Cynégétique de Zeralda (CCZ) ainsi qu'au Jardin d'essai du Hamma, qui s'étend sur une superficie de 58 hectares (38 hectares de jardin et 20 hectares d'arboretum).

b) Recueil des données épidémiologiques

Pour chaque chien prélevé à la fourrière canine, nous avons relevé lorsque les informations étaient disponibles la race, l'âge, le sexe et l'état général. De même pour les canidés sauvages, les données épidémiologiques ont été fournies par le vétérinaire responsable.

3) ANALYSE PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Les 96 sérums ont été testés par immunofluorescence indirecte, selon la méthode utilisée au Service d'immunologie de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Après décongélation, les sérums ont été analysés afin de rechercher les anticorps contre *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* et *Ehrlichia canis* en utilisant des lames commerciales MegaScreen Fluoanaplasma ph., MegaScreen Fluoborrelia et MegaScreen Ehrlichia canis (MegaCorDiagnostik, Autriche).

a) Principe

Le test s'appuie sur la méthode classique de l'immunofluorescence indirecte. Les lames de substrat sont couvertes de l'antigène. Dans une première étape, le sérum de l'animal est appliqué sur les puits de la lame et incubé. Si le sérum contient des anticorps dirigés contre l'antigène, ces anticorps se lient au substrat. Les anticorps non spécifiques ainsi que les autres protéines et composants présents dans le sérum sont éliminés lors d'une étape de lavage. Pour éviter que les antigènes ne soient altérés ou ne se détachent de la lame, il est absolument déconseillé de remuer le tampon lors du lavage. Au cours d'une deuxième étape d'incubation, les anticorps liés au substrat font l'objet d'un marquage optique par des immunoglobulines anti-chiens marquées FITC (le conjugué). Pour éliminer l'excès du conjugué, la lame sera de nouveau lavée. Le complexe antigène/anticorps humains/conjugué peut alors être examiné au microscope à fluorescence au grossissement 400-500.

b) Protocole

Les sérums dilués au 1/50 sont mis en contact de cellules préalablement infectées par *Ehrlichia Canis, Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi sensu lato* inactivée par le formol (laboratoire MegaCorDiagnostik), immobilisées sur des lames 18 puits (*Borrelia*

burgdorferi) et 20 puits (*Ehrlichia Canis, Anaplasma phagocytophilum).* Pour ce faire, la suspension cellulaire est diluée au demi en PBS et 10µL de cette préparation sont déposés sur chaque puits. Les lames sont ensuite séchées une nuit à température ambiante puis fixées 15 minutes par immersion en acétone à -20°C. Ces lames peuvent être ensuite conservées pendant 6 mois à -20°C. Le titrage des anticorps s'effectue alors par l'immunofluorescence indirecte, à l'aide d'un conjugué d'Ac de moutons dirigés contre les chaînes lourdes et légère d'IgG de chien, marqués à la fluorescéine : sheep anti-dog IgG (H+L) FITC (anti-IgG de chien -Jackson immunoresearch, USA)

c) Matériels et équipements

- Tubes pour la préparation des dilutions des échantillons
- Pipettes de précision (intervalle 1-1000 µl)
- Agitateur type Vortex
- Récipient gradué (500 ou 1000 ml) pour la préparation du tampon PBS
- Eau distillée ou déminéralisée
- Chambre humide d'incubation
- Étuve (37° C)
- Cuvettes de lavage pour les lames (aussi grandes que possible)
- Bouteille de polyéthylène à pissette pour le tampon PBS
- Chronomètre
- Microscope à fluorescence fond noir au filtres permettant une excitation de 450-490 nm et une émission de 560-590 nm.

d) Manipulations

Après décongélation, tous les sérums ont été analysés afin de rechercher des anticorps contre *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* et Ehrlichia canis en utilisant des lames commerciales MegaScreen Fluoanaplasma ph., MegaScreen Fluoborrelia et MegaScreen Ehrlichia canis (MegaCorDiagnostik, Autriche) (Figure26).

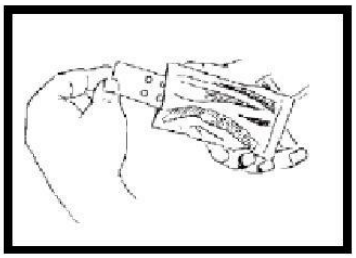

Figure 26 Lame téflon.

Les sérums testés sont d'abord dilués au 1/50ème en PBS préalablement préparer dans des tubes à hémolyse : 10 µL de sérum + 490 µL de PBS. Un témoin positif est systématiquement ajouté aux sérums à tester, sur chaque lame (sérum hyper-immun du laboratoire) (Figure 27).

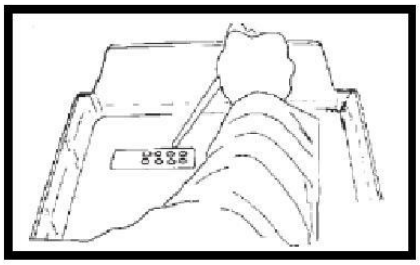

Figure 27 Dépôts des sérums sur les puits

En fonction des lames 15 à 25 µL de chaque dilution sont déposés sur chacun des puits ; les lames sont ensuite mises à incuber 30 minutes à 37°C (Figure 25) en chambre humide puis lavées 10 minutes en bain de PBS (Figure 28).

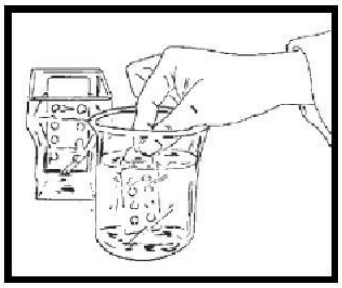

Figure 28 Lavage au PBS des lames IFI

Le conjugué est préparé en quantité suffisante dans un tube à hémolyse dans les

Proportions suivantes :

• 10 µL d'anti-dog IgG FITC

• 950 µL de PBS

• 10 µL de Bleu Evans (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) à 1%

Ainsi, 15 à 25 µL de cette préparation sont déposés dans chaque puits et les lames sont à nouveau placées pour 30 minutes en chambre humide (Figure 29) un lavage de 10 minutes en PBS sont ensuite effectués (Figure 28) avant de sécher les lames et de les monter au fluoprep (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) (Figure 30).

Figure 29 Incubation à 37° pendant 30 minutes

Figure 30 Montage des lames IFI

e) Lecture des résultats

La lecture se fait ensuite au microscope à fluorescence (grossissement 10x100) (Merck, Darmastadi, Allemagne) (Figure 29) et a été faite par deux opérateurs, de manière indépendante (lecture en double aveugle) et selon un barème prédéfini comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

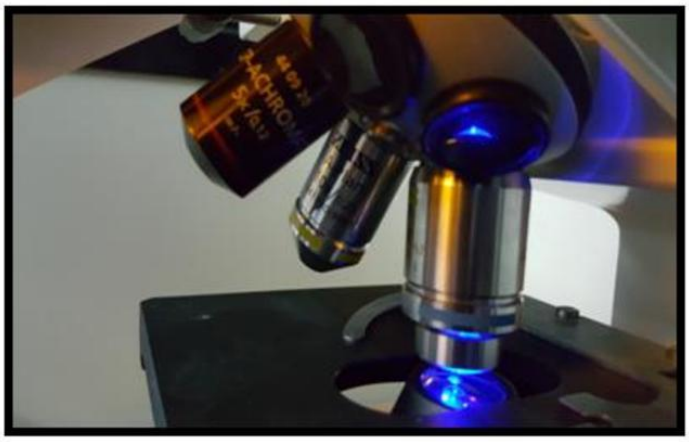

Figure 31 Microscope à immunofluorescence, Institut Pasteur, Alger.

Tableau 1 Barème de lectures des lames d'immunofluorescence.

Résultat	**Signification**

0	Contrôle négatif
+	Bactérie visible mais pas de fluorescence
++	Fluorescence présente mais modérée
+++	Fluorescence intense
++++	Fluorescence très intense

4) ANALYSE DES ÉCHANTILLONS PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNOCHROMATOGRAPHIE (KITVIA)

a) Principe

Il s'agit d'un test immunoenzymatique ELISA permettant la détection indirecte simultanée de 4 agents pathogènes sur le sérum, le plasma ou le sang total du chien : *Dirofilaria immitis* ou HW (heartworm), agent d'une filariose cardiaque chez le chien, *Anaplasma phagocytophilum* ou AP, agent responsable de l'anaplasmose granulocytaire canine, *Borrelia burgdorferi sensu lato* ou LY, agent responsable de la maladie de Lyme et *Ehrlichia canis* ou EC, agent responsable de l'ehrlichiose monocytaire canine. Pour notre étude, nous avons utilisé comme échantillons le sang prélevé sur tube sec.

Préparation des échantillons

Prélever du sang total et l'introduire dans un flacon sans anticoagulant (ni EDTA, ni héparine, ni citrate de sodium). Si l'échantillon n'est pas utilisé tout de suite, conserver au réfrigérateur (2-8°) et l'utiliser dans les 24H ou les congeler et les ramener à température ambiante lors du test.

Les échantillons de sérum contenant un précipité sont susceptibles de donner des résultats incorrects. À cet effet, nous avons procéder à une nouvelle centrifugation pour éliminer ces précipités.

b) Manipulations

Tous les composants du kit doivent être ramenés à température ambiante avant de commencer le test.

Après retrait du test de son emballage et l'avoir placé sur une surface plane et sèche, nous avons déposé du sérum dans chaque puits à l'aide une pipette de 10 µl. Nous avons par la suite, ajouté trois goutes de diluant pour faciliter la migration, une couleur pourpre sera visible sur la fenêtre de résultat (Figure 30).

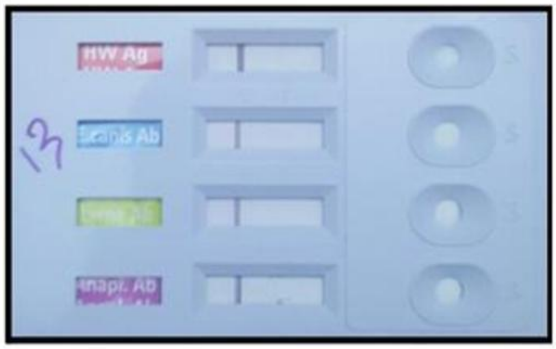

Figure 32 KITVIA 4 pathogenes

c) Interprétation du test

Une ligne colorée apparait en face du repère « C », confirmant que le test a fonctionné correctement. La zone située en face du repère « T » indique le résultat du test. Si une seconde ligne colorée apparait à ce niveau, il s'agit du résultat du test (figure 30).

- Résultat positif : Les deux lignes « C » et « T » colorées signifient un résultat positif pour le vecteur recherché.
- Résultat négatif : seules les lignes de contrôles apparaissent.

- Résultat invalide : Si aucune ligne colorée n'apparait dans la zone « C » au bout de 10 minutes, le résultat doit être considéré comme invalide.

Limite de test : Bien que le test KITVIA Bilan Parasites soit très précis en matière de détection quantitative des antigènes de *Dirofilaria immitis* et des anticorps anti-*Anaplasma phagocytophilum/ Anaplasma platys*, anti-*Borrelia* et anti-*Ehrlichia cani,* une faible probabilité de faux-résultats est possible. D'autres tests cliniques seront alors nécessaires.

Comme dans tout test, un diagnostic clinique définitif ne devrait pas être basé sur les résultats d'un seul et unique test, mais devrait être fait après évaluation de tous les indices cliniques.

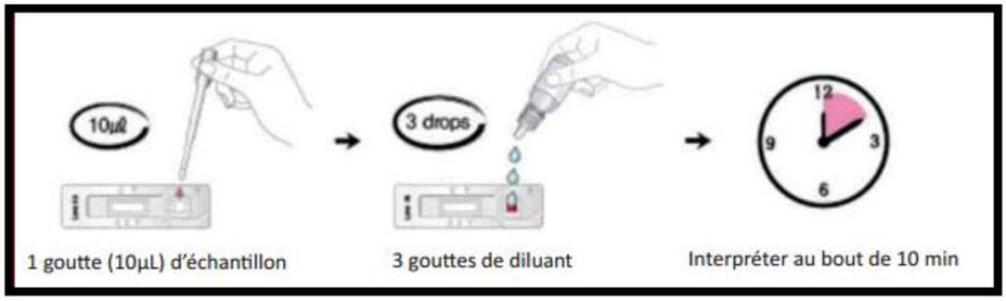

Figure 33 Etapes de l'analyse avec le KITVIA PARASITES

5) RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI NUCLÉAIRES

a) Principe

Il s'agit d'un test "extrapolé" de la médecine humaine, où il est utile dans le diagnostic de certaines maladies auto-immunes (LES) chez le chien. En médecine vétérinaire, anticorps anti-nucléaires (AcAN) sont dirigés contre des éléments variés du noyau : protéines

ribonucléiques et histones surtout ainsi que l'ADN. Ces AcAN sont responsables de l'essentiel de la pathogénie du LES en particulier par la formation de complexes immuns circulants puis dépôts dans différents tissus.

b) Protocole

Test d'immunofluorescence indirecte : On réalise une dilution au 1/50 du sérum du chien. Chaque sérum à analyser est mis en contact avec une cellule (lame maison *Bartonella Berkhofii)* qui contient le substrat reconnu par les AcAn. Un anticorps secondaire fluorescent (spécifique d'espèce) est ajouté ; il se fixe aux AcAn, eux même déjà fixés sur la lame (incubation). Après lavage, les différentes dilutions sont observées pour rechercher le dernier titre avec immunofluorescence.

6) OUTILS STATISTIQUES

Tout d'abord, nous avons établi les valeurs de fréquence et de prévalence. La différence entre les variables a été testée à l'aide des tests suivants : test chi2, Fisher exact, test student ou le test ANOVA. Nous avons choisi comme variable : l'âge, le sexe, la présence ou absence d'ectoparasites et la saison. La différence a été considérée comme significative si $p < 0.05$. Le calcul du coefficient kappa permet d'évaluer la concordance entre les deux tests sérologiques (IFI et KIT VIA) ainsi que la spécificité et la sensibilité.

7) IDENTIFICATIONS DES ECTOPARASITES

Les tiques prélevées sur le chien ont été fixées dans des flacons à fermeture hermétique contenant de l'éthanol à 70°. Sur chaque flacon une étiquette porte les mentions : Numéro d'ordre de l'échantillon et la date de récolte (Figure 34 et 35).

Une première identification des stades larves, nymphes, femelles et mâles des 6 genres : *Ixodes, Boophilus, Dermacentor, Hyalomma, Haemaphysalis* et *Rhipicephalus* a été faite sur la base d'une Clé de détermination des genres. Ainsi, l'identification des Ixodina s'établit à partir de l'étude de structures morphologiques. Elle est largement orientée par la connaissance de l'hôte d'accueil et la provenance géographique de la tique. De manière grossière, la première clé d'identification repose sur l'observation, en face ventrale, du sillon périanal. Chez les Prostriata, dont Ixodes sp. est le seul genre, le sillon périanal contourne l'anus cranialement, tandis que chez les Metastriata, le sillon périanal contourne l'anus caudalement. La longueur du rostre et la forme du capitulum sont ensuite les caractères principaux qui permettent d'identifier un genre (Meddour, 2002 ; George, 2005)

CHAPITRE 3 : RESULTATS

1) DESCRIPTION DE LA POPULATION D'ÉTUDE

a) Canidés domestiques

Le tableau situé ci-dessous détaille l'âge et la race des chiens représentés dans cette étude, ainsi que le sexe de l'animal pris en compte en rapport avec les variables précédemment citées.

Tableau 4 Description de la population des canidés domestiques

Variable	Male	Femelle
Age (mois)		
≤10	**15 (17.85%)**	**17 (20.24%)**
12 -36	**15 (17.85%)**	**16 (19.05%)**
> 36	**24 (28.57%)**	**13 (15.48%)**
Race		
Berger allemand	**12 (14.28%)**	**6 (7.14%)**
Croisé	**31 (36.9%)**	**30 (35.71%)**
Autres	**3 (3.57%)**	**2 (2.38%)**

Figure 34 Infestation auriculaire massive par des tiques

Figure 35 Tique conservée dans de l'éthanol 70%

b) Canidés sauvages

Les prélèvements ont été

réalisés au niveau du Jardin d'essai ainsi qu'au centre cynégétique de ZERLADA. Le nombre de canidés sauvages prélevés étaient de 12. Les animaux prélevés correspondent aux espèces suivantes : le fennec-*Vulpes zerda* (7, 58.33%), le renard roux - *Vulpes vulpes* (3, 25%) ainsi que chacal- *Canis aureus* (2, 16.67%) (Figure 36)

Figure 36 Fennec-*Vulpes zerda*

2) RÉSULTATS EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI)

a) Les canidés domestiques

i. Séroprévalence de *Anaplasma phagocytophilum*

L'IFI a été le premier outil sérologique utilisé pour mesurer les titres en anticorps dirigés contre *Anaplasma phagocytophilum.* Les sérums ont été analysés en IFI à la dilution de 1/50. Ce titre a été défini comme indicatif de l'infection par *Anaplasma phagocytophilum* en se basant sur des études chez des chiens naturellement et expérimentalement infectés (Hollingdale et al., 1978). Sur un total de 84 sérums de chien analysés, 36 (42.85%) se sont révélés positifs en IFI (Figure 37). Après analyse de tous les sérums par cette technique, 16 sérums ont subi un second test de dépistage sérologique utilisant le kit Via.

