

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

École Nationale Vétérinaire d'Alfort



**THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU DOCTORAT
EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES**

**ÉTUDE DE L'INFECTION PAR LES PRINCIPALES
BACTÉRIES HÉMOTROPES TRANSMISES
PAR LES ARTHROPODES HÉMATOPHAGES
CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES
DANS LA RÉGION D'ALGER**

Naouelle AZZAG

Thèse soutenue publiquement, le 19 Décembre 2012,
devant le jury composé de :

M. HAMDI T.M. Docteur, ENSV-Alger Président
Mme. HADDAD N. Professeur, ENVA-Paris Examinateur
Mme. BOUKHORS K. Professeur, ENSV-Alger Examinateur
M. BITAM I. Docteur, IPA-Alger Membre invité
M. BOULOUIS H.J. Professeur, ENVA-Paris Directeur de thèse
M. AMMOUCHE A. Professeur, ENSA-Alger Co-Directeur de thèse

RÉSUMÉ

Les arthropodes hématophages sont impliqués dans la transmission de nombreuses bactéries dont les principales appartiennent aux genres *Anaplasma*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Mycoplasme* et *Rickettsia*. 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 connaître 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 propriétaire, et d'autre part d'évaluer la prévalence de *Bartonella* sp. dans une population féline et canine.

Parmi les 213 chiens étudiés, 47.42% se sont montrés positifs en IFI à *Anaplasma phagocytophilum*, 37.56% à *Borrelia burgdorferi*, 28.64% à *Bartonella berkhoffii* vinsonii et 35.68% à *Bartonella henselae*. L'origine des chiens est significativement associée à ces séroprévalences. Sur les 252 sérums de chats analysés, 57.90% sont positifs à *Bartonella henselae* et 75.80% à *Bartonella clarridgeiae*.

Nous avons en particulier analysé par la technique MLVA la diversité des souches de *Bartonella henselae*. Certaines souches ont été comparées par la technique MLST. Les résultats obtenus nous indiquent la présence de deux populations de chats : la première correspond à des chats hébergeant des souches avec des profils MLVA identiques et la seconde à des chats porteurs de souches avec des profils MLVA différents. L'analyse par ré-échantillonnage, l'arbre NJ et l'analyse structure-neighbor vont dans le même sens et suggèrent une dérive des profils lors de l'infection d'un individu. Ces trois approches montrent également que des co-infections sont possibles, mais que la variété des profils observés chez un chat résulte plus d'une dérive que de co-infection.

Mots clés : *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella*, chien, chat, MLVA, MLST, phylogénie, IFI.

SUMMARY

The bloodsucking arthropods are involved in the transmission of many bacteria whose main belong to the genera *Anaplasma*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Mycoplasma* and *Rickettsia*. Most resulted diseases are potentially emerging in Algeria. However, the first step in assessing the risk of its vector-borne diseases is to know the methods of diagnosis of infection and the prevalence of the causative agent in the reservoir host and vector.

The objective of this study is, firstly, to study the prevalence, by indirect immunofluorescence, to *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in a population of dogs impounded and owner, and secondly to assess the prevalence of *Bartonella* spp. in feline and canine population.

Of the 213 dogs studied, 47.42% were positive by IIF to *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* 37.56%, 28.64% and *Bartonella vinsonii berkhoffii* 35.68% to *Bartonella henselae*. The origin of the dogs was significantly associated with the seroprevalences. Of the 252 sera from cats analyzed, 57.90% were positive for *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in 75.80%.

In particular, we analyzed the strain diversity of *Bartonella henselae* by MLVA technique. Some strains were compared by MLST technique. The obtained results indicate the presence of two populations of cats: the first corresponds to cats harboring strains with identical MLVA profiles and the second to cats harboring strains with different MLVA profiles. Two-third of the cats harbored 2 to 6 MLVA profiles simultaneously. The similarity of MLVA profiles obtained from the same cat, neighbor-joining clustering and structure-neighbor clustering indicate that such a diversity likely results from two different mechanisms occurring either independently or simultaneously: independent infections and genetic drift from a primary strain.

Keywords : *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella*, dog, cat, MLVA, MLST, phylogeny, IFI.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BHV	Bartonella henselae VNTR
I.D.	Index de diversité
IFI	ImmunoFluorescence Indirecte
ITS	Internal Transcribed Spacer
kDa	Kilo Dalton
MCG	Maladie des Griffes du Chat
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLVA	Multilocus VNTR Analysis
MST	Minimum Spaning Tree
MST	MultispacerTyping
NJ	Neighbor-Joining
Pb	Paire de base
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
ST	Sequence Typing
T4SSs	Système de Sécretion Type 4
U.B	Unité de Base
VNTR	Variable Number Tandem Repeats