Les facteurs de risque

La question suivante que nous nous sommes posée était de savoir quels étaient les facteurs qui influençaient positivement ou négativement la séroprévalence. Pour ce faire, un questionnaire épidémiologique a été rempli pour chaque chien et les facteurs suivants ont été considéré : le sexe, l'âge, la race, la saison et la présence ou l'absence de tiques.

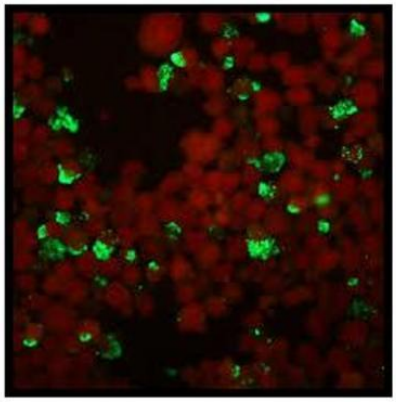

Figure 37 Immunofluorescence positive à *Anaplasma phagocytophilum* (Photo personnelle)

L'âge

Sur un total de 200 chiens prélevés, 84 chiens ont servi pour étudier l'effet de l'âge en fonction de la séroprévalence à *Anaplasma phagocytophilum.* Les chiens ont été répartis en trois classes : ≤10 (32/84, 38.09%) ; 12 -36 (31/84, 36.9%) et > 36 (37/84, 44.04%).

Les chiens de moins d'une année (19.04%, 16/84) semblent plus infectés comparés aux chiens de 12-36 mois où la fréquence de l'infection était de 11.9% (10/84). Toutefois, chez les chiens de plus de trois années, la fréquence d'infection (17.85%, 15/84) était presque similaire à celle des chiens de la première classe d'âge (Figure 38).

Ainsi, il semble y avoir une association significative entre l'âge et la séroprévalence à *Anaplasma phagocytophilum* ($p < 0.05$).

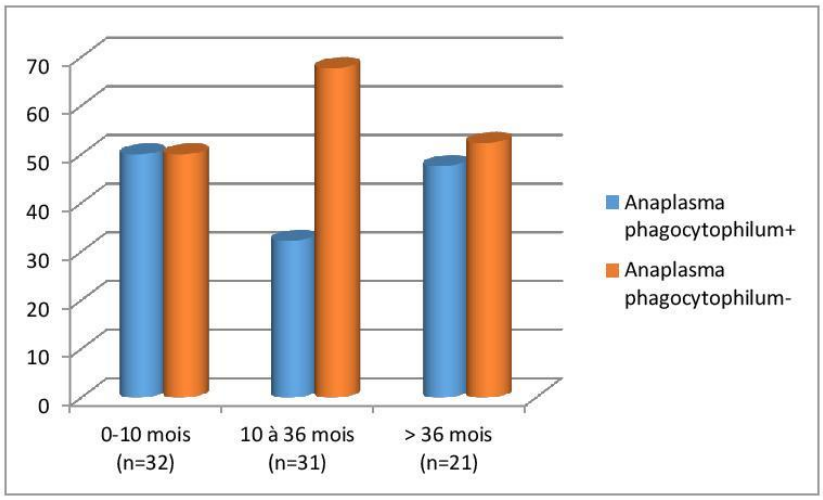

Figure 38 Relation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum avec* l'age

Le sexe

Le sexe des animaux prélevés a été reporté pour tous les individus. Ainsi, les sérums de 38 (45.33%) femelles et 46 (54.76%) ont été analysés (figure 39). Les anticorps anti-*Anaplamsa phagocytophilum* étaient détectés chez 17 (20.23%) males et 19 (22.61%) femelles. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux sexes (P> 0.05). Il n'y a donc aucune relation significative entre le sexe et la séroprévalence vis-à-vis d'*Anaplasma phagocytophilum.* Les résultats de l'analyse statistique sont consignés dans le tableau 5.

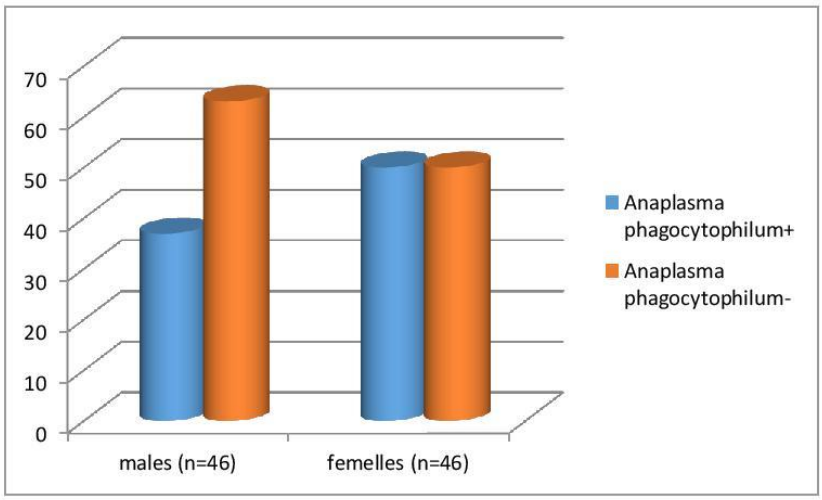

Figure 39 Relation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* avec le sexe

La race

Les chiens peuvent être classés en fonction de leur race. On distingue les chiens de race pure, les chiens issus de croisement de parents de race pure et de chien dont on ne connait pas le pedigree et dont il est difficile phénotypiquement de le déduire de façon évidente. On parlera de chiens de race et de chiens croisés.

La race de 84 chiens a été noté et repartie en trois catégories : race croisée, berger allemand et autre (berger belge, caniche, pitbull, rottweiler). Dans la troisième catégorie, nous avons décidé d'y regrouper 4 races en raison du faible effectif. Un total de 18 (21.42%) chiens étaient des Berger allemand, 61 (72.61%) étaient de race croisée et 5 (5.95%) étaient de différentes races (figure 40).

De façon intéressante, le nombre de chiens séropositifs est plus important chez les croisés (27.23%) que dans les autres types de chiens : berger allemand (11.9%) et autre catégorie (5.95%).

Si on analyse les races de chiens par statut sérologique, on ne constate pas de différences significatives dans aucune race (P> 0.05).

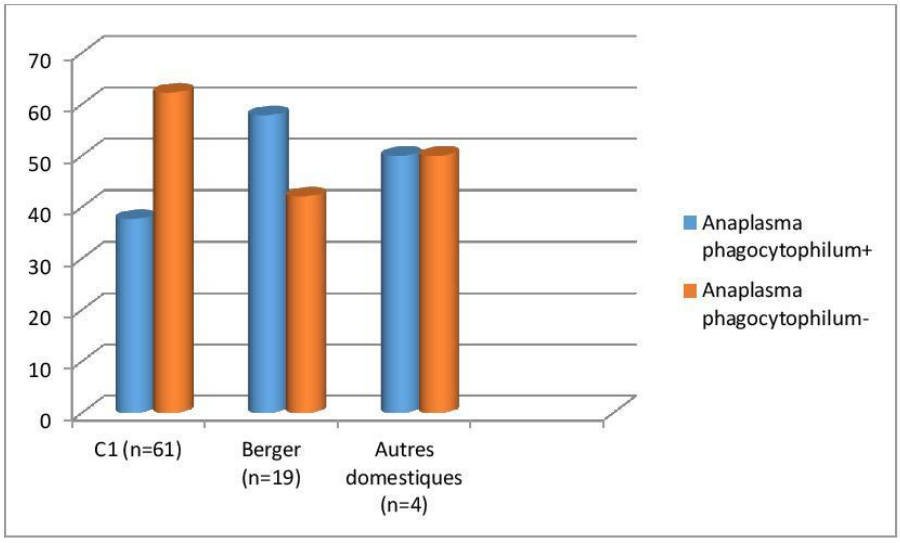

Figure 40 Relation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum avec* la race

Exposition aux tiques

Une récolte de tiques sur les chiens prélevés été également entrepris afin de connaître les tiques parasite du chien dans l'étude et de définir s'il y a relation entre ce parasitisme et le statut sérologique vis-à-vis d'*Anaplasma phagocytophylum*.

Parmi les 44 (52.3%) chiens présentant des ectoparasites, les males semblent un peu plus fréquemment infestés que les femelles (26.04% male et 19.8% femelle) (Figure 41).

Nous avons compté le nombre de tiques infestant le même individu, il apparait que 79.54% (35/44) des chiens inclus dans l'étude présentent au minimum une triple infestation.

Le prélèvement de tiques sur les chiens examinés a permis la récolte de 115 tiques reparties en 60 femelles, 31 males, 18 nymphes et 06 larves. *Rhipicephalus sanguineus* a été la seule espèce de tiques identifiée. Aucune tique du genre *Ixodes* n'a été collectée durant cette étude sur ces chiens. Or, nous avons déjà vu que le vecteur présumé d'*Anaplasma phagocytophilum* est une tique du genre *Ixodes* et plus précisément, la littérature et diverses études placent *Ixodes ricinus* comme vecteur principal de l'anaplasmose.

De façon intéressante, le nombre de séropositifs vis-à-vis d'*Anaplasma phagocytophilum* est plus important chez les chiens présentant des tiques 19 (21.43%). De plus si on analyse le parasitisme de chiens par statut sérologique, on constate une différence significative ($P < 0.05$).

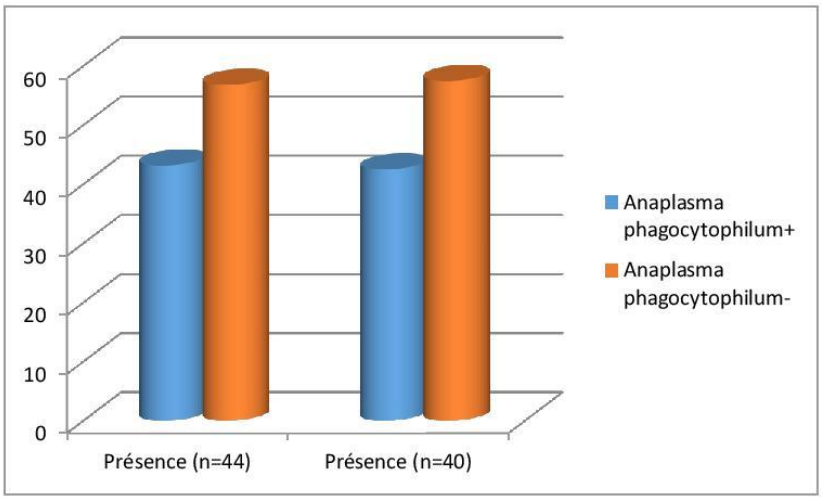

Figure 41 Relation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum avec* la présence et l'absence de tique

Variation saisonnière

Les prélèvements ont été réalisés principalement durant les saisons de l'été (juin-aout) 38 échantillons (45.23%) parmi lesquels 19 males (22.61%) et 19 femelles (22.61%) ; et de l'hiver (novembre-janvier) 44 échantillons parmi lesquels 25 males (29.76%) et 19 femelles (22.61%) (Figure 42).

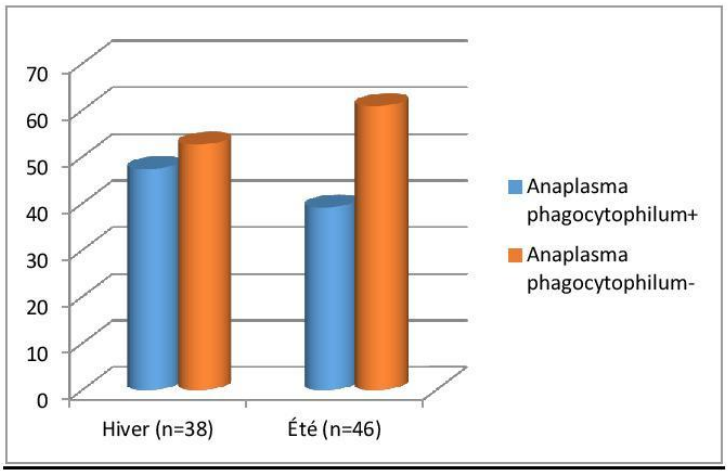

Figure 42 Relation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* avec la saison

La séroprévalence vis-à-vis d'*Anaplasma phagocytophilum* était la même aussi bien en été qu'en hiver (21.43%). Ainsi, si on considère les variations de séroprévalences en fonction de la saison du prélèvement, on constate aucune différence significative (P <0.05).

Tableau 4 Analyse statistique de la realtion satut sérologique d'*Anaplasma phagocytophilum* et des facteurs de risques.

	P
Age (30.17 ± 24.06)	**0.0415**
Sexe (%)	
M	**0.3118**
F	
Race (%)	
Croisé	
BA	**0.4835**

Canidés domestiques	
Ectoparasite (%)	
0	**0.049**
1	
Saison	
Été	**0.616**
Hiver	

ii. Séroprévalence d'*Ehrlichia canis*

Sur un total de 84 sérums de chien analysés, 39 (46.42%) se sont révélés positifs en IFI (Figure 43). Après analyse de tous les sérums par cette technique, 16 sérums ont subi un second test de dépistage sérologique utilisant le kit Via.

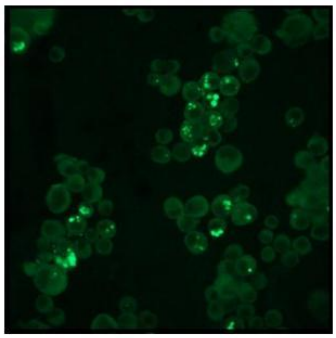

Figure 43 Immunofluorescence positive à *Ehrlichia canis* (Photo personnelle)

Les facteurs de risque

L'âge

Parmi les chiens séropositifs treize (15.47%) appartenaient à la classe d'âge des ≤10 mois, 16 (19.94%) à celle des 12-36 mois et enfin 10 (11.9%) à celle des > 36 (Figure 44).

De façon intéressante, il semble y avoir une association significative entre l'âge et la séroprévalence à *Anaplasma phagocytophilum* ($p < 0.05$).

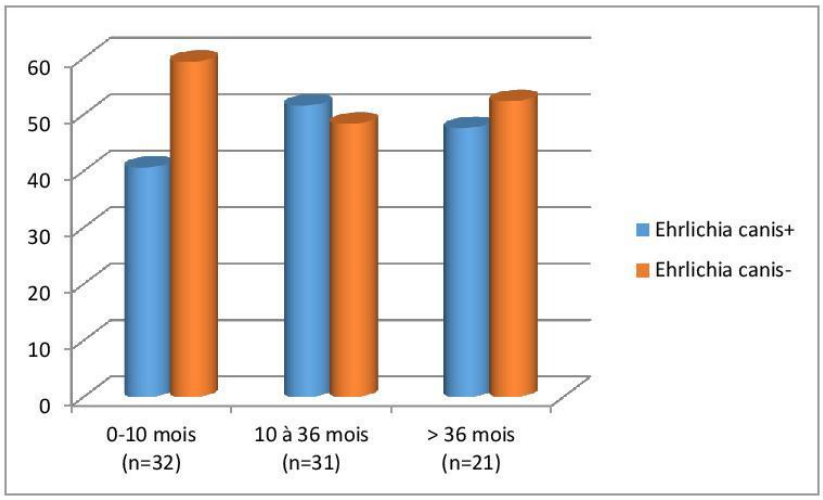

Figure 44 Relation de la séroprévalence d'*Ehrlichia canis avec* l'âge

Le sexe

Les anticorps anti-*Ehrlichia canis* étaient détectés chez 19 (22.62%) males et 20 (23.81%) femelles. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux sexes (P> 0.05) (Figure 45). Il n'y a donc aucune relation significative entre le sexe et la séroprévalence vis-à-vis d'*Ehrlichia canis*.

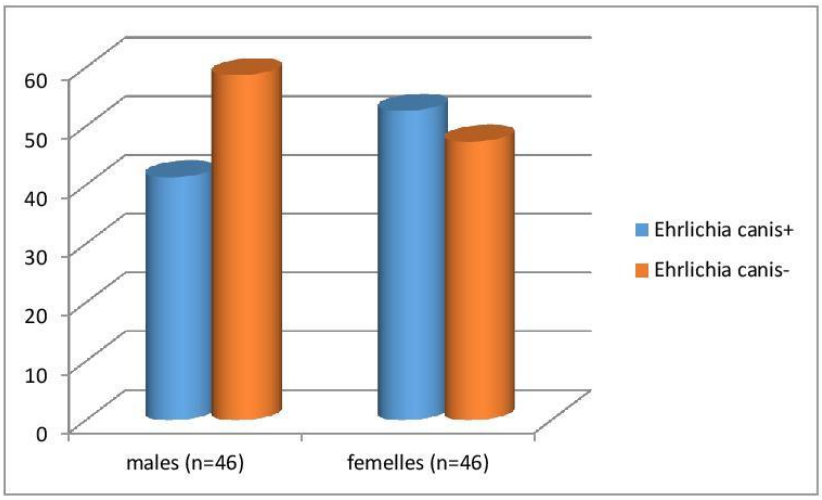

Figure 45 Relation de la séroprévalence d'*Ehrlichia canis* avec le sexe

La race

Parmi les séropositifs à *Ehrlichia canis*, 26 chiens étaient de race croisée (30.95%), 11 étaient des bergers allemands (13.09%) et enfin 02 étaient de différentes races (2.38%) (Figure 46).

Si on analyse les races de chiens par statut sérologique, on ne constate pas de différences significatives dans aucune race (P> 0.05).

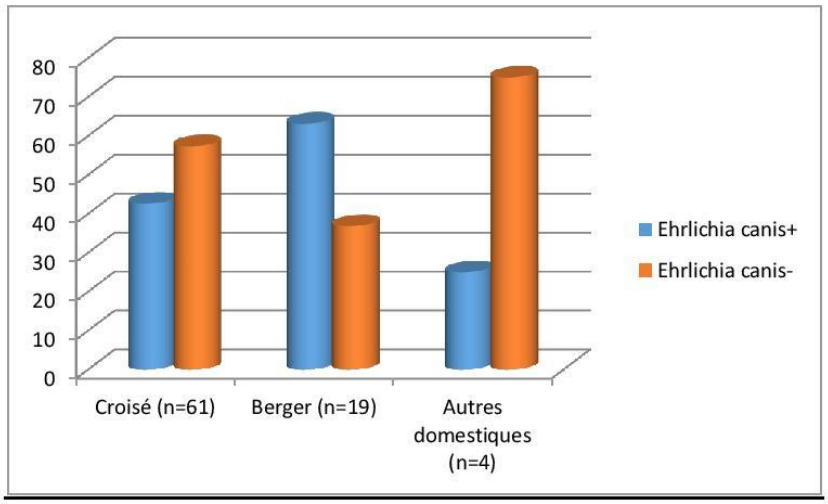

Figure 46 Relation de la séroprévalence d'*Ehrlichia canis* avec la race

Exposition aux tiques

Le nombre de séropositifs vis-à-vis d'*Ehrlichia canis* est plus élevé chez les chiens présentant des tiques 20 (23.43%) (Figure 47). De plus si on analyse le parasitisme de chiens par statut sérologique, on constate une différence significative (P <0.05).

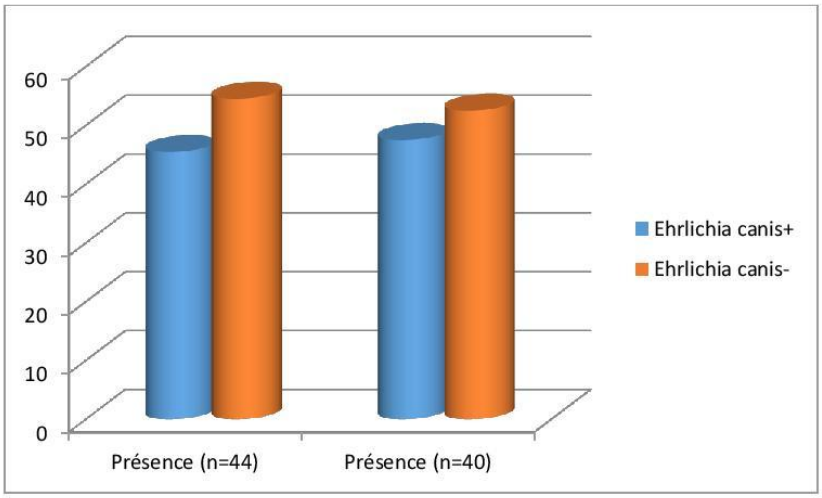

Figure 47 Relation de la séroprévalence d'*Ehrlichia canis* avec la présence ou l'absence de tiques

Variation saisonnière

La séroprévalence vis-à-vis d'*Ehrlichia canis* était de 25% (21/84) en hiver et de 21.43% (Figure 48) en été Ainsi, si on considère les variations de séroprévalences en fonction de la saison du prélèvement, on ne constate aucune différence significative (P > 0.05). Les résultats de l'analyse statistique sont consignés dans le tableau 6.

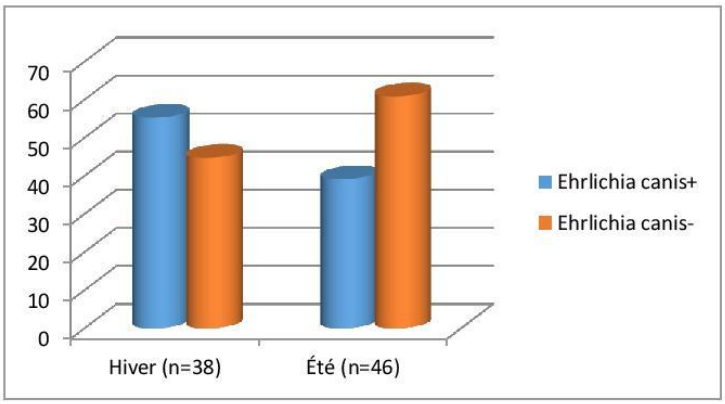

Figure 48 Relation de la séroprévalence d'*Ehrlichia canis* avec la saison

Tableau 5 Analyse statistique de la realtion satut sérologique d'*Ehrlichia canis* et des facteurs de risques.

	P
Age (30.17 ± 24.06)	**0.04424**
Sexe (%) M F	**0.296**
Race (%) Croisé BA Autres canidés domestiques	**0.2731**
Ectoparasite (%)	**0.045**
Saison (%) Été Hiver	**0.059**

iii. Séroprévalence *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Sur un total de 84 sérums de chien, seuls 60 ont été analysés. Ainsi, 32 (53.33%) se sont révélés positifs en IFI (Figure 49). Après analyse de tous les sérums par cette technique, 16 sérums ont subi un second test de dépistage sérologique utilisant le kit Via.

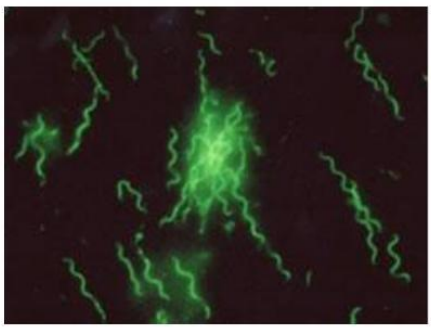

Figure 49 Immunofluorescence positive à *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Photo personnelle)

Les facteurs de risque

L'âge

Parmi les chiens séropositifs dix-sept (28.33%) appartenaient à la classe d'âge des ≤10 mois, 14 (23.33%) à celle des 12-36 mois et enfin 01 (1.66%) à celle des > 36 (Figure 50). Globalement, on ne constate différence significative selon l'âge (P > 0.05)

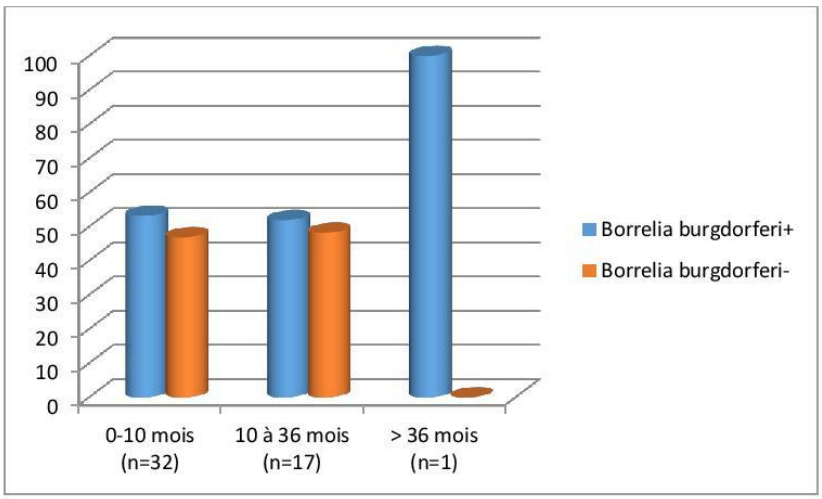

Figure 50 Relation de la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi sensu lato* avec l'âge

Le sexe

Les anticorps anti- *Borrelia burgdorferi sensu lato* étaient détectés chez 17 (28. 33%) males et 15 (25%) femelles (Figure51). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux sexes (P> 0.05). Il n'y a donc aucune relation significative entre le sexe et la séroprévalence vis-à-vis de *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

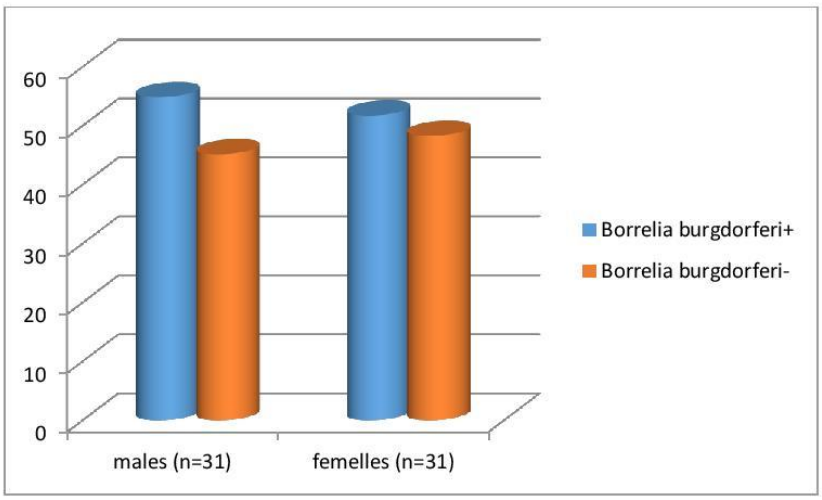

Figure 51 Relation de la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi sensu lato* avec le sexe

La race

Parmi les séropositifs à *Borrelia burgdorferi sensu lato*, 22 chiens étaient de race croisée (36.67%), 09 étaient des bergers allemands (15%) et enfin 01 était de différentes races (1.67%) (Figure 52).

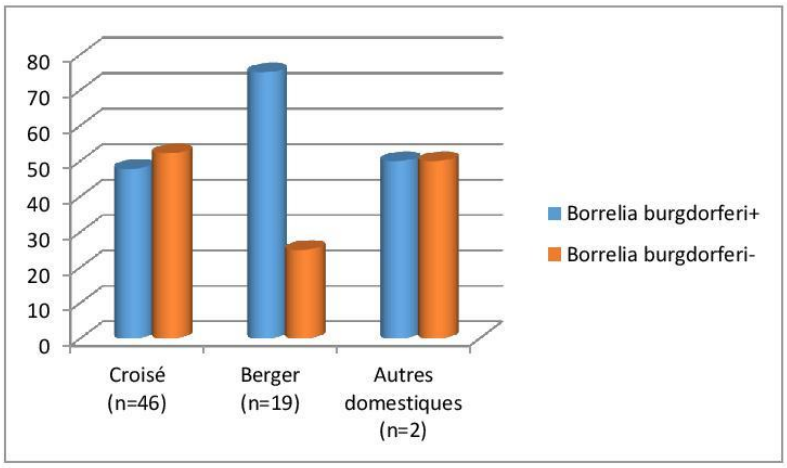

Figure 52 Relation de la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi sensu lato* avec la race

Si on analyse les races de chiens par statut sérologique, on ne constate pas de différences significatives dans aucune race (P> 0.05).

Exposition aux tiques

Le nombre de séropositifs vis-à-vis de *Borrelia burgdorferi sensu lato* est plus élevé chez les chiens présentant des tiques 18 (30%) (Figure 53). De plus si on analyse le parasitisme de chiens par statut sérologique, on ne constate aucune différence significative (P> 0.05).

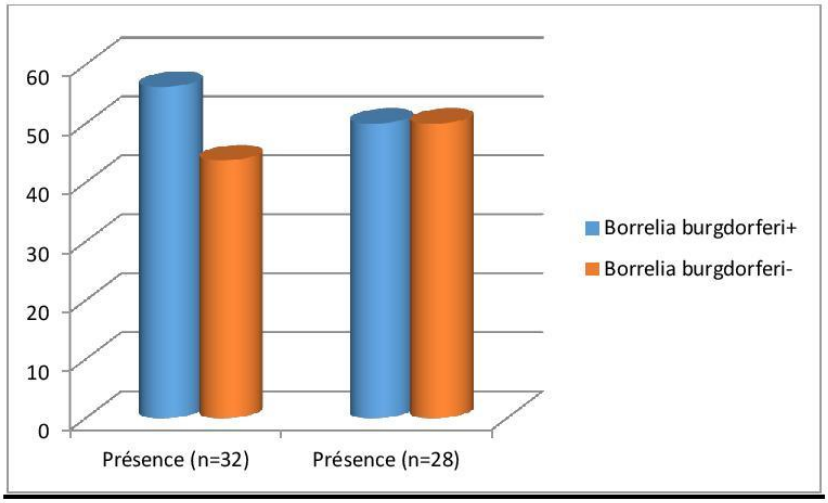

Figure 53 Relation de la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi sensu lato* avec la présence ou l'absence de tiques

Variation saisonnière

La séroprévalence vis-à-vis de *Borrelia burgdorferi sensu lato* était la même (26.67%) dans les deux saisons (Figure 54). Ainsi, si on considère les variations de séroprévalences en fonction de la saison du prélèvement, on ne constate aucune différence significative ($P > 0.05$). Les résultats de l'analyse statistique sont consignés dans le tableau 7.

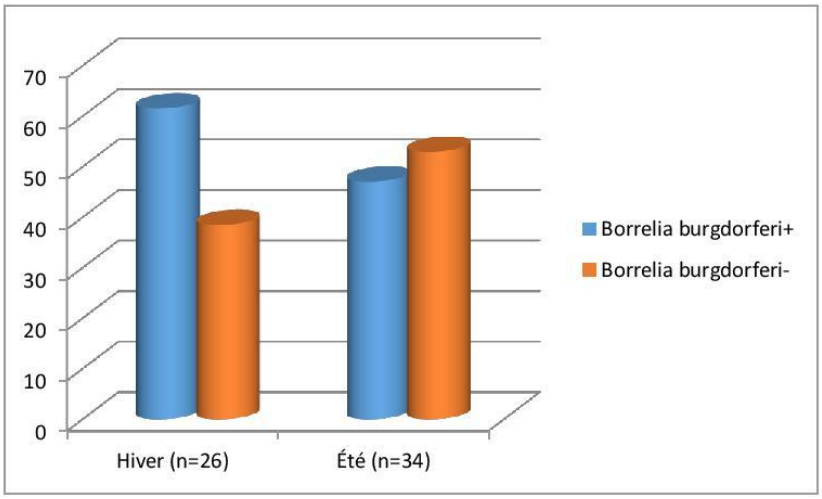

Figure 54 Relation de la séroprévalence de *Borrelia burgdorferi sensu lato* avec la saison

Tableau 6 Analyse statistique de la realtion satut sérologique de *Borrelia burdorferi* et des facteurs de risques.

	Valeur P
Age (15.95 ± 24.068)	**0.07752**
Sexe (%) M F	**0.91**
Race (%) Croisé BA Autres canidés	**0.2057**
Ectoparasite (%) 0 1	**0.0533**
Saison (%) Été Hiver	**0.3433**

iv. Cas de coïnfections :

Le nombre de chiens séropositifs pour deux agents infectieux ou pour les trois agents est présenté dans le tableau 8 ci-dessous. Ce nombre varie de 11.67% à 30% pour les associations deux à deux. Sept chiens sont séropositifs pour les 3 agents.

La probabilité d'être séropositif à deux agents infectieux ou 3 à la fois ne semble pas être significative en fonction de la race et du sexe de l'animal ($p>0.05$). Toutefois, il existe une association significative entre le statut sérologique du chien et son âge ainsi que la présence de tiques ($p<0.05$). Les résultats de l'analyse statistique sont consignés dans le tableau 9.