Liste des tableaux

Tableau 1 : Espèce de <i>Bartonella</i> retrouvées chez les carnivores domestiques et l'homme	4
Tableau 2 : Caractères biochimiques des espèces de <i>Bartonella</i> spécifiques aux carnivores domestiques	7
Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de typage	12
Tableau 4 : Prévalence de <i>B. henselae</i> chez les chats errants et de fourrière	18
Tableau 5 : Principales bactéries vectorisées transmises chez les carnivores domestiques	28
Tableau 6 : Prévalence ou séroprévalence d' <i>Anaplasma phagocytophilum</i> chez des chiens de propriétaires (sains et malades)	36
Tableau 7 : Séroprévalence de <i>Borrelia burgdorferi</i> chez des chiens de propriétaires (sains ou malades)	48
Tableau 8 : Programme d'amplification de la séquence inter génique ITS 16S-23S de Bartonella	55
Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel pour un volume de 25 µl	56
Tableau 10 : Programme d'amplification pour le génotype de <i>B. henselae</i>	57
Tableau 11 : Composition du mélange réactionnel	57
Tableau 12 : Caractéristiques des amorces utilisées	58
Tableau 13 : Programme d'Amplification	59
Tableau 14 : Composition du mélange réactionnel	59
Tableau 15 : Taille de l'unité de base de chaque BHV et la valeur Δ correspondante ..	60
Tableau 16 : Caractéristiques des amorces utilisées dans la technique MLST	61
Tableau 17 : Programme d'amplification	61
Tableau 18 : Composition du mélange réactionnel	62
Tableau 19 : Composition du milieu de culture pour les cellules Véro	65
Tableau 20 : Barème de lecture des lames d'immunofluorescence	67
Tableau 21 : Distribution de <i>B. henselae</i> chez la population féline étudiée	68
Tableau 22 : Description des 52 profils alléliques et répartition par chat et par génotype ARN 16s	71
Tableau 23 : Répartition des différentes souches et type par chat	73
Tableau 24 : Comparaison des génotypes ARN16s et du nombre de répétition pour les 5 BHV entre les souches algériennes et les souches du reste du monde	74

Tableau 25 : répartition des allèles majoritaires des BHVC et BHVE dans les différentes populations étudiées	75
Tableau 26 : Typage MLST des 12 souches de <i>B. henselae</i>	75
Tableau 27 : Distance moyenne entre profils MLVA	77
Tableau 28 : Résultats de la sérologie à <i>B. henselae</i> par immunofluorescence indirecte	81
Tableau 29 : Résultats de la sérologie à <i>B. clarridgeiae</i>	81
Tableau 30 : Relation entre le statut sérologique de <i>B. henselae</i> et <i>B. clarridgeiae</i>	81
Tableau 31 : Répartition des effectifs par titre pour les deux antigènes	82
Tableau 32 : Séroprévalence à <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>B. henselae</i> et <i>B. vinsonii berkhoffii</i>	83
Tableau 33 : Séroprévalence des co-infections à <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>B. henselae</i> et <i>B. vinsonii berkhoffii</i> en fonction des facteurs de risque	68

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique du genre <i>Bartonella</i>	5
Figure 2 : Morphologie de <i>B. clarridgeiae</i>	6
Figure 3 : Colonies de <i>B. henselae</i>	6
Figure 4 : Stratégie de l'infection chez <i>Bartonella</i>	13
Figure 5 : Cycle de transmission de <i>B. henselae</i>	21
Figure 6 : Phonogramme de la famille <i>Anaplasmataceae</i> sur la base de la comparaison de séquences d'ARN16s ribosomal	30
Figure 7 : Cycle de transmission d' <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	35
Figure 8 : Arbre phylogénétique de <i>Borrelia burgdorferi</i>	41
Figure 9 : Structure et morphologie de <i>Borrelia burgdorferi</i>	42
Figure 10 : Transmission de <i>Borrelia burgdorferi</i> chez la tique <i>Ixodes</i>	44
Figure 11 : Cycle de transmission de <i>Borrelia burgdorferi</i>	47
Figure 12 : Résultats de la migration des produits d'amplification de la PCR ITS 16S-23S de six souches	69
Figure 13 : Résultat de la migration d'amplifiats obtenus pour chaque BHV	70
Figure 14 : Proportion des chats bactériémiques en fonction de l'âge	76
Figure 15 : Dendrogramme obtenu par la méthode "Neighbor-Joining"	78
Figure 16 : Diagramme des deux clusters obtenus par la méthode "Structure-Neighbor"	79
Figure 17 : Minimum Spaning Tree (MST)	80

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les infections dont l'agent est transmis par un vecteur arthropode sont multiples et d'une très grande hétérogénéité. Elles concernent des parasites, des bactéries et des virus ; les cycles de transmission sont complexes et impliquent des hôtes qui peuvent être humains, animaux, ou les deux. La transmission vectorielle intègre non seulement des facteurs liés aux vecteurs, aux hôtes et aux agents pathogènes, mais également des composantes environnementales, climatiques et socio-économiques. Les arthropodes hématophages impliqués dans la transmission ont des biologies et des interactions avec l'hôte humain et/ou animal et l'environnement qui varient donc d'un arthropode, d'une région et d'une année à l'autre.

Aujourd'hui, on craint que le changement climatique, notamment la prolongation des saisons, le réchauffement de la température et la modification de la configuration des précipitations, n'entraîne des conditions propices à l'établissement et à la prolifération de maladies à transmission vectorielle. Un grand nombre de ces maladies sont aujourd'hui qualifiées d'émergentes ou ré-émergentes. En effet, leur apparition dans des zones jusque-là indemnes et leur impact sur les santés animale et humaine les placent au cœur de l'actualité médicale vétérinaire.

De nombreuses maladies potentiellement émergentes et de grande importance médicale sont observées chez les carnivores domestiques. Les agents de ces maladies sont transmis par les arthropodes, en particulier les tiques et les puces. Ces derniers se sont révélés être impliqués dans la transmission de nombreux agents pathogènes. On citera principalement les bactéries des genres *Anaplasma*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Hémoplasmes*, *Neorickettsia* et *Rickettsia*. Le diagnostic des affections induites par ces bactéries n'est pas aisé car les tableaux cliniques ne sont pas spécifiques. Il repose sur la confrontation des éléments épidémiologiques avec les signes cliniques. L'établissement d'un diagnostic de certitude fait appel au laboratoire par la réalisation de méthodes de diagnostic direct et indirect.