Tableau 7 Séroprévalence des coïnfections par deux et trois agents en fonction

	A et B*	**B et E***	**A et E***	**A, B et E***
Nb de positif	18 (30%)	13 (21.67%)	18 (21.43%)	07 (11.67%)
Sexe				
Male	6 (33.33%)	4 (30.76%)	7 (38.88%)	0 (0%)
Femelle	12 (66.66%)	9 (69.23%)	11 (61.11%)	7 (100%)
Race				
C1	12 (66.66%)	9 (69.23%)	9 (50%)	4 (57.14%)
C2	6 (33.33%)	4 (30.76%)	8 (44.44%)	3 (42.85%)
C3	0 (0%)	0 (0%)	1 (5.55%)	0 (0%)
Âge				
≤10	11 (61.11%)	6 (46.15%)	5 (27.77%)	3 (42.85%)
12-36	6 (33.33%)	7 (53.84%)	6 (33.33%)	4 (57.14%)
>36	1 (5.55%)	0 (0%)	7 (38.88%)	0 (0%)
Tique				
Présence	11 (61.11%)	9 (69.32%)	9 (50%)	5 (71.42%)
Absence	7 (38.88%)	4 (30.76%)	9 (50%)	2 (28.57%)

A et B* *Anplasma phagocytophilum/ Borrelia burgdorferi*

B et E* *Borrelia burgdorferi / Ehrlichia canis*

A et E* *Anplasma phagocytophilum/ Ehrlichia canis*

A, B et E* *Anplasma phagocytophilum/ Borrelia burgdorferi/ Ehrlichia canis*

C1 Berger allemand

C2 Croisé

C3 Autres

Tableau 8 Analyse statistique de la realtion satut sérologique de la coinfection *Anplasma phagocytophilum/ Ehrlichia canis* et des facteurs de risques.

	Valeur de P
Age (15.95 ± 24.068)	**0.03475**
Sexe M F	**0.2454**
Race (%) Croisé BA Autre	**0.2269**
Ectoparasite 0 1	**0.047**
Saison Été Hiver	**0.087**

Tableau 9 Analyse statistique de la realtion satut sérologique de la coinfection *Anplasma phagocytophilum/ Borrelia burgdorferi* et des facteurs de risques.

	Valeur de P
Age (15.95 ± 24.068)	**0.03444**
Sexe (%)	
M	**0.078**
F	
Race (%)	
Croisé	**0.3226**
BA	
Autres	
Ectoparasite (%)	
0	**0.04096**
1	
Saison (%)	
Été	**0.2916**
Hiver	

Tableau 10 Analyse statistique de la realtion satut sérologique de la coinfection *Borrelia burgdorferi Ehrlichia canis* et des facteurs de risques.

	Valeur de P
Age (15.95 ± 24.068)	**0.04229**
Sexe (%)	
M	**0.1161**
F	
Race (%)	
Croisé	**0.0921**
BA	
Autres canidés domestiques	
Ectoparasite (%)	
0	**0.03464**
1	
Saison (été/hiver) (%)	**0.309**

Tableau 11 Analyse statistique de la realtion satut sérologique de la coinfection *Anplasma phagocytophilum/ Ehrlichia canis /Borrelia burdorferi* et des facteurs de risques.

	Valeur de P
Age (15.95 ± 24.068)	**0.0486**
Sexe (%)	
M	**0.0051**
F	
Race (%)	
Croisé	**0.2375**
BA	
Autres canidés domestiques	
Ectoparasite (%)	
0	**0.0442**
1	
Saison (%)	
Été	**0.052**
Hiver	

b) Les canidés sauvages :

Sur un total de 12 sérums de canidés sauvages analysés, 5 (41.67%) se sont révélés positifs à *Anaplasma phagocytophilum* et 3 (25%) à *Ehrlichia canis.* Les animaux testés se sont avérés séronégatifs vis-à-vis de *Borrelia burgdorferi sensu lato.*

Tableau 12 Descriptions de la population des canidés sauvages

Espèce	**AP***	**EC***	**BB***
Fennec (n=7)	2 (16.67%)	2 (16.67%)	0
Renard (n=3)	3 (25%)	1 (8.33%)	0
Chacal (n=2)	0	0	0

AP* *Anaplasma phagocytophilum*

EC* *Ehrlichia canis*

BB* *Borrelia burgdorferi sensu lato*

3) RÉSULTATS DE L'ANALYSE SÉROLOGIQUE À L'AIDE DU TEST KIT VIA

Seize chiens (19 %) de l'échantillon total (n=84) ont été testés avec les agents pathogènes du test kit via : 15 individus (93.7%, n=16) séropositifs pour *Anaplasma phagocytophilum*, 8 individus (50%, n=16) pour *Ehrlichia canis*, 0 individu (0%, n=16) pour *Borrelia burgdorferi* et 7 individus (43.75, n=16) pour *Dirofilaria immitis.* D'autre part, l'analyse des animaux sauvages par ce test n'a révélé aucune positivité vis-à-vis des quatre agents pathogènes.

4) COMPARAISON DES DEUX TECHNIQUES SÉROLOGIQUES IFI ET KIT VIA

Sur les 16 sérums KIT VIA réalisés, nous avons noté une bonne concordance avec l'IFI vis-à-vis d'*Anaplasma phagocytophilum* et d'*Ehrlichia canis*. Cependant une faible spécificité du KITVIA par rapport à l'IFI vis-à-vis de *Borrelia burgdorferi sensu lato* a été relevée. Compte-tenu toutefois du nombre très limité de sérums testés simultanément par ces deux méthodes, il serait hasardeux de conclure à un manque de spécificité de KIT VIA par rapport à l'IFI.

Tableau 13 Comparaison entre l'IFI et l'immunochromatographie

	IFI (n=16)	KITVIA (n=16)
Anaplasma phagocytophilum	8 (52,63%)	15 (93,75%)
Ehrlichia canis	8 (50%)	8 (50%)
Borrelia burgdorferi sensu lato	9 (56,25%)	0 (0%)

Anaplasma phagocytophilum

a) Coefficient de Kappa: - 0.56 : il y a un désaccord total pour les deux techniques. Coefficient de concordance

b) IFI = gold standard

Se = 11.11%

Sp = 70%

Fiabilité = 42.1%

RVP = 0.37 : rapport de vraisemblance positif

RVN =1.27

Fiabilité : 42.1% des cas donnent des résultats semblables dans les vrais positifs ou les vrais négatifs.

RVP = 0.37 : <1 : le kit via a plus de chance de donner des résultats séropositifs dans des résultats IFI séronégatifs (alors que si c'était >1 nous aurions dit KITvia donne des positifs comme les positifs IFI

RVN =1.27

Borrelia burgdorferi sensu lato

a) Coefficient de Kappa : incalculable

b) IFI = gold standard

Se = incalculable

Sp = incalculable

Fiabilité = 43.75%

RVP = incalculable

Ehrlichia canis

a) Coefficient de Kappa : -0.22

b) IFI = gold standard

Se = 81.81%

Sp = 37.5%

Fiabilité = 63.15%

RVP = 1.31

RVN = 0.49

5) RECHERCHE DES ANTICORPS ANTINUCLÉAIRES

Même s'il est difficile de tirer des conclusions à partir d'un échantillon aussi réduit, il semble néanmoins que l'infection d'un chien par *Anaplasma phagocytophilum* et/ou par *Borrelia burgdorferi sensu lat*o et/ou Ehrlichia *canis* est un facteur favorisant l'apparition d'une maladie autoimmune (Figure 55).

Tableau 14 Association de la séroprévalence *Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi* et *Ehrlichia canis* avec la présence d'anticorps antinucléaires

	A* (n=34)	E *(n=37)	B* (n=32)	AB (n=19)	AE (n=16)	BE (n=13)	AEB (n= 7)
AAN+	6 (17.64%)	9 (24.32)	7 (21.87)	3(15.78%)	3(18.75%)	3(23.07%)	1(14.28%)
AAN-	28(82.23%)	28(75.67%)	25(78.12%)	16(84.21%)	13(81.25%)	10(76.92%)	6(85.71%)

A/*Anaplasma phagocytophilum*, B/ *Borrelia burgororferi sensu lato*, E/ *Ehrlichia canis*

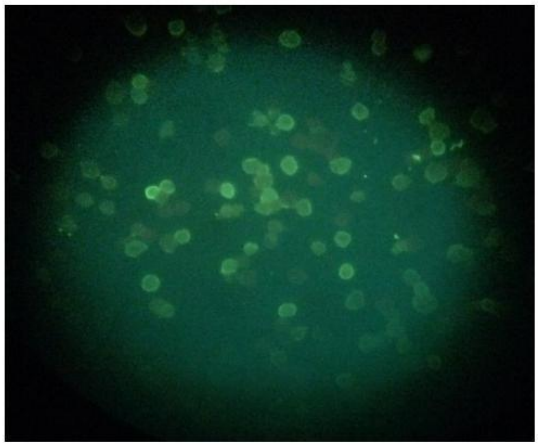

Figure 55. Présence d'Anticorps antinucléaires par immunofluorescence (Photo personnelle)

DISCUSSION

L'objectif défini initialement pour l'étude a bien été atteint puisque 84 chiens de fourrière et douze canidés sauvage ont pu être analysés en tout. Différentes raisons peuvent être avancées pour expliquer cet effectif réduit : tout d'abord, l'inconvénient de la méthode de prélèvement des canidés sauvages et la difficulté d'accès aux établissements zoologiques. D'autre part, les kits nécessaires à notre travail de recherche étaient peu disponibles voir inaccessibles en terme de cout d'achat.

1) QUELLES SONT LES METHODES SEROLOGIQUES LES PLUS ADAPTEES A LA DETECTION *D'ANAPLASMA PHAGOCYTOHILUM*, *BORRELIA BURGDOREFRI SENSU LATO* ET *EHRLICHIA CANIS* CHEZ LE CHIEN ?

Pour mettre en évidence un contact éventuel entre le chien et ces pathogènes, on peut utiliser différentes approches. La plupart du temps l'infection de l'animal passe inaperçue, par conséquent, le recours aux différents outils diagnostiques est systémique pour une approche cohérente lors d'une infection par ces bactéries. Outre les examens de diagnostic direct basés sur la bactériologie ou la recherche d'ADN par des techniques de biologie moléculaire. Des méthodes sérologiques directs (mise en évidence d'antigène) ou indirects (observation d'une réponse immunitaire de l'hôte) sont commercialisées pour le diagnostic de certaines maladies à transmission vectorielle. La sérologie est une des pierres angulaires du diagnostic et elle peut s'appliquer chez l'animal retrouvé malade ou mort. Ainsi, elle reste la seule méthode fiable pour des études épidémiologiques notamment celles destinées à estimer la séroprévalence d'une infection par *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* et *Ehrlichia canis*.

Parmi les principales techniques sérologiques utilisées dans ce travail, on trouve l'IFI qui est la méthode la plus utilisée et qui fait toujours référence, compte-tenu de sa grande sensibilité et de sa bonne spécificité (Chapman et al., 2006 ; Reller et Dumler, 2015). Le seuil de positivité retenu est le 1/50^{e}. Selon les auteurs ayant réalisé des sérologies par immunofluorescence sur des chats, des chiens ou des hommes, les seuils retenus pour définir un sérum comme positif sont soit le 1/50^{e} soit le 1/64^{e}. Ces seuils sont donc communément admis ce qui n'empêche pas les réactions croisées (Hollingdale et al., 1978). Ainsi, en

réalisant le criblage au 1/50^{e}, nous avons augmenté la sensibilité de notre détection pour éviter d'avoir trop de faux négatifs.

Notre étude expérimentale avait également pour but d'évaluer la concordance des résultats d'analyse sérologique obtenu par IFI avec ceux du kit VIA ® canin. Il s'agit d'un test de diagnostic *in vitro* permettant la détection d'antigènes de *Dirofilaria immitis* et d'anticorps dirigés contre *Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi* (anticorps anti-C6) et *Ehrilichia canis* dans le sérum, le plasma ou le sang entier canin. La sensibilité annoncée par le fournisseur est de 98,8% et la spécificité de 100%. Ces deux valeurs sont bonnes et laissent à penser que ce test est de bonne qualité. En effet, avec un tel test nous devions nous attendre à ce que tous les cas positifs observés en IFI soient confirmés par ce KIT. En effet, au terme de cette analyse, nous avons noté une concordance avec l'IFI vis-à-vis d'*Ehrlichia canis* mais une faible concordance vis-à-vis de *Anaplasma phagocytophilum,* et aucune concordance pour *Borrelia burgdorferi sensu lato*. De plus en comparant ce test immunochromatographie rapide avec l'IFI par une analyse statistique, nous avons noté une absence de corrélation significative (Coefficient de Kappa : - 0.56) avec les mêmes résultats chez 19% des échantillons testés. Cette absence de corrélation a également été observée dans une étude réalisée en Suisses en Europe (Gerber et al., 2009). Le résultat de cette comparaison, ne nous permet pas de conclure sur la bonne ou non fiabilité du test kit via par rapport à la méthode sérologique de référence l'IFI. Cependant nous pouvons considérer que la facilité d'emploi de ce type de kit en fait un outil très utile pour le vétérinaire au sein de sa clinique et lui permettra de prendre une décision thérapeutique immédiate lors de maladies vectorielles.

2) QUELLE EST LA SEROPREVALENCE *D'ANAPLASMA PHAGOCYTOHILUM*, *BORRELIA BURGDOREFRI SENSU LATO* ET *EHRLICHIA CANIS* CHEZ LES CHIENS DE FOURIERE A ALGER ?

La proportion de chiens positifs retenue suite à notre étude s'élève à 42.85%, 46.42% et 53.33% pour *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* et *Borrelia burgdorferi sensu lato* respectivement. L'échantillon réalisé au sein de la population de canidés domestiques avait pour but d'être le plus large possible pour permettre un traitement statistique. En raison des contraintes de terrains et des moyens, il a été réduit. Cependant, la sélection des animaux a permis que cet échantillon soit représentatif au moins pour les canidés domestiques. Nous

allons tenter de les comparer aux données présentées dans la bibliographie tout en restant conscients des limites de notre étude.

En 2015, une étude a été réalisée en Algérie et a permis l'analyse de 213 sérums de chiens de fourrière vis à vis d'*Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi*. Le niveau de prévalence obtenue pour chaque agent bactérien était respectivement de 30 %, 47.7%, 37.6% et 37.5%. Ainsi ces pourcentages sont comparables aux notre et à ceux décris dans la littérature (Banet *et al*., 1998 ; Mircean *et al*., 2012 ; Cardoso *et al*., 2012). Cependant, nos pourcentages étaient nettement plus élevés que ceux décris dans une étude espagnole (16.8%, 1.07%, 11.5% et 0.6%) (Solano-Gallego *et al*., 2006).

Dans ce travail, nous avons pu noter des cas de coïnfection avec un plus fort pourcentage pour une coïnfection vis-à-vis d'*Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Cependant, il est important de faire attention à l'interprétation lorsqu'on effectue un simple screening. Les réactions croisées entre ces bactéries peuvent poser des problèmes d'interprétation, notamment pour l'IFI, les tests de type ELISA ou les tests immuno-chromatographiques. Ces tests isolés ne permettent pas forcément de faire la différence entre des infections par des espèces différentes et pour des infections dues à plusieurs espèces du même genre. Également, certains antigènes, comme les protéines de surface, sont conservés à travers tous les groupes, et croisent également potentiellement avec la famille *Rickettsiaceae* (Waner et al., 2001)

3) QUELS SONT LES FACTEURS DE RISQUE LIES A UNE SEROPOSITIVITE VIS-A-VIS *D'ANAPLASMA PHAGOCYTOHILUM*, *BORRELIA BURGDOREFRI SENSU LATO* ET *EHRLICHIA CANIS* CHEZ LE CHIEN ?

Il existe une association significative entre une sérologie positive à *A. phagocytophilum* ou *Ehrlichia canis* et l'âge des chiens. Cette association a également été décrites dans plusieurs études similaires (Movilla et al., 2016 ; Yuasa et al., 2012).

Le pourcentage de séropositifs observés était également étroitement associé à l'exposition aux tiques. En effet, le taux de séropositivité était plus élevé chez les chiens

présentant des tiques. Cette association n'est pas étonnante et cela a été décrit dans plusieurs enquêtes épidémiologiques similaire (Hamel et al., 2012). Le vecteur principal dans les pays nord méditerranéen, commun à ces bactéries est la tique dure *Ixodes ricinus.* Bien que ce vecteur ait été identifié an Algérie par Dib et ces collaborateurs (Bouattou et *al*., 2004 ; Dib *et al*., 2009), nous n'avons pas pu l'isoler parmi les tiques récoltées. Cependant, l'hypothèse d'une vectorisation de ces pathogènes par des tiques autres qu'*Ixodes ricinus* n'est pas à exclure.

4) QUELLE EST LA SEROPREVALENCE *D'ANAPLASMA PHAGOCYTOHILUM*, *BORRELIA BURGDOREFRI SENSU LATO* ET *EHRLICHIA CANIS* CHEZ LES CANIDES SAUVAGES A ALGER ?