La situation de ces infections vectorielles et la connaissance de leur potentiel épidémique en Algérie est peu connue. Toutefois certaines études ont montré le portage par certains vecteurs arthropodes, notamment les puces, d'agents bactériens (*Bartonella* spp. et *Rickettsia* spp.) potentiellement pathogènes pour les carnivores domestiques (Bitam *et al.*, 2009 ; Bitam *et al.*, 2011). D'autre part, une étude moléculaire a montré la présence de trois

bactéries hémotropes vectorisées, *Bartonella berkhoffii vinsonii*, *Bartonella clarridgeiae* et *Bartonella elizabethae* chez 80 chiens de propriétaires (Kernif *et al.*, 2010).

Enfin, dans ce contexte écologique et épidémiologique très évolutif, le clinicien et l'infectiologue, qui sont en premières lignes face à ces maladies, ont bien sûr un rôle majeur dans la démarche diagnostique et de prise en charge, ce qui souligne l'intérêt de l'actualisation rapide des situations épidémiologiques chez les hôtes réservoirs et accidentels. Ainsi, de multiples pistes de recherche dans ce domaine s'offrent donc à nous en Algérie.

Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés en particulier à l'estimation de la séroprévalence des espèces *Bartonella* chez les carnivores domestiques et à l'analyse de la diversité génétique des souches de *B. henselae* dans une population féline. L'objectif de cette étude a été aussi complété par l'évaluation de la séroprévalence à *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi* chez des chiens de propriétaire et de fourrière.

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique. La première partie servira à présenter les principales données concernant les bactéries du genre *Bartonella* chez les carnivores domestiques. La deuxième partie disséquera les différents éléments concernant les bactéries du genre *Anaplasma* et *Borrelia* chez les carnivores domestiques.

Le deuxième chapitre s'intéresse à l'enquête épidémiologique menée sur les carnivores domestiques dans la région d'Alger. Le protocole des techniques utilisées est détaillé puis les résultats sont exposés et commentés. Enfin nous concluons ce travail par des perspectives.

CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIÈRE PARTIE : LES BACTÉRIES DU GENRE *BARTONELLA* CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES

1. HISTORIQUE

Les *Bartonella* sont de petites bactéries hémotropes, connues depuis le XXème siècle et qui infectent de nombreuses espèces de mammifères. Les premières manifestations cliniques, associées à ces bactéries furent observées tout d'abord chez l'homme. Ainsi, trois maladies humaines majeures ont été décrites :

La maladie de Carrion qui regroupe la fièvre de Oroya et la verruga peruana. Elle est due à *Bartonella bacilliformis*, espèce décrite en 1909 par Alberto Barton puis cultivée en 1926 par Noguchi et Battistini.

La fièvre des tranchées ou fièvre des cinq jours. En 1915, on identifie *Rickettsia quintana* comme la bactérie responsable de cette maladie. Après son isolement pour la première fois en culture cellulaire, elle est renommée *Rochalimaea quintana*. La mise en culture sur milieu gélosé ne fut possible qu'en 1966 par Vinson.

La maladie des griffes du chat (MGC) a été décrite en 1950 par Debré et ses collaborateurs. Ils ont été les premiers à établir une relation entre une adénopathie régionale persistante et un contact avec les félidés, particulièrement lors de griffures ou de morsures. En 1992, deux équipes (Regnery *et al.* 1992 et Welch *et al.* 1992) décrivent une nouvelle espèce bactérienne pour laquelle ils proposent le nom de *Rochalimaea henselae*.

Après 1993, le nombre d'espèce appartenant au genre *Bartonella* a considérablement augmenté du fait de la découverte et de la caractérisation de nouvelles bartonelles ainsi que du remaniement de la classification de certaines bactéries incluses jusqu'alors dans d'autres genres (Brenner *et al.*, 1993).

2. TAXONOMIE

L'apparition et le développement des techniques de biologie moléculaire ont fortement contribué à la reconstitution taxonomique de la famille des *Bartonellaceae*. Ainsi les bactéries appartenant au genre *Rochalimea* et *Grahamella* ont été reclassées dans le genre *Bartonella* sur la base d'une étude d'hybridation ADN-ADN et sur l'alignement des séquences de gènes codant l'ARNr 16s (Birtles *et al.*, 1993).

Sur le plan phylogénique, le genre *Bartonella* est classé dans le groupe des alpha 2-*Proteobacteria*, proche des genres *Brucella*, *Afipia*, *Agrobacterium* et *Rhizobium*, mais plus éloigné du genre *Rickettsia*.

Les carnivores domestiques et sauvages constituent un important réservoir de bartonelles. Au moins 7 espèces ou sous-espèces parmi les 25 validement décrites ont été identifiées chez le chat et le chien (Tableau 1) (Boulouis *et al.*, 2008 ; Chomel *et al.*, 2010).

Tableau 1 : Espèces de *Bartonella* retrouvées chez les carnivores domestiques et l'homme (Adapté et modifié de Tsai *et al.*, 2011 ; Boulouis *et al.*, 2007)

<i>Bartonella</i> spp.	Réservoir principale	Hôte accidentel	Vecteur*
<i>B. bacilliformis</i>	Homme	Aucun	Phlébotome (<i>Lutzomia</i> sp)
<i>B. quintana</i>	Homme	Chien, Chat	Pou (<i>Pediculus humanis</i>)
<i>B. elizabethae</i>	Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	Homme, Chien	<i>Xenopsylla cheopis</i> , puces du Rat
<i>B. bacilliformis</i>	Homme	Aucun	Phlébotome (<i>Lutzomia</i> sp), poux, puces (<i>Pulex irritans</i> , <i>Orchopeas howardi</i>)
<i>B. grahamii</i>	Micromammifères sauvages (<i>Clethrionomys glareolus</i> , <i>Microtus agrestis</i> , <i>Apodemus flavicollis</i>)	Homme	Puces de rongeurs, Phlébotomes,
<i>B. henselae</i>	Chat	Homme, Chien	<i>Ctenocephalides felis</i> , <i>Ctenocephalides canis</i> , <i>Ixodes</i> spp., <i>Ripicephalus sanguineus</i>
<i>B. clarridgeiae</i>	Chat	Homme, Chien, Rongeur (<i>Sigmodon hispidus</i>)	<i>Ctenocephalides felis</i> , <i>Ctenocephalides canis</i> , <i>Ctenocephalides lushuiensis</i> , <i>pylogenis gwyni</i>
<i>B. koehlerae</i>	Chat	Homme	<i>Ctenocephalides felis</i>
<i>B. vinsonii berkhoffii</i>	Coyote, Chien	Homme	<i>Ctenocephalides felis</i> <i>pulex</i> spp., <i>cediopsylla</i> <i>inequalis interrupta</i> , <i>Ixodes</i> <i>pacificus</i>
<i>B. vinsonii arupensis</i>	Souris à pattes blanches (<i>Peromyscus leucopus</i>)	Homme	<i>Ripicephalus microplus</i> , (puce ?)
<i>B. washoensis</i>	Écureuil fournisseur de Californie	Homme, chien	Inconnu (puce ?)
<i>B. alsatica</i>	Lapin	Homme, Chat sauvage (<i>Felis silvestris</i>)	Puce (<i>Spilopsyllus cuniculi</i> , <i>Ctenocephalides felis</i>)
<i>B. bovis</i>	Bovin	Chat	<i>Haematobia</i> spp.
<i>B. rochalimae</i>	Renard roux et gris,	Homme	Puce (<i>Pulex irritans</i>)

	Raton laveur, Coyote		
<i>B. tamiae</i>	Rat	Homme	Acariens (<i>Leptotrombidium</i> spp)

* vecteurs confirmés / potentiel

À côté de *Bartonella henselae*, isolée chez le chat, deux autres espèces, *Bartonella clarridgeiae* et *Bartonella koehlerae* ont été identifiées respectivement en 1996 et 1999. Ces trois espèces sont révélées comme agent de zoonoses (Boulouis et al., 2005 ; Droz et al., 1999).

Bartonella vinsonii sous espèce *berkhoffii* fut isolée pour la première fois en 1993 du sang d'un chien atteint d'endocardite. Depuis, il a été démontré que cette bactérie était un important agent pathogène chez le chien et un pathogène émergent chez l'homme.

À ce jour, 4 génotypes de *Bartonella vinsonii berkhoffii* ont été identifiés sur la base de la présence de délétions et d'insertions au niveau du fragment intergénique 16S-23SR (Kordick and Breitschwerdt, 1998 ; Chang et al, 2000 ; Maggi et al., 2006 ; Duncan et al., 2007).

Les relations phylogénétiques au sein du genre montrent que *Bartonella bacilliformis* occupe une position très éloignée par rapport aux autres groupes d'espèces (Figure 1). Elle appartient à la lignée 1 dite lignée ancestrale. Par contre, les espèces dites modernes forment quant à elles trois autres lignées : la lignée 2 regroupe les quatre espèces de *Bartonella* spécifiques aux ruminants (*Bartonella bovis*, *Bartonella capreoli*, *Bartonella chomelii* et *Bartonella schoenbuchensis*) et la lignée 3 regroupe les 19 espèces restantes. *Bartonella clarridgeiae* forme un groupe distinct qui correspond à la lignée 4 (Saenz et al., 2007 ; Engel et al., 2011).

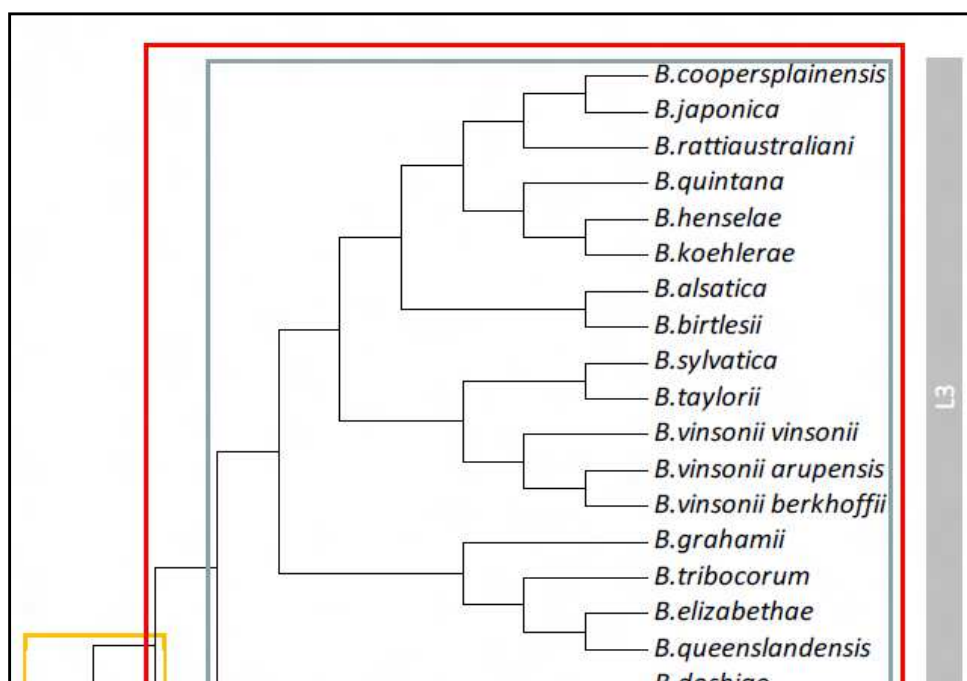


Figure 1 : Arbre phylogénétique du genre *Bartonella* (adapté de Deng *et al.*, 2012)

3. PROPRIÉTÉS PHÉNOTYPIQUES

3.1. MORPHOLOGIE

Les bartonelles sont de petits bacilles ou des cocco-bacilles à Gram négatif, polymorphes, non acido-alcool-résistants. Elles ne dépassent pas 3 μm de longueur. *B. henselae* mesure de 0,3 à 0,6 μm sur 0,3 à 1 μm . Certaines d'entre elles possèdent des caractéristiques morphologiques particulières : *B. bacilliformis* et *B. clarridgeiae* (Figure 2) sont flagellées alors que *B. henselae* et *B. quintana* possèdent des pilis (Breitschwerdt et Kordick, 2000).