Cette étude ne nous fournit que des résultats qualitatifs, de présence de ces bactéries chez les canidés sauvages. Si nous avions eu plus de moyens financiers, il aurait été intéressant d'augmenter la taille de nos échantillons par espèce animale. Ce qui nous aurait permis d'établir un taux de prévalence, et de déterminer si la prévalence était significativement différente ou non entre les différentes espèces. Même si les pourcentages ne sont pas interprétables, au vu du nombre d'échantillon (n=12), on peut supposer que la séroprévalence globale est au moins de l'ordre de 41.67% vis-à-vis de *Anaplasma phagocytophilum* et de 25% pour *Ehrlichia canis.*

5) LES INFECTIONS PERSISTANTES A *ANAPLASMA PHAGOCYTOHILUM*, *BORRELIA BURGDOREFRI SENSU LATO* ET *EHRLICHIA CANIS* CHEZ LE CHIEN SONT-ELLES DES CAUSES DE REACTION IMMUNITAIRES PATHOLOGIQUES ?

Au terme de cette recherche, nous avons pu noter que près de 20% des chiens séropositifs aux *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* et *Borrelia burgdorferi sensu lato* en IFI présentaient des anti corps anti-nucléaires. Les résultats obtenus concordent avec ceux révélés dans de nombreuses études dans lesquels environ 10% des maladies auto-immunes telles que la polyarthrite ou le lupus érythémateux disséminé du chien ont pour origine étiologique une bactérie hémotrope à transmission vectorielle, mise en évidence après un examen complémentaire (Breitschwerdt et al., 2002 ; Legendre, 2002 ; Summers et al., 2005)

CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS

Au terme de ce travail, nous avons pu apporter la preuve de la circulation de *Anaplasma phagocytophilum,* et de *Ehrlichia canis* chez les canidés sauvages et les chiens de fourrières ainsi que *Borrelia burgdorferi sensu lato* chez ces derniers. Dans ce cadre, l'IFAT, reste l'outil sérologique de prédilection dans le cas d'infection par ces pathogènes.

La séroprévalence des chiens testés aux antigènes de *Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia cani* et *Borrlia burgdorferis* suggère la forte exposition de la population canine à ces trois agents bactériens vectorisés avec une fréquence plus élevée pour le dernier pathogène. L'évaluation statistique met en évidence une relation entre le statut sérologiques des chiens et leur âge et/ou la présence de tiques.

Lors de notre étude, nous avons mis en évidence l'existence sur les chiens d'un seul genre de tiques : *Rhipicephalus*. Aucune tique du genre *Ixodes* n'a été récoltée bien qu'il s'agisse du vecteur théorique de l'anaplasmose canine.

Le nombre relativement important de séropositifs à plusieurs valences antigéniques permet de supposer que les vecteurs de transmission de ces trois genres bactériens peuvent être partagés.

De façon intéressante et pour la première la fois, nous avons également pu montrer qu'une séropositivité à *Anaplamsa phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* et *Ehrlichia canis* était souvent associée à la présence d'anticorps anti nucléaires. Cette donnée, nous permet d'émettre l'hypothèse que ces pathogènes pouvaient être les agents étiologiques de certaines affections auto-immunes du chien

Notre étude a permis de comparer les résultats du test sérologiques rapide, KITVIA ® sur16 sérums testés et d'évaluer cette technique par rapport à la méthodes sérologique de référence (IFI). Certains sérums, notamment ceux qui étaient positif en IFI vis-à-vis d'*Anaplamsa phagocytophilum* et *borrelia burgodorferi sensu lato* ont montré une

discordance. L'évaluation des paramètres de sensibilité, spécificité et le coefficient de kappa a révélé une faible concordance entre les deux tests.

D'autre part, l'analysé sérologiques de quelques canidés sauvages a permis de mettre en évidence pour la première fois une séropositivité vis à vis de *Anaplasma phagocytophilum* et *Ehrlichia canis*.

Par conséquent, à l'issu de ces résultats, nous pouvons conclure que *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi* sont transmis aux carnivores domestiques de fourrière. Compte tenu de leur pouvoir pathogène potentiel pour les espèces domestiques et de leur potentiel zoonotique, ces agents bactériens devraient systématiquement figurer dans le diagnostic différentiel des maladies infectieuses vectorisées chez les carnivores.

Quelles sont les mesures prophylactiques à pendre en vue des résultats obtenus ?

- En médecine vétérinaire, le traitement acaricide des animaux pour limiter l'attachement des tiques est largement pratiqué dans les zones infestées. Mais il conduit à l'apparition de résistance et constitue une contrainte économique. Ainsi, la mise au point de nouveaux outils (produits insecticides et technologies de pulvérisation) pour combattre les vecteurs et maîtriser la maladie sont en cours d'étude.

- Le contrôle des populations de tiques est extrêmement difficile à mettre en œuvre à grande échelle. Les techniques de lutte indirecte qui consistent à intervenir sur l'environnent naturel des tiques sont, soit difficiles à mettre en œuvre soit écologiquement inacceptables.

- D'autres mesures prophylactiques consistent à fournir les meilleures données factuelles possibles en vue de combattre les vecteurs et de protéger les animaux de l'infection ; en proposant des formations aux vétérinaires sur la prise en charge clinique, le diagnostic et la lutte anti vectorielle.

Existe-t-il un vaccin contre ces agents bactériens ?

Actuellement, il n'existe aucun vaccin contre ces maladies bactériennes. Cependant, une stratégie de lutte prometteuse, mais actuellement confinée aux vecteurs et plus spécifiquement à une seule espèce d'*Ixodidé*, consiste à utiliser un vaccin « antitique » dirigé contre des antigènes de l'intestin des tiques. L'application pratique de ce vaccin est actuellement limitée à la lutte contre *Boophilus microplus*, une tique du bétail, en Australie et dans certains pays d'Amérique centrale. Des recherches sont menées actuellement dans de nombreux laboratoires pour développer des vaccins contre *R. sanguineus*, ou *Ixodes* sp.. Parmi les molécules candidates, des antigènes sécrétés (antigènes salivaire ou du cément) et internes (cellules digestives) sont à l'étude.

Peut-on éliminer ces agents bactériens par voie médicamenteuse ?

- Le traitement de l'ehrlichiose monocytaire canine repose sur l'utilisation d'agents anti rickettsiens et d'une thérapeutique de soutien. Les tétracyclines sont les médicaments les plus couramment utilisés, la doxycycline une fois par jour à la dose de 2 x 5 mg/kg par jour pendant 3 semaines étant le protocole thérapeutique de référence. Chez les chiens infectés par *E. canis*, la disparition de la thrombopenie constitue un bon indicateur d'une réponse favorable au traitement. Les cas d'ehrlichiose monocytaire canine chroniques sévères chez le chien sont de mauvais pronostic.

- Le traitement de la thrombopénie cyclique et de l'anaplasmose granulocytaire repose sur l'utilisation d'agents anti-rickettsiens et d'une thérapeutique de soutien. Les tétracyclines sont les médicaments les plus couramment utilisés. Le protocole thérapeutique de référence utilise la doxycycline une fois par jour à raison de 2 x 5 mg/kg pc pendant 4 semaines.

- Les études concernant le traitement de la maladie de Lyme chez le chien ont donné des résultats variables mais une réponse à la thérapeutique antibiotique peut être attendue en 1 ou 2 jours en cas de polyarthrite, alors que la réponse prendra plus de temps chez

les chiens souffrant de néphropathie. Les études chez les chiens expérimentalement infectés ont montré que le traitement antibiotique n'élimine pas l'infection chez tous les chiens. Le médicament de choix est la doxycycline, à 2 x 5 mg/ kg per os une fois par jour pendant 1 mois au minimum.

PERSPECTIVES

Notre travail pose un certain nombre de questions et nécessite des confirmations qui pourront faire l'objet de travaux ultérieurs :

- D'une part, la confirmation des études sérologiques chez les chiens nécessite de rechercher par biologie moléculaire la présence de *A. phagocytophilum, Borrelia burgdorferi sensu lato* et *Ehrlichia canis*. dans le sang. Si cette recherche s'avérait positive, le typage des souches serait intéressant dans l'optique de statuer sur leur caractère zoonotique.

- La recherche et l'identification d'autres bactéries hémotropes vectorisées chez les carnivores domestiques est une prolongation évidente de ce travail.

- De plus, il serait maintenant intéressant de rechercher la bactérie dans les tiques récoltées par la technique PCR et d'identifier de façon plus précise les vecteurs qui semblent différents en Algérie et d'évaluer les facteurs de risque de transmission de ces agents.

- Par ailleurs, comme nous l'avons déjà évoqué, il serait intéressant de renouveler les récoltes d'échantillons à d'autres périodes de l'année et sur un plus grand nombre afin d'avoir une vision plus représentative de la répartition de ces maladies bactériennes ainsi que des tiques et de leur activité.

Références bibliographiques

Adelson ME., Rao RVS., Tilton R C., Cabets K., Eskow E., Fein L., Occi J L., Mordechai E., 2004: Prevalence of Borrelia burgdorferi,Bartonella spp.,Babesia microti, andAnaplasma phagocytophila inIxodes scapularis ticks collected in northern New

Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18:** 484–509.

Aguero-Rosenfeld ME., 2002: Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: State of the art. Vector Borne Zoonotic Dis;2:233–239.

Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schoen, R. T., ... & Flavell, R. A. (2002). Hyporesponsiveness to vaccination with Borrelia burgdorferi OspA in humans and in TLR1-and TLR2-deficient mice. *Nature medicine*, *8*(8), 878-884.

Alitalo A, Meri T, Lankinen H, Seppälä I, Lahdenne P, Hefty PS, Akins D, Meri S. Complement inhibitor factor H binding to Lyme disease spirochetes is mediated by inducible expression of multiple plasmid-encoded outer surface protein E paralogs. J Immunol. 2002;169:3847–3853.

Alves AS., MIilhano N., Santos-Silva M., Santos AS., Vilhena M., De Sousa R., 2009 : Evidence of Bartonella spp., Rickettsia spp. and Anaplasma phagocytophilum in domestic, shelter and stray cat blood and fleas, Portugal. Clin Microbiol Infect. Dec;15 Suppl 2:1-3. Epub Mar 26.

Amusategui I., Tesouro MA., Kakoma I., Sainz A., 2008 : Serological reactivity to Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Neorickettsia risticii, Borrelia burgdorferi and Rickettsia conorii in dogs from northwestern Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. Dec;8(6):797-803.

Amyx HL, Huxsoll DL. Red and gray foxes--potential reservoir hosts for and the citrate synthase gene (gltA) of Anaplasma (Ehrlichia) platys for phylogenetic and Ehrlichia canis. J Wildl Dis. 1973 Jan;9(1):47-50.

Anderson, B.E., Dawson, J.E., Jones, D.C., Wilson, K.H., 1991. Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 29, 2838–2842.

Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JW, et al. Salp15, an Ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. Immunity 2002;16(6):849-59.

Appel MJ, Allan S, Jacobson RH, Lauderdale TL, Chang YF, Shin SJ, Thomford JW, Todhunter RJ, Summers BA. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. J Infect Dis 1993;167: 651-664.

Azzag N, Petit E, Gandoin C, Bouillin C, Ghalmi F, Haddad N, Boulouis HJ. Prevalence of select vector-borne pathogens in stray and client-owned dogs from Algiers. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2015 Feb;38:1-7. doi: 10.1016/j.cimid.2015.01.001.

Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? JAMA. 1994 Jul 20;272(3):212-8.

Bakken JS., Dumler JS., 2008: Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(3), pp.433-448.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 18**:**767-811

Baneth G, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Pappalardo B, Ryan J. A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. Vet Parasitol 1998;74: 133-142.

Baneth G, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Pappalardo B, Ryan J. A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. Vet Parasitol 1998;74: 133-142

Baneth G, Waner T, Koplah A, Weinstein S, Keysary A. Survey of Ehrlichia canis antibodies among dogs in Israel. Vet Rec. 1996;138:275–295. doi: 10.1136/vr.138.11.257

Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F. S. and Schlesinger, Y.:Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. Vet. Microbiol.136:321-325, 2009.

Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD. Delineation of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto, *Borrelia garinii* sp. nov, and Group VS461

Associated with Lyme Borreliosis, *International Journal of Systematic Bacteriology*, July 1992,**42**(3), 372-383.

Barbour AG, Hayes SF. Biology of Borrelia species. Microbiol Rev 1986;50: 381-400.

Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J Biol Med 1984;57: 521-525.

Barbour A, American Lyme Disease Foundation INC [en ligne] http://www.aldf.com [consulté le 24 mars 2017] .

Baroche N.M., Ehrlichiose canine: revue des connaissances actuelles, Thèse Méd. Vét. Toulouse, 1996, n°96, 101p.

Barth C, Straubinger RK, Sauter-Louis C, Hartmann K. 2012. Prevalence of antibodies against Borrelia burgdorferi sensu lato and Anaplasma phagocytophilum and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. Jul-Aug;125(7-8):337-44.

Bartsch, R.C., Greene, R.T., 1996. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. Journal of Veterinary Internal Medicine 10, 271–274.

Bautzki D., DE Nicola A., Zeziola M., Reule M., 2006: Seroprevalence of Anaplasma phagocytophilum infection in dogs in Germany]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr;119(7-8): 342-347.

Bayard-MC Neeley M, Bansal A, Chowdhury I, Girao G, Small CB, Seitter K, Nelson J, Liveris D, Schwartz I, MC Neeley DF, Wormser GP, Aguero-Rosenfeld ME., 2004: In vivo and in vitro studies on Anaplasma phagocytophilum infection of the myeloid cells of a patient with chronic myelogenous leukaemia and human granulocytic ehrlichiosis. J Clin Pathol. May;57(5):499-503.

Beall MJ, Chandrashekar R, Eberts MD, Cyr KE, Diniz PP, Mainville C, Hegarty BC, Crawford JM, Breitschwerdt EB. Serological and molecular prevalence of Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum, and Ehrlichia species in dogs from Minnesota. Vector Borne Zoonotic Dis 2008;8: 455-464.

Beaufils, J.P. 1997. Ehrlichiosis: Clinical aspects in dogs and cats. International Forum on Ticks and Tick-Borne Disease, Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 19: 57-61

Bellet-Edimo R, Betschart B, Gern L. Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmissions of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks. Bull Soc Neuchateloise Sci Nat 2005;128:117-25.

Bennet D.;May C.;1995: Joint diseasesof dogs and cats. In textbook of Veterinary Internal Medicine Volume

Bexfield N H., Villiers EJ., Herrtage ME., 2005: Immunemediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with Anaplasma phagocytophilum in a dog. J Small Anim Pract 46, 543–548.

Blagburn BL., Spencer JA., Billeter SA., Et al 2004 : Use of imidacloprid-permethrin to prevent transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from naturally infected *Ixodes scapularis* ticks to dogs. *Veterinary Therapeutics*, 5(3), pp.212-217.

Borjesson DL., Brazzell JL., Feferman R., 2005: Platelet dysfunction after association with Anaplasma phagocytophilum in vitro. Ann N Y Acad Sci 1063, 413–415.

Borjesson DL., Simon S I., Tablin F., Barthold SW., 2001: Thrombocytopenia in a mouse model of human granulocytic ehrlichiosis. J Infect Dis 184, 1475–1479.

Botros BA, Elmolla MS, Salib AW, Calamaio CA, Dasch GA, Arthur RR. Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey. Onderstepoort J Vet Res. 1995 Mar;62(1):41-3.

Bowman D., Little SE., Lorentzen L., Shield J., Sullivan MP., Carlin EP., 2009: Prevalence and geographic distribution of Dirofilaria immitis, Borrelia burgdorferi, Ehrlichia canis, and Anaplasma phagocytophilum in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. Parasitol Vet. 2009 9 mars, 160 (1-2) :138-48. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.093. Epub 2008 Nov 5**.**

Bown KJ., Begon M., Bennet M., Birtles RJ., Burthe S., Lambin X., Telfer S., Woldehiwet Z., Ogden NH., 2006: Sympatric Ixodes trianguliceps and Ixodes ricinus Ticks

Feeding on Field Voles (Microtus agrestis): Potential for Increased Risk of Anaplasma phagocytophilum in the United Kingdom? Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 6 (4) : 404 - 410.

Bown KJ., Lambin X., Telford G., Heyder-Bruckner D., Ogden NH., Birtles RJ., 2011: The Common Shrew (Sorex araneus): A Neglected Host of Tick-Borne Infections? *Vector Borne Zoonotic Dis*. Mar 31

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

Brayton K., Kappmeyer LS., Herndon DR., Dark MJ., Tibbals DL., Palmer GH., Mcguire TC., Knowles DP 2005: Complete genome sequencing of Anaplasma marginale reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A, 102 (3), 844-849.

Breitner-Ruddock S, Würzner R, Schulze J, Brade V. Heterogeneity in the complement-dependent bacteriolysis within the species of *Borrelia burgdorferi*. Med Microbiol Immunol. 1997;185:253–260.

Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential evaluation of dogs naturally infected with Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii, or Bartonella vinsonii. J Clin Microbiol. 1998;36:2645–2651.

Breitschwerdt EB, Abrams-Ogg AC, Lappin MR et coll. Molecular evidence supporting Ehrlichia canis-like infection in cats. J. Vet. Intern. Med. 2002;16(6):642-649.

Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Maggie, R, Hawkins, E. and Dyer, P.: *Bartonella* species as a potential cause of epistaxis in dogs. J. Clin. Microbiol. 43:2529-2533, 2005.