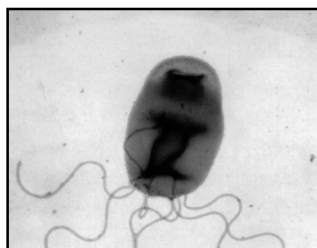


Figure 2 : Morphologie de *B. clarridgeiae* (Dehio, 2012)

3.2. CARACTÈRES CULTURAUX ET BIOCHIMIQUES

Les bactéries du genre *Bartonella* sont aérobies strictes, oxydase, catalase, uréase et nitrate réductase négatives (*Bartonella henselae* est faiblement catalase positive), et indole négative. Ces bactéries croissent sur milieux enrichis de type Columbia ou cœur-cerveille additionné de 5 à 10 % de sang défibriné de lapin ou de cheval (le sang de mouton donne de moins bons résultats). Une croissance optimale nécessite une atmosphère humide enrichie de 5% de dioxyde de carbone (sauf pour *Bartonella bacilliformis* et *Bartonella clarridgeiae* qui se cultivent mieux en l'absence de dioxyde de carbone), une température de 34 à 37 °C. L'incubation est longue et elle dure de 5 jours à 4-6 semaines (Boulouis et al., 2005). Les colonies peuvent être polymorphes mais sont généralement petites, blanches ou grises, rugueuses et adhérentes à la gélose (Figure 3). Après repiquage, la croissance est généralement plus rapide (à l'exception des colonies de *Bartonella koehlerae*) mais les colonies peuvent perdre certaines de leurs caractéristiques.

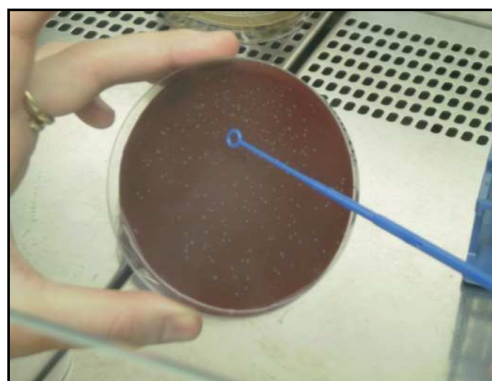


Figure 3 : *B. henselae* sur gélose au sang de lapin

Cependant, les conditions de croissance requises sont parfois différentes pour certaines d'entre elles : *B. bacilliformis* a une température optimale de croissance comprise entre 25 et 28°C alors que *B. clarridgeiae* se cultive sur gélose au sang de mouton ou sur gélose chocolat.

La coloration de Gimenez permet de visualiser les bactéries sur culture cellulaire. Les sources d'énergie sont le pyruvate, le succinate, la glutamine mais pas le glucose. Les *Bartonella* présentent peu de caractéristiques biochimiques utilisables pour une diagnose à l'exception de la production d'aminopeptidases et sont inertes vis-à-vis des galeries de diagnostic usuelles (Tableau 2) (Boulouis et al., 2005, Maillard, Riegel et al., 2004a).

Tableau 2 : Caractères biochimiques des espèces de *Bartonella* spécifiques aux carnivores domestiques (adapté de Welch, 2005)

Tests	<i>B. henselae</i>	<i>B. clarridgeiae</i>	<i>B. koehlerae</i>	<i>B. vinsonii berkhoffii</i>
Oxydase	-	-	-	+
Catalase	v	-		-
Réduction des nitrates	-	-		+
Indole	-	-		-
Uréase	-	-		+
O ou F du glucose	-	-		-
Voges-Proskauer	-	-	-	

(-) Négatif, (+) Positif, (V) Variable, (O) Oxydation, (F) Fermentation.

4. PROPRIÉTÉS GÉNOTYPIQUES

4.1. GÉNOME

Actuellement, les génomes de *B. henselae* (2004), *B. quintana* (2004), *B. bacilliformis* (2007), *B. tribocorum* (2007) et plus récemment *B. grahamii* (2009) ou *B. birtlesii* (2012) sont disponibles (Alsmark *et al.*, 2004 ; Saenz *et al.*, 2007 ; Berglund, 2009) (Rolain *et al.*, 2012). La taille du génome des bartonelles varie de 1,45 à 2,62 MB. Son contenu en guanine et cytosine (GC%) est faible de 35,7 à 38,8%. En réalité, la petite taille du génome des bartonelles reflète à la fois leur excellent pouvoir d'adaptation au métabolisme de l'hôte mais aussi leur pathogénicité (Alsmark *et al.*, 2004 ; Kosoy *et al.*, 2012).

Au sein de l'espèce *B. henselae*, deux génotypes fondés sur la séquence ARN 16S et désignés respectivement Houston-1 (génotype I) et Marseille (génotype II) (Bergmans *et al.*, 1996 ; Drancourt *et al.*, 1996).

Par ailleurs, une étude génomique comparative suggère que *B. quintana*, espèce adaptée à l'homme, dériverait de l'espèce *B. henselae*. Cette évolution est le résultat d'une réduction génomique et d'une perte de gène chez *B. quintana* (Engel and Dehio, 2009).