Brinkac LM., Dodson RJ., Rosovitz MJ., Sundaram J., Daugherty SC., Davidsen T., Durkin AS., Gwinn M., Haf DH., Selengut JD., Sullivan SA., Zafar N., Zhou L., Benahmed F., Forberger H., Halpin R., Mulligan S.,Robinson J., White O., Rikihisa Y., Tettelin H., 2006 : Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. PLoS Genet;2: e21

Brouqui P, Davoust B, Haddad S, Vidor E, Raoult D. Serological evaluation of Ehrlichia canis infections in military dogs in Africa and Reunion Island. Vet Microbiol. 1991 Jan;26(1-2):103-5.

Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O., & Arditi, M. (2001). Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and Borrelia burgdorferi outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *The Journal of Immunology*, *167*(2), 987-994.

Cardenas, A.M., Doyle, C.K., Zhang, X., Nethery, K., Corstvet, R.E., Walker, D.H., McBride, J.W., 2007. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of Ehrlichia canis infection. Clinical and Vaccine Immunology 14, 123–128.

Cardoso L, Mendao C, Madeira de Carvalho L. Prevalence of Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma spp. and Leishmania infantum in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal--a national serological study. Parasit Vectors 2012;5: 62

Caron N., Hernandez J., 2011: Anaplasmose granulocytaire chez un chien. *Le Point Vétérinaire*, 42(315), pp.48-51.

Carrade D, Foley J, Sullivan M, Foley CW, Sykes JE. 2011. Spatial distribution of seroprevalence for Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi, Ehrlichia canis, and Dirofilaria immitis in dogs in Washington, Oregon, and California. Vet Clin Pathol. 2011 Sep;40(3):293-302.

Casjens S, Palmer N, van VR, et al. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi. Mol Microbiol 2000; 35: 490-516.

Chabanne (2009). Recueil de cas clinique ENVA ALFORT

Chae JS, Kim CM, Kim EH, Hur EJ, Klein TA, Kang TK, Lee HC, Song JW. Molecular epidemiological study for tick-borne disease (Ehrlichia and Anaplasma spp.) surveillance at

selected U.S. military training sites/installations in Korea. Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;990:118-25.

Chapman AS, Bakken JS, Folk SM, Paddock CD, Bloch KC, Krusell A, Sexton DJ, Buckingham SC, Marshall GS, Storch GA, Dasch GA, McQuiston JH, Swerdlow DL, Dumler SJ, Nicholson WL, Walker DH, Eremeeva ME, Ohl CA. 2006. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis— United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. MMWR Recomm Rep 55: 1–27.

Chen SM, Cullman LC, Walker DH. Western immunoblotting analysis of the antibody responses of patients with human monocytotropic ehrlichiosis to different strains of Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia canis. Clin Vaccine Immunol **November 1997** vol. 4 no. 6**731-735**

Chen SM., Dumler JS., Bakken JS., Walker DH., 1994: Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol;32: 589-595.

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

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

Cines DB., Pollak ES., Buck CA., Loscalzo J., Zimmerman GA., Mcever RP., Pober JS., WickTM., Konkle BA., Schwartz BS., Barnathan ES., Mccrae KR., Hug BA., Schmidt AM., Stern DM., 1998: Endothelial cells in physiology and the pathophysiology of vascular disorders. Blood 91, 3527–3561.

Coburn J, Leong J, Chaconas G. Illuminating the roles of the Borrelia burgdorferi adhesins. Trends Microbiol 2013;21(8):372-9.

Cocco, R. et al. Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. Annals of the New York Academy of Sciences,v. 990, p. 126-130, 2003.

Cohn LA., 2003: Ehrlichiosis and related infections. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 33(4), pp.863-884.

Collins NE, Liebenberg J, de Villiers EP, Brayton KA, Louw E, Pretorius A,Faber FE, van Heerden H, Josemans A, van Kleef M, Steyn HC, van Strijp MF, Zweygarth E, Jongejan F, Maillard JC, Berthier D, Botha M, Joubert F, Corton CH, Thomson NR, Allsopp MT, Allsopp BA. The genome of the heartwater agent Ehrlichia ruminantium contains multiple tandem repeats of actively variable copy number.Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 18;102(3):838-43.

Comstock L, Thomas DD. Characterization of Borrelia burgdorferi invasion of cultured endothelial cells. Microb Pathog 1991; 10: 137–148.

Corstvet RE., Gaunt SD., Karns PA., Mcbride JW., Battistini RA., Mauterer LA., Austin FW., 1993: Detection of humoral antigen and antibody by enzyme-linked immunosorbent assay in horses with experimentally induced Ehrlichia equi infection. J. Vet. Diagn., 5, 37-39.

Couto CG, Lorentzen L, Beall MJ, Shields J, Bertolone N, Couto JI, Couto KM, Nash S, Slack J, Kvitko H, Westendorf N, Marin L, Iazbik MC, Vicario FC, Sanz P, Ruano R.2010. Serological study of selected vector-borne diseases in shelter dogs in central Spain using point-of-care assays. Vector Borne Zoonotic Dis. Nov;10(9):885-8. Epub 2010 Apr 26.

Dagone, A. S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

Davoust B, Bourry O, Gomez J, Lafay L, Casali F, Leroy E, Parzy D. Surveys on seroprevalence of canine monocytic ehrlichiosis among dogs living in the Ivory Coast and Gabon and evaluation of a quick commercial test kit dot-ELISA.Ann N Y Acad Sci. 2006 Oct;1078:464-9.

Dawson, J.E., Candal, F.J., George, V.G., Ades, E.W., 1993. Human endothelial cells as an alternative to DH82 cells for isolation of Ehrlichia chaffeensis, E. canis, and Rickettsia rickettsii. Pathobiology 61, 293–296.

De la Fuente J., Gortazar C., 2012: Wild Boars as Hosts of Human-Pathogenic Anaplasma phagocytophilum Variants. *Emerg Infect Dis*. 2012 ; 18 (12) : 2094 -2095.

De Paiva Diniz PP., Schwartz DS., De Morais HS., Breitschwerdt EB., 2007 : Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. Winter;7(4):689-97.

Dennis VA, Dixit S, O'Brien SM, Alvarez X, Pahar B, Philipp MT. Live Borrelia burgdorferi spirochetes elicit inflammatory mediators from human monocytes via the Toll-like receptor signaling pathway. Infect Immun. 2009 Mar;77(3):1238-45.

Dib, L., Bitam, I., Bensouilah, M., Parola, P. and Raoult, D. (2009), First description of *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* in Algeria. Clinical Microbiology and Infection, 15: 261–262. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02277.x

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

Donatien, A., Lestoquard, F., 1935. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. Bull. Soc. Pathol. Exot. 28, 418–419.

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

Duffy J., Pittlekow MR., Kolbert C. P., Rutledge BJ., Persing DH., 1997: Coinfection with Borrelia burgdorferi and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. Lancet 349, 399.

Dumler JS. (2005). Anaplasma and Ehrlichia infection. Annale N Y Academy Sci;1063: 361-373.

Dumler JS., Asanovich KM., Bakken JS., Richter P., Kimsey R., Madigan JE., 1995: Serologic cross-reactions among Ehrlichia equi, Ehrlichia phagocytophila, and human granulocytic Ehrlichia. J Clin Microbiol;33: 1098-1103.

Dumler JS., Barbet AF., Bekker CP., Dasch GA., Palmer GH., et al 2001: La réorganisation des genres dans les familles *Rickettsiaceae* et *Anaplasmataceae* dans l'ordre *Rickettsiales* : unification de certaines espèces d' *Ehrlichia* avec *Anaplasma,*

Dumler, S., Walker, D., Tick-borne ehrlichioses. THE LANCET Infectious Diseases April 2001.

Dunning Hotopp JC., Lin M., Madupu R., Crabtree J., Angiuoli SV., Eisen JA., Seshadri R., Ren Q., Wu M., Utterback TR., Smith S., Lewis M., Khouri H., Zhang C., Niu H., Lin Q., Ohashi N., Zhi N.,Nelson W., Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish Ehrlichia species isolate. Vet Rec ;143: 412-417.

Ebani VV, Verin R, Fratini F, Poli A, Cerri D. Molecular survey of Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia canis in red foxes (Vulpes vulpes) from central Italy. J Wildl Dis. 2011 Jul;47(3):699-703.

Egenvall A., Bjoersdorff A., Lilliehook I., Engvall EO., Karlstam E., Artursson K., Hedhammar A., Gunnarsson A., 1998: Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish Ehrlichia species isolate. The Veterinary Record [1998, 143(15):412-417]

Egenvall A., Lilliehook I., Bjoersdorff A., Engvall EO., Karlstam E., Artursson K., Heldtander M., Gunnarsson A., 2000: Detection of granulocytic Ehrlichia species DNA by PCR in persistently infected dogs. Vet Rec;146: 186-190.

Egenvall, AE., Hedhammar AA., Bjoersdorff al., 1997: Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Veterinary Record*, 140(9), pp.222-226.

Ehrlichia and Anaplasma Infections [en ligne] veteriankey.com. [consulté le 24 mars 2017] .

Eichner, E. R. 1979. Splenic function: normal, too much and too little. Am. J.Med. **66:**311–320.

Ekerfelt C, Ernerudh J, Bunikis J, Vrethem M, Aagesen J, Roberg M, Bergström S, Forsberg P. Compartmentalization of antigen specific cytokine responses to the central nervous system in CNS borreliosis: secretion of IFN-gamma predominates over IL-4 secretion in response to outer surface proteins of Lyme disease Borrelia spirochetes. J Neuroimmunol. 1997 Nov;79(2):155-62.

Engvall EO., Egenvall A., 2002: Granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses. Int J MED MICROBIOL. JUN;291 SUPPL 33:100-3.

Ewing, S., A., BUCKNER, R., G., Manifestations of babesiosis, ehrlichiosis, and combined infection in the dog. Am.J.Vet.Res., 1965. 26: p. 815-828.

Ewing, S.A., 1972. Geographic distribution and tick transmission of Ehrlichia canis. J. Med. Entomol. 9, 597–598. Font, J., Cairo´, J., Calle´s, A., 1988. Ehrlichiosis canina. Clin. Vet. Pequen˜os Anim. 8, 141–148.

Ewing SA., Dawson JE., Panciera RJ., Mathew JS., Pratt KW., Katavolos P., Telford SR RD.1997: Dogs infected with a human granulocytotropic Ehrlichia spp. (Rickettsiales: Ehrlichieae), J ournal Medical Entomology Nov;34(6):710-8.

Fehr JS, Bloemberg GV, Ritter C, Hombach M, Lüscher TF, Weber R, et al. Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen candidatus Neoehrlichia mikurensis. Emerging Infectious Diseases. 2010;16(7):1127–9. doi: 10.3201/eid1607.091907. pmid:20587186

Fikrig E, Barthold SW, Chen M, Chang CH, Flavell RA. Protective antibodies develop, and murine Lyme arthritis regresses, in the absence of MHC class II and CD4+ T cells. J Immunol. 1997 Dec 1;159(11):5682-6.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, Borrelia burgdorferi. Nature 1997; 390: 580-6.

French, T.W., Harvey, J.W., 1983. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. American Journal of Veterinary Research 44, 2407–2411.

Gajdusek DC. Hypothesis: interference with axonal transport of neurofilament as a common pathogenetic mechanism in certain diseases of the central nervous system. N Engl J Med 1985; 312: 714–719.

Gal, A., Harrus, S., Arcoh, I., Lavy, E., Aizenberg, I., Mekuzas-Yisaschar, Y., Baneth, G., 2007. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-weekold dog. Canadian Veterinary Journal 48, 619–622.

Gary AT, Webb JA, Hegarty BC, Breitschwerdt EB. The low seroprevalence of tick-transmitted agents of disease in dogs from southern Ontario and Quebec. Can Vet J. 2006;47:1194–1200

Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reush CE. Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain dogs : a possible breed disposition.2007 *BioMed Central Veterinary Research.*

Gerber B, Haug K, Eichenberger S, Reush C E, Wittenbrink MM. Comparison of a Rapid Immunoassay for Antibodies to the C6 Antigen with Conventional Tests for Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Dogs in Europe, *Veterinary Record*, 2009, **165**, 594-597.

Girschick HJ, Huppertz HI, Russmann H, Krenn V, Karch H. Intracellular persistence of Borrelia burgdorferi in human synovial cells. Rheumatol Int 1996; 16: 125–132.

Girschick HJ, Meister S, Karch H, Huppertz HI. Borrelia burgdorferi downregulates ICAM-1 on human synovial cells in vitro. Cell Adhes Commun 1999; 7: 73–83.

Goossens HA, van den Bogaard AE, Nohlmans MK. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands. J Clin Microbiol 2001;39: 844-848.

Granick JL., Armstrong PJ., Bender JB., 2009: Anaplasma phagocytophilum infection in dogs: 34 cases (2000-2007).J Am Vet Med Assoc.

Grauer GF, Burgess EC, Cooley AJ, Hagee JH. Renal lesions associated with Borrelia burgdorferi infection in a dog. J Am Vet Med Assoc 1988;193: 237-239.

Gray J. Risk assessment in Lyme borreliosis. Wien Klin Wochenschr 1999;111(22-23):990-3.

Greene RT. Canine Lyme borreliosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1991;21: 51-64.

Greene, C.E., Burgdorfer, W., Cavagnolo, R., Philip, R.N., Peacock, M.G., 1985. Rocky Mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis.

Gross D, Huber BT, Steere AC. Molecular mimicry and Lyme arthritis. Curr Dir Autoimmun 2001; 3: 94–111.

Gross DM, Forsthuber T, Tary-Lehmann M et al. Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatmentresistant Lyme arthritis. Science 1998; 281: 703–706.

Guner ES. Complement evasion by the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi grown in host-derived tissue co-cultures: role of fibronectin in complement-resistance. Experientia 1996; 52: 364–372.

Guo BP, Norris SJ, Rosenberg LC, Hook M. Adherence of Borrelia burgdorferi to proteoglycan decorin. Infect Immun 1995; 63: 3467–3472.

Halperin JJ, Baker P, Wormser GP. Common misconceptions about Lyme disease. Am J Med 2013;126(3):264 e1-7

Hammond L, 2015 Infections [en ligne] ladyhammondvets.com. [consulté le 24 mars 2017] .

Hansmann Y. Treatment and prevention of Lyme disease. In: Lipsker D, Jaulhac B, editors. Curr Probl Dermatol Basel;2009.p.111-29.

Hanson MS, Cassatt DR, Guo BP, Patel NK, McCarthy MP, Dorward DW, Höök M. Active and passive immunity against Borrelia burgdorferi decorin binding protein A (DbpA) protects against infection. Infect Immun. 1998 May;66(5):2143-53.

Harrus S. et al. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 361-368, 2002.

Harrus, S., Kass, P. H., Klement, E. and Waner, T.: Canine monocytic ehrlichiosis: A retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. Vet. Rec. 141:360-363, 1997.

Harrus, S., T. Waner, D. J. Weiss, A. Keysary, and H. Bark. 1996. Kineticsof serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis.Vet. Immunol. Immunopathol. **51:**13–20.

Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F. and Cornelissen, A. W. C. A.: Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 37:2745- 2749, 1999.

Harrus, S., Waner, T., Strauss-Ayali, D., Bark, H., Jongejan, F,Hecht, G. and Baneth, G.: Dynamics of IgG1 and IgG2 subclasses response in dogs naturally and experimentally infected with*Ehrlichia canis*. Vet. Parasitol. 99:63-71, 2001.

Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. J Clin Microbiol 1999;37: 2241-2247.

Hauser U, Wilske B. Enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant internal flagellin fragments derived from different species of Borrelia burgdorferi sensu lato for the serodiagnosis of Lyme neuroborreliosis. Med Microbiol Immunol 1997;186: 145-151.

Hefty PS, Brooks CS, Jett AM, White GL, Wikel SK, Kennedy RC, Akins DR. OspE-related, OspF-related, and Elp lipoproteins are immunogenic in baboons experimentally infected with Borrelia burgdorferi and in human lyme disease patients. J Clin Microbiol. 2002 Nov;40(11):4256-65.

Hegarty BC, de Paiva Diniz PP, Bradley JM, Lorentzen L, Breitschwerdt E. Clinical relevance of annual screening using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (SNAP 3Dx) for canine ehrlichiosis. J Am Anim Hosp Assoc. 2009 May-Jun;45(3):118-24.

Hegarty, B.C., Levy, M.G., Gager, R.F., Breitschwerdt, E.B., 1997. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to Ehrlichia canis in dogs: an international survey. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 9, 32–38.

Hildebrandt, P. K. et al. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. Infection and Immunity, v. 7, n. 2, p. 265-271, 1973.

Hirschfeld, M., Kirschning, C. J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J. H., Wooten, R. M., & Weis, J. J. (1999). Cutting edge: inflammatory signaling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of Immunology*, *163*(5), 2382-2386.