4.2. OUTILS D'IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES DE *BARTONELLA*

L'outil universel d'identification moléculaire chez les bactéries est le gène 16Sr RNA. Il est utilisé pour identifier de nombreuses espèces bactériennes et il est considéré comme le gène le plus informatif dans les études phylogénétiques (Olsen and Woese, 1993b). Ainsi, certaines espèces de *Bartonella* telle que *B. henselae*, *B. quintana* et *B. bacilliformis* peuvent être clairement

différentiées par analyse de la séquence de ce gène ribosomal (Kosoy *et al.*, 2012). Cependant, l'utilisation de ce gène comme marqueur moléculaire est d'intérêt limité chez le genre *Bartonella* car, en réalité, il ne permet pas de différencier toutes les espèces, les ARN ribosomaux étant en général bien conservés chez ces germes.

Des chercheurs ont donc exploré d'autres gènes ou portions de gène pour une meilleure différenciation des espèces de *Bartonella*. Les gènes principalement décrits et utilisés sont : les gènes codant l'extrémité 3' du gène de la citrate synthase (gltA) (Birtles *et al.*, 1996, Norman *et al.*, 1995), la riboflavine synthase (ribC) (Bereswill *et al.*, 1999), la protéine de choc thermique de 60 kDa (GroEL) (Zeaiter *et al.*, 2002), la protéine de division cellulaire (ftsZ) (Zeaiter *et al.*, 2002 ; Kelly *et al.*, 1998), la protéine 17kDa, la flagelline Fla (Sander *et al.*, 2000), la protéine de choc thermique HtrA (Anderson *et al.*, 1997), l'endoribonucléase B (RpoB) (Pitulle *et al.*, 2002) et le fragment intergénique 16S-23S rRNA ou ITS pour Internal Transcribed Spacer (Birtles *et al.*, 2000).

La Scola et ses collaborateurs (2003) ont ainsi comparé le pouvoir discriminant de sept marqueurs génotypiques (ARNr16S, gltA, groEL, rpoB, ftsZ, ribC gènes et le fragment intergénique (ITS) chez des espèces de *Bartonella*. Leur étude a montré que le gène ARN r16s était le moins discriminant en comparaison des autres gènes. Seuls les deux gènes GltA et rpoB ont permis de différencier les 17 espèces et sous espèces testées.

Par ailleurs, il est important de noter que l'utilisation du gène gltA est la méthode la plus appropriée à la bactériologie pratiquée dans le cadre d'un diagnostic clinique pour identifier rapidement les espèces de *Bartonella* connues (Birtles et Raoult, 1996).

4.3. LES TECHNIQUES DE TYPAGE MOLÉCULAIRE

Le principe des méthodes de génotypage consiste à rechercher des polymorphismes qui peuvent être de différentes natures et d'échelles variables allant des grands réarrangements génomiques à la mutation ponctuelle en passant par des délétions ou insertions de courtes séquences. *Bartonella henselae* est l'espèce pour laquelle les outils de typage et d'analyse moléculaire de variation génétique sont les plus développées. On distingue les techniques de première génération et seconde génération.

4.3.1. Techniques de première génération

Décrites à partir des années 1990, une grande majorité de ces techniques sont maintenant abandonnées et seule la technique d'E.C.P continue à être utilisée par certains laboratoires. Parmi ces techniques, on décrit principalement :

4.3.1.1. L'Électrophorèse en Champs Pulsé (E.C.P ou PFGE pour Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Il s'agit d'une technique de RFLP-ECP qui consiste à digérer l'ADN génomique d'une bactérie avec des enzymes de restriction à sites de coupure rares. Les fragments de grande taille (30 à 2000 Kb) obtenus sont alors séparés dans une matrice d'agarose de faible pourcentage et la migration se réalise en alternant des champs électriques perpendiculaires pour faciliter le passage à travers les mailles du gel. Il est ainsi possible de distinguer les différents isolats à partir du nombre de fragments obtenus ou de leur taille.

De nombreuses études ont été menées pour mettre en évidence les enzymes de restriction les plus discriminantes pour l'espèce *Bartonella henselae*. Ainsi, différentes endonucléases (*TaqI*, *EagI*, *SmaI*, *HindIII*, *HaeIII*, *XbaI*, *HhaI*, *NotI*) ont été utilisées. Seules les enzymes *SmaI* et *NotI* ont permis d'obtenir des profils différents et de définir des variants génétiques au sein de *B. henselae* (Kabeya *et al.*, 2002; Maruama *et al.*, 2004 ; Arvand *et al.*, 2006).

Dans une étude plus récente, Arvand *et al.*, (2007b) ont évalué le pouvoir discriminant de trois nouvelles endonucléases *ApaI*, *Eco52I* et *XmaI* et démontré leur intérêt sur 20 souches de *B. henselae* : le nombre de fragments obtenus était respectivement de 9 à 11 fragments, 12 à 14 fragments et 15 à 17 fragments. La taille des bandes était comprise entre de 30 à 300 Kb.

4.3.1.2. ERIC-PCR

Il s'agit d'une technique qui est basée sur la présence de séquences répétées dans le génome des bactéries. Elle utilise les séquences ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic), qui correspondent à des séquences répétées intergéniques (126 Pb) spécifiques des Entérobactéries. Utilisant cette approche, Sander *et al.*, (1997) ont mis en évidence 4 profils parfaitement distincts sur un total de 18 souches analysées.

4.3.1.3. REP-PCR

Les séquences REP ou Répétitive Extragenic Palindromic (35 Pb) sont situées dans des régions intergéniques d'un opéron. Une amorce unique spécifique de ces régions permet l'amplification de fragments d'ADN de taille variable. Les produits de ces PCR aléatoires sont séparés par électrophorèse produisant ainsi un profil de bandes. L'association des deux systèmes de typage ERIC-PCR et REP-PCR a permis à Rodriguez *et al.*, (1995) de définir 5 profils différents sur 17 isolats de *B. henselae* d'origine féline et humaine.