Hollingdale M.R., Herrmann J.E., Vinson J.W. ; Enzyme immunoassay of antibody to *Rochalimaea quintana*: diagnosis of trench fever and serologic cross-reactions among other *rickettsiae* ; J. Infect. Dis. ; 1978 ; vol. 137 ; p.578-582

Horowitz HW., Hsieh TC., Aguero-Rosenfeld ME., et al 2001: Antimicrobial Susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), pp.786-788.

Hovius JW, de Jong MA, den Dunnen J, et al. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. PLoS Pathog 2008;4(2):e31.

Hsieh YC, Lee CC, Tsang CL, Chung YT. Detection and characterization of four novel genotypes of Ehrlichia canis from dogs. Vet Microbiol. 2010 Nov 20;146(1-2):70-5.

Huppertz HI, Mosbauer S, Busch DH, Karch H. Lymphoproliferative responses to Borrelia burgdorferi in the diagnosis of Lyme arthritis in children and adolescents. Eur J Pediatr 1996; 155: 297–302.

Inokuma H, Beppu T, Okuda M, Shimada Y, Sakata Y. Epidemiological survey of Anaplasma platys and Ehrlichia canis using ticks collected from dogs in Japan. Vet Parasitol. 2003 Aug 14;115(4):343-8.

Iokuma H., Ohno, K., Onishi, T., Raoult, D., Brouqui, P., 2001. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. J. Vet. Med. Sci. 63, 815–817.

Inokuma, H., Fujil, K., Okuda, M. Onishi, T., Beaufils, J. P., Raoult, D., 2005. Molecular Detection of a New Anaplasma Species Closely Related to Anaplasma phagocytophilum in Canine Blood from South Africa. J. Clin. Microbiol. June 2005 vol. 43 no. 6 2934-2937.

Iqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W., Rikihisa, Y., 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology 32, 1658–1662.

Jacchieri, S. G., Torquato, R., & Brentani, R. R. (2003). Structural study of binding of flagellin by Toll-like receptor 5. *Journal of bacteriology*, *185*(14), 4243-4247.

Jouret-Gourjault S, Parzy D, Davoust B. Experimental Infections in dogs with Ehrlichia canis strain Borgo 89. Ann N Y Acad Sci. 2006 Oct;1078:4705.

Kakoma, I., C. A. Carson, M. Ristic, E. M. Stephenson, P. K. Hildebrandt,and D. L. Huxsoll. 1978. Platelet migration inhibition as an indicator ofimmunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. Infect.Immun. **20:**242–247.

Kakoma, I., Hansen, R.D., Anderson, B.E., Hanley, T.A., Sims, K.G., Liu, L., Bellamy, C., Long, M.T., Baek, B.K., 1994. Cultural, molecular, and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology 32, 170–175.

Kalish RA, Leong JM, Steere AC. Early and late antibody responses to full-length and truncated constructs of outer surface protein A of Borrelia burgdorferi in Lyme disease. Infect Immun 1995; 63: 2228–2235.

Keesing F., Hersh MH., Tibbets M., Mchenry DJ., Duerr S., Brunner J., Killilea M., Logiudice K., Schmidt KA., 2012: Ostfeld RS. Reservoir Competence of Vertebrate Hosts for Anaplasma phagocytophilum. *Emerg Infect Dis*; 18 (12) : 2013 -2016.

Kelly PJ, Eoghain GN, Raoult D. Antibodies reactive with Bartonella henselae and Ehrlichia canis in dogs from the communal lands of Zimbabwe. JS Afr Vet Assoc. 2004 Sep;75(3):116-20.

Kelly, P.J., Matthewman, L.A., Mahan, S.M., Semu, S., Peter, T., Mason, P.R., Brouqui, P., Raoult, D., 1994. Serological evidence for antigenic relationships between Ehrlichia canis and Cowdria ruminantium. Research in Veterinary Science 56, 170–174.

Keysary, A., Waner, T., Strenger, C., Harrus, S., 2001. Cultivation of Ehrlichia canis in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 13, 521–523.

Klein MB., Miller JS., Nelson C M., Goodman JL., 1997: Primary bone marrow progenitors of both granulocytic and monocytic lineages are susceptible to infection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J Infect Dis 176, 1405–1409.

Klempner MS, Hu LT, Evans J, et al. Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and a history of Lyme disease. N Engl J Med 2001;345(2):85-92.

Kochi SK, Johnson RC, Dalmasso AP. 1991. Complement-mediated killing of the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi. Role of antibody in formation of an effective membrane attack complex. The Journal of Immunology Vol. 146, Issue 11

Kohn B., Galke D., Beelitz P., Pfister K., 2008: Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. J Vet Intern Med 2008;22: 1289-1295.

Kopp PA, Schmitt M, Wellensiek HJ, Blobel H. Isolation and characterization of fibronectin-binding sites of Borrelia garinii N34. Infect Immun 1995; 63: 3804–3808.

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. and MacCormack, J. N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. J. Clin. Microbiol. 37:2631-2638, 1999.

Krause A, Brade V, Schoerner C, Solbach W, Kalden JR, Burmester GR. T cell proliferation induced by Borrelia burgdorferi in patients with Lyme borreliosis. Autologous serum required for optimal stimulation. Arthritis Rheum 1991; 34: 393–402.

Krupka I, Pantchev N, Lorentzen L, Weise M, Straubinger RK. Tick-transmitted, bacterial infections in dogs : seroprevalences of *Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi sensu* lato and *Ehrlichia canis* in Germany. *Praktische Tierarzt*. 2007, **88**, 776-788.

Krupka I, Straubinger RK. Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with Borrelia burgdorferi sensu stricto. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2010;40: 1103-1119.

Labarthe, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.

Latour S. Biologie des Tiques et rÙles pathogËnes. In : Cahier du VÈtomecum, Maladies transmises par les tiques. MÈrial. 1997 : 3-8.

Legendre AM. Ehrlichiosis in cats. J. Vet. Intern. Med. 2002;16(6):641-643

Lengl-Janssen B, Strauss AF, Steere AC, Kamradt T. The The helper cell response in Lyme arthritis: differential recognition of Borrelia burgdorferi outer surface protein A in

patients with treatment-resistant or treatment-responsive Lyme arthritis. J Exp Med 1994; 180: 2069–2078.

Leong JM, Morrissey PE, Ortega-Barria E, Pereira ME, Coburn J. Hemagglutination and proteoglycan binding by the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi. Infect Immun. 1995 Mar;63(3):874-83.

Lester SJ., Breitschwerdt EB., Collis CD., et al 2005 : *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. *The Canadian Veterinary Journal.*, 46(9), pp.825-827.

Levin ML., Desvignes F., 1999: Fish D. Disparity in the natural cycle of Borrelia burgdorferi and the agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Emerging Infectious Diseases*; 5 (2).

Levy SA, Dreesen DW. Lyme borreliosis in dogs. Canine Pratice 1992;17: 5-14.

Levy SA, Magnarelli LA. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. *J Am Vet Med Assoc*. 1992, 200, 344-347.

Liang FT, Jacobs MB, Bowers LC, et al. An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis. J Exp Med 2002;195(4):415-22.

Liang FT, Philipp MT. Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of Borrelia burgdorferi. Infect Immun 1999;67: 6702-6706.

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

Lin M, den Dulk-Ras A, Hooykaas PJ, Rikihisa Y. Anaplasma phagocytophilum AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. Cell Microbiol. 2007 Nov;9(11):2644-57.

Lin M, Rikihisa Y. Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma phagocytophilum lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. Infect Immun 2003;71: 5324-5331.

Little SE, O'connor TP, Hempstead J, (2010) Ehrlichia ewingii infection and exposure rates in dogs from the south central United States. Veterinary Parasitolgy, DOI:10.1016/journal.veterinary parasitology. 05.006.

Littman MP. Canine borreliosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003;33: 827-862.

Lockwood, C. M. 1983. Immunological functions of the spleen. Clin. Haematol.12:449–465.

Lovering, S.L., Pierce, K.R., Adams, L.G., 1980. Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. American Journal of Veterinary Research 41, 1266–1271.

Macieira, D. B. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

Magnarelli LA, Anderson JF, Fish D. Transovarial transmission of Borrelia burgdorferi in Ixodes dammini (Acari:Ixodidae). J Infect Dis 1987;156(1):234-6.

Magnarelli LA., Ijdo JW., Van Andel AE., et al 2001: Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses. *American Journal of Veterinary Research*, 62(1), pp.29-32.

Mannelli A, Bertolotti L, Gern L, Gray J. Ecology of Borrelia burgdorferi sensu lato in Europe : transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change,*FEMS Microbiol Rev*, 2012, **36**, 837-861.

Marchal C, Schramm F, Kern A, et al. Antialarmin effect of tick saliva during the transmission of Lyme disease. Infect Immun 2011;79(2):774-85.

Marsilio F, Di Martino B, Meridiani I, Bianciardi P. Direct identification of Ehrlichia canis by a novel polymerase chain reaction method and molecular analysis of the citrate synthase (gltA) gene from various Italian strains. J Vet Diagn Invest. 2006 Mar;18(2):215-7.

Massung RF., Courtney JW., Hiratzka SL., et al 2005: *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. *Emerging Infectious Diseases*, 11(10), pp.1604–1606.

Matthewan, L.; Kelly, P. J.; Wray, K. Antibodies in cat sera from southern Africa react with antigens of *Ehrlichia canis*. Veterinary Record, v. 138, n. 15, p. 364-365, 1996.

Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, et al. Stage-associated risk of transmission of the Lyme disease spirochete by European Ixodes ticks. Parasitol Res 1992;78(8):695-8.

Maurin M., Bakken JS., Dumler JS., 2003: Antibiotic Susceptibilities of *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *phagocytophilum* Strains from Various Geographic Areas in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), pp.413-415.

Mayer-Scholl A., Averhoff P., Zychlinsky A., 2004: Current Opinon in Microbiology.7(1):62-6.

Mazepa AW., Kidd LB., Young KM., Trepanier LA., 2010: Clinical presentation of 26 anaplasma phagocytophilum-seropositive dogs residing in an endemic area. J Am Anim Hosp Assoc. Nov-Dec;46(6):405-12.

McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Boudreaux, C., Guedry, T., Walker, D.H., 2003. Kinetics of antibody response to Ehrlichia canis immunoreactive proteins. Infection and Immunity 71, 2516–2524.

Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. (2000). Innate immunity. *New England Journal of Medicine*, *343*(5), 338-344.

M'ghirbi Y., Ghorbel A., Amouri M., Nebaoui A., Haddad S., Bouattour A., 2009: Clinical, serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. Parasitol Res;104: 767-774.

Mircean V, Dumitrache MO, Gyorke A, Pantchev N, Jodies R, Mihalca AD, Cozma V. Seroprevalence and geographic distribution of Dirofilaria immitis and tick-borne infections (Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Ehrlichia canis) in dogs from Romania. Vector Borne Zoonotic Dis 2012;12: 595-604

Modolell M, Schaible UE, Rittig M, Simon MM. Killing of Borrelia burgdorferi by macrophages is dependent on oxygen radicals and nitric oxide and can be enhanced by antibodies to outer surface proteins of the spirochete. Immunol Lett 1994; 40: 139–146.

Montgomery RR, Malawista SE. Entry of Borrelia burgdorferi into macrophages is end-on and leads to degradation in lysosomes. Infect Immun 1996; 64: 2867–2872.

Montgomery RR, Nathanson MH, Malawista SE. Fc- and non-Fc-mediated phagocytosis of Borrelia burgdorferi by macrophages. J Infect Dis. 1994 Oct;170(4):890-3.

Mott J., Barnewall RE., Rikihisa, Y., 1999: Human granulocytic ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells. *Infect Immun* **67:** 1368–1378.

Movilla, R. García,C. Siebert, S. and Roura X,. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico *Parasites & Vectors*2016 **9**:421

Munderloh UG., Lynch M J., Herron MJ., Palmer AT., Kurti T., Nelson RD., Goodman JL., 2004: Infection of endothelial cells with Anaplasma marginale and A. phagocytophilum. Veterinary Microbiology 101, 53–64.

Mylonakis, M. E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. Veterinary Microbiology, v. 91, n. 2-3, p. 197‑204, 2003.

Mylonakis, M. E., Day, M. J., Siarkou, V., Vernau, W. and Koutinas, A. F.: Absence of myelofibrosis in dogs with *Ehrlichia canis*-induced myelosuppression. J. Comp. Pathol. 142:328-331, 2010.

Mylonakis, M. E., Koutinas, A. F., Breitschwerdt, E. B., Hegarty,B. C., Billinis, C. D., Leontides, L. S. and Kontos, V. I.: Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 40:174-184, 2004.

Mylonakis, M., Leontides, L., Gonen, L., Billinis, C., Koutinas, A.F. and Baneth, G.: Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis.Vet. Parasitol. 129:229-233, 2005.

Nahimana I, Gern L, Blanc DS, et al. Risk of Borrelia burgdorferi infection in western Switzerland following a tick bite. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004;23(8):603-8.

Ndip LM, Ndip RN, Esemu SN, Dickmu VL, Fokam EB, Walker DH, McBride JW. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by Ehrlichia canis and Ehrlichia ewingii. Vet Microbiol. 2005 Nov 30;111(1-2):59-66.

Neelakanta G., Sultana H., Fish D., Anderson JF., Fikrig E., 2010: Anaplasma phagocytophilum induces Ixodes scapularis ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *J Clin Invest*.; 120 (9) : 3179–3190

Neer, T. M. and Harrus, S.: Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis, E.chaffeensis, E. ruminantium,N. sennetsu, and N. risticii* infections). In: Infectious Diseases of the Dog and Cat, Greene, C.E. (Ed): Saunders Elsevier, St Louis,pp. 203-216, 2006.

Neer, T. M., Breitschwerdt, E. B., Green, R. T. and Lappin, M. R.: Consensus statement on ehrlichial diseases of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. J. Vet. Intern. Med. b16:309-315, 2002.

Nepom GT, Erlich H. MHC class-II molecules and autoimmunity. Ann Rev Immunol 1991; 9: 493–525.

Nims RM, Ferguson JA, Walker JL, Hildebrandt PK, Huxsoll DL, Reardon MJ, Varley JE, Kolaja GJ, Watson WT, Shroyer EL, Elwell PA, Vacura GW. Epizootiology of tropical canine pancytopenia in Southeast Asia. J Am Vet Med Assoc. 1971;158:53–63.

O'Connor, T.P., Hanscom, J.L., Hegarty, B.C., Groat, R.G., Breitschwerdt, E.B., 2006. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of Ehrlichia canis antibodies in canine sera. American Journal of Veterinary Research 67, 206–210.

Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM. Antigenic and genetic heterogeneity of Borrelia burgdorferi populations transmitted by ticks. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98: 670-675.

Oksi J, Savolainen J, Pène J, Bòusquet J, Laippala P, Viljanen MK. Decreased interleukin-4 and increased gamma interferon production by peripheral blood mononuclear cells of patients with Lyme borreliosis. Infect Immun. 1996 Sep;64(9):3620-3.

O'Neill, L. A. (2004). Immunology: after the toll rush. Science, 303(5663), 1481-1482.

Palmer GH, Bankhead T, Lukehart SA. Nothing is permanent but change-antigenic variation in persistent bacterial pathogens. Cell Microbiol 2009;11(12):1697-705.

Pantchev N, Schaper R, Limousin S, Norden N, Weise M, Lorentzen L. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and Tick-Borne Infections Caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in Domestic Dogs in France : Results of a Countrywide Serologic Survey, *Parasitol Res*, 2009, **105**, S101-S113.43.

Parola P, Raoult D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. Clin Microbiol Infect 2001;7: 80-83.

Pedra JHF., Mattner J., Tao J., et al 2008: C-Jun NH2-Terminal Kinase 2 Inhibits Gamma Interferon Production during *Anaplasma phagocytophilum* Infection. *Infection and Immunity*, 76(1), pp.308-316.

Perez-Eid C. Les tiques : identification, biologie, importance medicale et veterinaire. In: Larpent JP, editors, Monographies de microbiologie. Tec & Doc Lavoisier;2007.

Pierce, K. R., G. E. Marrs, and D. Hightower. 1977. Acute canine ehrlichiosis:platelet survival and factor 3 assay. Am. J. Vet. Res. **38:**1821–1825.

Pinyoowong D, Jittapalapong S, Suksawat F, Stich RW, Thamchaipenet A. Molecular characterization of Thai Ehrlichia canis and Anaplasma platys strains detected in dogs. Infect Genet Evol 2008; 8(4): 433-438.

Poitout FM., Chabanne L., 2004:. Anaplasmose chez un chien. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, 16, pp.45-48.

Poitout FM., Shinozaki JK., Stockwell PJ., et al 2005: Genetic Variants of *Anaplasma phagocytophilum* Infecting Dogs in Western Washington State. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), pp.796-801.

Popov VL, Chen SM, Feng HM, Walker DH. Ultrastructural variation of cultured Ehrlichia chaffeensis. J Med Microbiol. 1995 Dec;43(6):411-21.

Postic D, Edlinger C, Richaud C, Grimont F, Dufresne Y, Perolat P, Baranton G, Grimont PA. Two genomic species in Borrelia burgdorferi. Res Microbiol 1990;141: 465-475.

Pretorius AM, Kelly PJ. Serological survey for antibodies reactive with Ehrlichia canis and E. chaffeensis in dogs from the Bloemfontein area,South Africa. J S Afr Vet Assoc. 1998 Dec;69(4):126-8.

Pusterla N., Weber R., Wolfensberger C., Schar G., Zbinden R., Fierz W., Madigan JE., Dumler JS., Lutz H., 1998: Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Switzerland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis;17: 207-209.

Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, et al. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. Nature 2005;436(7050):573-7.

Rand PW, Lacombe EH, Smith RP, Jr., Gensheimer K, Dennis DT. Low seroprevalence of human Lyme disease near a focus of high entomologic ²risk. Am J Trop Med Hyg 1996;55: 160-164.

Randolph SE, Craine NG. General framework for comparative quantitative studies on transmission of tick-borne diseases using Lyme borreliosis in Europe as an example. J Med Entomol. 1995 Nov;32(6):765-77. Review.

Reddy GR, Sulsona CR, Barbet AF, Mahan SM, Burridge MJ, Alleman AR. Molecular characterization of a 28 kDa surface antigen gene family of the tribe Ehrlichiae. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jun 29;247(3):636-43.

Reller ME, Dumler JS. 2015. *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and related intracellular bacteria, p 1135–1149. *In* Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW (ed), Manual of clinical microbiology, 11 ed, vol 1. ASM Press, Washington, DC.

Rikihisa Y. Cross-reacting antigens between Neorickettsia helminthoeca and Ehrlichia species, shown by immunofluorescence and Western immunoblotting. J Clin Microbiol. 1991 Sep;29(9):2024-9.

Rikihisa Y., 2010: Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia chaffeensis: subversive manipulators of host cells. Nat Rev Microbiol;8: 328-339.

Rikihisa Y., 2011: Mechanisms of obligatory intracellular infection with Anaplasma phagocytophilum. Clinical Microbiology Reviw:24(3):469-89.

Ristic, M., Holland, C.J., 1993. Canine ehrlichiosis. In: Woldehiwet, Z., Ristic, M. (Eds.), Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals. Pergamon Press, Oxford, UK, pp. 169–186

Ruiz-Fons F., Fernandez-De-Mera IG., Acevedo P., Gortazar C., De La Fuente J., 2012: Factors driving the abundance of Ixodes ricinus and the prevalence of zoonotic I. ricinus-borne pathogens in natural foci. *Appl Environ Microbiol*Jan 27.

Rutkowski S, Busch DH, Huppertz HI. Lymphocyte proliferation assay in response to Borrelia burgdorferi in patients with Lyme arthritis: analysis of lymphocyte subsets. Rheumatol Int 1997; 17: 151–158.

Sainz A, Kim CH, Tesouro MA, Hansen R, Amusategui I, Koo HY, Kakoma I. Serological evidence of exposure to Ehrlichia species in dogs in Spain. Ann N Y Acad Sci. 2000;916:635-42.

Savey M, Dufour B. Diversité des zoonoses. Définitions et conséquences pour la surveillance et la lutte. *Epidémiol. et santé anim*. 2004, **46**, 1-16.

Schuijt TJ, Hovius JW, van Burgel ND, et al. The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive Borrelia burgdorferi sensu lato isolates. Infect Immun 2008;76(7):2888-94.

Schwan TG, Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the lyme disease-associated spirochete, Borrelia burgdorferi, during the chain of infection in ticks and mice. J Clin Microbiol 2000;38: 382-388.

Sellati TJ, Burns MJ, Ficazzola MA, Furie MB. Borrelia burgdorferi upregulates expression of adhesion molecules on endothelial cells and promotes transendothelial migration of neutrophils in vitro. Infect Immun 1995; 63: 4439–4447.

Severo,M.S, Stephens K .D, Kotsyfakis M.,M., Pedra J.H.F., (2012)*Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive?. Future Microbiology

Shapiro ED, Gerber MA. Lyme disease. Clin Infect Dis. 2000 Aug;31(2):533-42.

Shaw SE., Binns SH., Birtles RJ., Day MJ., Smithson R., Kenny MJ., 2005: Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom. Vet Rec;157: 645-648.

Shimada, T., Ishida, Y., Shimizu, M., Nomura, M., Kawato, K., Iguchi, K., Jinbo, T., 2002. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with Ehrlichia canis. Veterinary Research Communication 26, 171–177.

Siarkou, V. I., Mylonakis, M. E., Bourtzi-Hatzopoulou, E. and Koutinas, A. F.: Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. Vet. Microbiol. 125:304-312, 2007.

Silaghi C., Gilles J., Hohle M., Fingerle V., Just FT., Pfister K., 2008: Anaplasma phagocytophilum infection in Ixodes ricinus, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Emerg Infect Dis*; 14 (6) : 972 - 974.

Silaghi C., Skuballa J., Thiel C., Pfister K., Petney T., Pfaffle M., Taraschewski H., Passos LM., 2012: The European hedgehog (Erinaceus europaeus) - A suitable reservoir for variants of Anaplasma phagocytophilum ? *Ticks Tick Borne Dis*; 3 (1) : 49-54.

Silberer M, Koszik F, Stingl G, Aberer E. Downregulation of class II molecules on epidermal Langerhans cells in Lyme borreliosis. Br J Dermatol 2000; 143: 786–794.

Singh K S, Gischick H J. Molecular survival strategies of the Lyme

Skotarczak B., Adamska M., Supron M., 2004. Blood DNA analysis for Ehrlichia (Anaplasma) phagocytophila and Babesia spp. of dogs from northern Poland. Acta Vet. Brno 73, 347–351.

Smith, R. D., M. Ristic, D. L. Huxsoll, and R. A. Baylor. 1975. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction asthe cause of thrombocytopenia. Infect. Immun. **11:**1216–1221.

Snodgrass DR., 1974: Studies on bovine petechial fever and ovine tickborne fever. PhD Thesis, University of Edinburgh

Societe de pathologie infectieuse de languefrancaise (SPILF). 16e Conference de consensus en therapeutiques anti-infectieuse.Borreliose de Lyme : demarches diagnostiques, therapeutiques et pre- ventives. 2006.

Solano-Gallego L, Bradley J, Hegarty B, Sigmon B, Breitschwerdt E. Bartonella henselae IgG antibodies are prevalent in dogs from southeastern USA. Vet Res 2004;35: 585-595.

Solano-Gallego L, Trotta M, Razia L, Furlanello T, Caldin M. Molecular survey of Ehrlichia canis and Anaplasma phagocytophilum from blood of dogs in Italy. Ann N Y Acad Sci. 2006 Oct;1078:515-8.

Sprenger H, Krause A, Kaufmann A, Priem S, Fabian D, Burmester GR, Gemsa D,Rittig MG. Borrelia burgdorferi induces chemokines in human monocytes. Infect Immun. 1997 Nov;65(11):4384-8.

Stafford KC., Massung RF., Magnarelli LA., Ijdo JW., Anderson JF., 1999: Infection with agents of human granulocytic ehrlichiosis, Lyme disease, and babesiosis in wild white-footed mice in Connecticut. J Clin Microbiol 37, 2887–2892.

Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. J Clin Invest. 2004 Apr;113(8):1093-101.

Steere AC, Dwyer E, Winchester R. Association of chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2 alleles. N Engl J Med 1990; 323: 219–223.

Steere AC, Gross D, Meyer AL, Huber BT. Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis.J Autoimmun 2001; 16: 263–268.

Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med. 1989 Aug 31;321(9):586-96. Review. PubMed PMID: 2668764.

Straubinger RK. PCR-Based quantification of Borrelia burgdorferi organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. J Clin Microbiol 2000;38: 2191-2199.

Strik NI., Alleman AR., Barbet AF., et al 2007 : Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* Major Surface Protein 5 and the Extent of Its Cross-Reactivity with *A. marginale*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(3), pp.262-268.

Suhonen J, Komi J, Soukka J, Lassila O, Viljanen MK. Interaction between Borrelia burgdorferi and immature human dendritic cells. Scand J Immunol. 2003 Jul;58(1):67-75.

Suksawat J, Pitulle C, Arraga-Alvarado C, Madrigal K, Hancock SI, Breitschwerdt EB. Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. J Clin Microbiol. 2001 Jan;39(1):90-3. Erratum in: J Clin Microbiol 2002 Oct;40(10):3887.

Summers BA, Straubinger AF, Jacobson RH, Chang YF, Appel MJ, Straubinger RK. Histopathological studies of experimental lyme disease in the dog. J Comp Pathol 2005;133: 1-13.

Tajima, T. and Rikihisa, Y.: Cytokine responses in dogs infected with *Ehrlichia canis* Oklahoma strain. Ann. N.Y. Acad. Sci.1063:429-432, 2005.

Torina A, Caracappa S. Dog tick-borne diseases in Sicily. Parassitologia. 2006 Jun;48(1-2):145-7.

Tozon NA., Petrovec M., Avsic-Zupanc T., 2003 : Clinical and Laboratory Features of the First Detected Cases of *A. phagocytophila* Infections in Dogs from Slovenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, pp.424-428.

Trapp, S. M. et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. Veterinary Parasitology, v. 140,n. 3-4, p. 223-230, 2006.

Trotz-Williams LA, Trees AJ. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. Vet Rec. 2003 Jan 25;152(4):97-105.

Unver A, Rikihisa Y, Borku K, Ozkanlar Y, Hanedan B. Molecular detection and characterization of Ehrlichia canis from dogs in Turkey. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2005 Jul-Aug;118(7-8):300-4.

Unver, A. et al. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. Journal of Clinical Microbiology, v. 39, n. 8, p. 2788-2793, 2001.

Unver, A., Huang, H. and Rikihisa, Y. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. Ann. N.Y. Acad.Sci. 1078:482-486, 2006.

Van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar AC, Kramer MD, Dankert J. Different genospecies of Borrelia burgdorferi are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin Infect Dis 1993;17: 708-717.

Vaz A, Glickstein L, Field JA, McHugh G, Sikand VK, Damle N, Steere AC. Cellular and humoral immune responses to Borrelia burgdorferi antigens in patients with culture-positive early Lyme disease. Infect Immun. 2001 Dec;69(12):7437-44.

Villeneuve A, Goring J, Marcotte L, Overvelde S. 2011. Seroprevalence of Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis, and Dirofilaria immitis among dogs in Canada. Can Vet J. May;52(5):527-30.

Von Loewenich FD, Geissdörfer W, Disqué C, Matten J, Schett G, Sakka SG, Bogdan C. Detection of "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. J Clin Microbiol. 2010 Jul;48(7):2630-5. doi: 10.1128/JCM.00588-10.

Wagner B, Erb HN. 2012. Dogs and horses with antibodies to outer-surface protein C as on-time sentinels for ticks infected with Borrelia burgdorferi in New York State in 2011. Prev Vet Med. Dec 1;107(3-4):275-9. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.07.002. Epub 2012 Jul 28.

Wagner B, Freer H, Rollins A, Garcia-Tapia D, Erb HN, Earnhart C, Marconi R, Meeus P. Antibodies to Borrelia burgdorferi OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs. Clin Vaccine Immunol 2012;19: 527-535.

WALKER DH., DUMLER JS., 1996: Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. Emerging Infectious Diseases 2, 1–16.

Waner, T. Hematopathological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. Israel. J. Vet. Med. 63,19-22, 2008.

Waner, T., S. Harrus, D. J. Weiss, H. Bark, and A. Keysary. 1995. Demonstrationof serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis.Vet. Immunol. Immunopathol. **48:**177–182.

Waner, T., S. Harrus, H. Bark, E. Bogin, Y. Avidar, and A. Keysary. 1997.Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentallyinfected beagle dogs. Vet. Parasitol. **69:**307–317.

Waner, T., Strenger, C., Keysary, A., Harrus, S., 1998. Kinetics of serologic crossreactions between Ehrlichia canis and the Ehrlichia phagocytophila genogroups in experimental E. canis infection in dogs. Veterinary Immunology and Immunopathology 66, 237–243.

WANER, T., HARRUS, S., JONGEGAN, F., BARK, H., KEYSARY, A., CORNELISSEN, A., W.C.A., *Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by Ehrlichia canis.* Vet. Parasitol., 2001. **95**: p. 1-15.

Waner, T.; Strenger, C.; Kesary, A. Comparison of a clinicbased ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 12, n. 3, p. 240-244, 2000.

Wang G, van Dam AP, Dankert J. Evidence for frequent OspC gene transfer between Borrelia valaisiana sp. nov. and other Lyme disease spirochetes. FEMS Microbiol Lett 1999; 177: 289-96.

Watanabe M, Oikawa T, Hiraoka H, Kaneko N, Itamoto K, Mizuno T, Okuda M, Inokuma H. Experimental inoculation of beagle dogs with Ehrlichia species detected from Ixodes ovatus. Vet Parasitol. 2006 Mar 15;136(2):147-54.

Webster PJWIJ., Chicoine LM., and Fikrig E., 1998: The agent of human granulocytic ehrlichiosis resides in an endosomal compartment. *J Clin Invest* **101:** 1932–1941

Weisburg, W. G., Dobson, M. E., Samuel, J. E. & 7 other authors (1989). Phylogenetic diversity of the *Rickettsiae*. *J Bacteriol* **171**,4202±4206.

Weisiger RM, Ristic M, Huxsoll DL. Kinetics of antibody response to Ehrlichia canis assayed by the indirect fluorescent antibody method. Am J Vet Res. 1975 May;36(5):689-94.

Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, Jacobsson S, Wennerås C. First case of human "Candidatus neoehrlichia mikurensis" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. J Clin Microbiol. 2010;48(5):1956–9. doi: 10.1128/JCM.02423-09. pmid:20220155

Wen B, Cao W, Pan H. Ehrlichiae and ehrlichial diseases in china. Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;990:45-53. Review.

Widhe M, Jarefors S, Ekerfelt C, Vrethem M, Bergstrom S, Forsberg P, Ernerudh J. Borrelia-specific interferon-gamma and interleukin-4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome. J Infect Dis. 2004 May 15;189(10):1881-91.

Widhe M, Skogman BH, Jarefors S, Eknefelt M, Eneström G, Nordwall M, Ekerfelt C, Croner S, Bergström S, Forsberg P, Ernerudh J. Up-regulation of Borrelia-specific IL-4- and IFN-gamma-secreting cells in cerebrospinal fluid from children with Lyme neuroborreliosis. Int Immunol. 2005 Oct;17(10):1283-91.

Wittenbrink MM, Failing K, Krauss H. Enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis for detection of antibodies to Borrelia burgdorferi in dogs. The impact of serum absorption with homologous and heterologous bacteriae. Vet Microbiol 1996;48: 257-268.

Woese CR. Bacterial evolution. Microbiol Rev 1987;51: 221-271.

Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*,*Bacteria*, and *Eukarya*. *Proc Natl Acad SciUSA***87**, 4576±4579Wisburg

Woldehiwet Z. Immune evasion and immunosuppression by Anaplasma phagocytophilum, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. Vet J. 2008 Jan;175(1):37-44. Review.

Woldehiwet Z., Horrocks BK., Scaife H., Ross G., Munderloh UG., Bown K., Edwards SW., Hart CA., 2002: Cultivation of an ovine strain of Ehrlichia phagocytophila in tick cell cultures.Journal of Comparative Pathology. 127(2-3):142-9.

Woldehiwet Z., Scott GR., 1982: Corticosteroid therapy of tick-borne fever. Veterinary Record 110, 151–152.

Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1991 Jan;21(1):75-98.

Wright JC, Chambers M, Mullen GR, Swango LJ, D'Andrea GH, Boyce AJ. 1997. Seroprevalence of Borrelia burgdorferi in dogs in Alabama, USA. Prev Vet Med. Jul;31(1-2):127-31.

Yoshinari NH, Reinhardt BN, Steere AC. T cell responses to polypeptide fractions of Borrelia burgdorferi in patients with Lyme arthritis. Arthritis Rheum 1991; 34: 707–713

Yuasa Y, et al. The Comparison of Spatial Variation and Risk Factors Between Mosquito-Borne and Tick-Borne Diseases: Seroepidemiology of Ehrlichia Canis, Anaplasma Species, and Dirofilaria Immitis in Dogs Comp Immunol Microbiol Infect Dis 35 (6), 599-606. 2012 Aug 2

Zarember, K. A., & Godowski, P. J. (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *The Journal of Immunology*, *168*(2), 554-561.

Zhang J. Z., Popov, V. L., Gao, S., Walker, D. H. & Yu, X. J. (2007) The developmental cycle of Ehrlichia chaffeensisin vertebrate cells. An analysis of the E. chaffeensis intracellular developmental cycle and the associated differential expression of cell surface antigens Cell. Microbiol.9, 610–618.

Zoschke DC, Skemp AA, Defosse DL. Lymphoproliferative responses to Borrelia burgdorferi in Lyme disease. Ann Intern Med 1991; 114: 285–289.