4.3.1.4. RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) ou AP-PCR (Arbitrarily Primed-PCR)

Les marqueurs RAPD sont générés par l'amplification de séquences aléatoires d'ADN avec de petites amorces de séquences nucléotidiques également aléatoires. Une faible stringence de la PCR et la petite taille des amorces vont favoriser l'amplification de plusieurs régions du génome et d'obtenir ainsi plusieurs bandes après migration électrophorétique du produit d'amplification. Les produits d'amplification sont donc soit présents si l'amorce a pu s'hybrider à l'ADN, soit absents si elle n'a pas pu s'hybrider.

Le nombre et la localisation des zones d'hybridation des amorces varient d'une souche à une autre au sein de la même espèce. Pour le typage de *B. henselae*, un seul primer (M13) a été utilisé et il a permis de différencier 4 profils sur 17 isolats testés (Gräser, 1993).

4.3.1.5. PCR- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

La technique RFLP aboutit à des variations dans la longueur des fragments d'ADN obtenus à la suite d'une PCR puis d'une étape de digestion par des enzymes de restriction. Le profil électrophorétique est établi en soumettant un gel à un champ pulsé lorsque les réarrangements concernent de grands fragments d'ADN. Pour une enzyme donnée, l'absence ou la présence d'un site de restriction détermine le nombre et la taille des fragments générés.

Chez *B. henselae*, l'amplification de la séquence intergénique 16S-23S (ITS) de 10 isolats suivie d'une digestion des amplifiats par les enzymes *AluI* et *HaeIII* a montré après analyse des bandes, la présence de 6 et 4 profils résultant de la digestion par les enzymes *AluI* et *HaeIII* respectivement (Matar, 1993).

4.3.2. Technique de seconde génération

4.3.2.1. Techniques basées sur le séquençage

A- Technique du Multi-Locus Sequence Typage (MLST)

Le MLST est une méthode de séquençage partiel de l'information génétique de souches bactériennes. Il porte sur des portions de gènes constitutifs d'agents pathogènes dits "gènes ménage", désignant un gène dont l'expression est indispensable au métabolisme

de la bactérie. Les gènes séquencés ont la particularité d'être indépendants de la virulence de l'agent pathogène (Maiden *et al.*, 1998 ; Struelens, 2000).

Le typage MLST a été développé pour *B. henselae* par Iredell *et al.*, en 2003. L'étude a porté sur l'analyse du polymorphisme de 9 gènes de ménage chez 37 isolats d'origine humaine ou féline. 7 profils/ST (séquence type) distincts ont été obtenus. Cette méthode est actuellement appliquée et utilisée par de nombreux laboratoires pour des études épidémiologiques et phylogénétiques avec formation de biothèque. Arvand et collaborateurs (2007a) ont étudié les relations entre profils MLST et origine géographique chez *B. henselae*. L'analyse de 182 isolats (origine humaine ou féline) provenant d'Amérique, d'Europe et d'Océanie par séquençage de 8 loci (321 Pb à 522 Pb) issus de 8 gènes de ménage (*16S rRNA*, *batR*, *gltA*, *groEL*, *ftsZ*, *nlpD*, *ribC* et *ropB*) a révélé un nombre total de 14 profils alléliques. Soit-cent six % des isolats humains correspondent au profil ST1 et 27.2% des isolats félins au profil ST1. Par ailleurs, le profil ST1 a été identifié sur les trois continents quant au profil ST7, il n'a été observé que sur le continent européen et uniquement chez l'espèce féline.

B- MST (MultispacerTyping)

La méthode de typage MST (Multispacer Sequence Typing: typage par séquençage de multiples régions intergéniques) est une variante du MLST, basée sur l'étude de séquences de régions intergéniques du génome.

Ces régions sont considérées comme potentiellement plus variables que celles des gènes codants, car soumises à une plus faible pression sélective. Cette méthode a été développée chez *B. henselae* en 2006 par Li et al. Dans ce travail, les auteurs ont testé 126 isolats de *B. henselae* et 9 régions intergéniques variables ont été séquencées permettant la caractérisation de 39 types de séquence (ST) différents.

4.3.2.2. Technique basée sur la présence de VNTR (Variable Number Tandem Repeats)

La technique MLVA (Multi locus VNTR Analysis) est basée sur l'étude de séquences de nucléotides répétées plusieurs fois en tandem appelées VNTR. Ces minisatellites sont composés d'unités répétées de 6 à plusieurs centaines de paires de base. Ils peuvent être intragéniques ou, le plus souvent, extragéniques. Les sites du génome (*loci*) comprenant ces régions répétées sont amplifiés par PCR grâce à des amorces dessinées dans les zones flanquantes des VNTR. Le produit d'amplification ainsi obtenu a donc une taille directement proportionnelle au nombre de régions répétées. La variation du nombre de copies de ces séquences crée un polymorphisme de taille. D'une souche à l'autre, le nombre de répétitions peut varier et l'analyse de plusieurs VNTR permet d'obtenir une « empreinte génétique » d'un clone bactérien.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses méthodes de typage MLVA. ont été développées et appliquées pour des bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* (Frothingham et Meeker-O'Connell, 1998), *Neisseria meningitidis* (Killoran et al, 2006), ou *Bacillus anthracis* (Lista et al. 2006). Ainsi, Monteil et collaborateurs (2007) ont mis au point la technique MLVA pour discriminer des isolats de *B. henselae*. Le développement de cette méthode a été grandement facilité par le fait que le génome de la souche de référence ATCC 49882 (Houston I) soit entièrement séquencé. Dans cette étude, 30 VNTR candidats (Bhv-1 à Bhv-30) et leurs couples d'amorces ont été sélectionnés puis testés sur 6 isolats de *B. henselae*. La majorité des séquences choisies étaient situées dans la partie terminale du génome. Seul, 11 Bhv parmi les 30 testés, ont été retenus sur la base de leur dimorphisme (6 Bhv) ou polymorphisme (5 Bhv). Ces derniers ont été à nouveau testés sur 44 isolats de *B. henselae* et seul cinq BHV ce sont avérés polymorphes. De plus, cette analyse a permis de distinguer 31 profils et de séparer les 44 isolats dans un dendrogramme, en deux branches distinctes.

4.3.3. Comparaison des performances des différentes techniques de typage

Dans une autre étude, Bouchouicha et al., (2009) ont comparé les performances de la méthode MLVA avec d'autres techniques de typage PFGE, MLST et MST, en analysant des isolats et des souches de *B. henselae* préalablement testés par au moins une de ces techniques. La technique MLVA s'est avérée plus discriminante avec un nombre de profils et un index de diversité supérieure aux techniques précédemment citées.

De nombreux critères doivent être définis pour évaluer une technique de typage. En premier lieu, la typabilité, c'est à dire la possibilité d'obtenir un résultat interprétable pour une proportion de souches au sein d'une espèce. Ensuite, la reproductibilité, qui est la capacité d'une technique à classer dans le même type une même souche testée de façon répétée et enfin le pouvoir discriminant de la technique. Par ailleurs, la facilité d'application et d'interprétation sont également importantes.

Le tableau ci-dessous fait le bilan des avantages et inconvénients des différentes techniques de typage présentées dans le paragraphe précédent.

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de typage

Méthode de typage	Pouvoir discriminant	Typabilité	Reproductibilité	Facilité D'interprétation	Cout relatif
PFGE	modéré	excellente	moyenne	bonne	élevé

RFLP	variable	excellente	variable	moyen	moyen
RAPD	faible	excellente	faible	faible	moyen
MLST	moyen	optimale	excellente	excellente	élevé
Typage VNTR	excellent	excellente	excellente	excellente	faible

D'une manière générale, rares sont les techniques qui répondent à tous ces critères et aucune n'offre des performances idéales. En effet, certaines méthodes sont très lourdes à mettre en place, très coûteuses et surtout les résultats ne sont pas comparables entre laboratoires. La seule façon de confirmer que deux souches sont identiques ou différentes est de combiner deux techniques utilisant des marqueurs indépendants pour obtenir une classification clonale stable.

4.4. LES MÉCANISMES À L'ORIGINE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE CHEZ LES BARTONELLES : CAS DE *BARTONELLA HENSELAE*

L'utilisation des techniques de typage PFGE, MLST, MST et MLVA a révélé l'existence d'une importante hétérogénéité génétique au sein de l'espèce *B. henselae*.

La diversité génétique et la variabilité observées chez *B. henselae* sont le reflet de stratégies adoptées par cet agent pathogène pour pouvoir se multiplier et persister chez son hôte. En effet, *B. henselae* entraîne chez l'hôte réservoir une bactériémie prolongée et récurrente. Cette persistance intra-erythrocytaire a nécessité l'acquisition par la bactérie d'importantes capacités d'adaptation aux hôtes vertébrés et à leurs systèmes naturels de défenses.

Ainsi, Lindroos *et al.*, (2006) suggèrent que la variation génétique observée chez *B. henselae* est l'expression d'une remarquable plasticité génomique qui se traduit par des phénomènes de réarrangements et de délétions au niveau des îlots génomiques ou «GEI » qui concentrent les gènes de virulence et favorisent leur régulation concertée

(Guy *et al.*, 2012). Ces variants génétiques jouent un rôle important dans la colonisation et l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte.

D'autre part, la présence de séquences répétitives d'ADN dans les domaines tige des gènes *Vomp* et *badA*, ayant des fonctions d'adhésines, augmente la fréquence des mécanismes de recombinaison et donc la variation antigénique à la base de l'évitement de la réponse immunitaire spécifique de l'hôte (Riess, 2007).

Des preuves *in vivo* de la variation de phase de *Vomp* ont été apportées dans un modèle animal d'infection à *Bartonella quintana*, avec une délétion dans le locus *Vomp* au cours de l'infection persistante de la circulation sanguine (Zhang, 2004). Ainsi, ces stratégies de variation de phase et antigénique pourraient être utilisées par d'autres espèces de *Bartonella* pour se lier à différents types cellulaires de l'hôte et pour éviter d'être la cible du système immunitaire de l'hôte.

5. BIOLOGIE ET ÉPIDÉMIOLOGIE DES INFECTIONS À BARTONELLES CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES

5.1. CYCLE ÉVOLUTIF ET STRATÉGIE D'INFECTION

Le point commun entre les différentes espèces de bartonelles est leur hémotropisme chez les mammifères réservoirs qui s'accompagne d'une bactériémie au long cours et récurrente. Cette caractéristique est déterminée par leur besoin en fer. Ces bactéries persistent au sein de leur hôte grâce à une biologie particulière et une transmission par le biais de vecteurs arthropodes piqueurs variés.

En effet, après inoculation, les bartonelles ne peuvent coloniser les érythrocytes qu'après un passage dans une niche cellulaire primaire, encore mal connue, dans laquelle la bactérie se multiplie et persiste. La phase de bactériémie a lieu 4 à 5 jours post-inoculation par

l'invasion des érythrocytes matures. Ce mode d'infection permet aux *Bartonella* d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et constitue en outre une excellente adaptation à la diffusion dans tout l'organisme et à la transmission vectorielle (Figure 4).

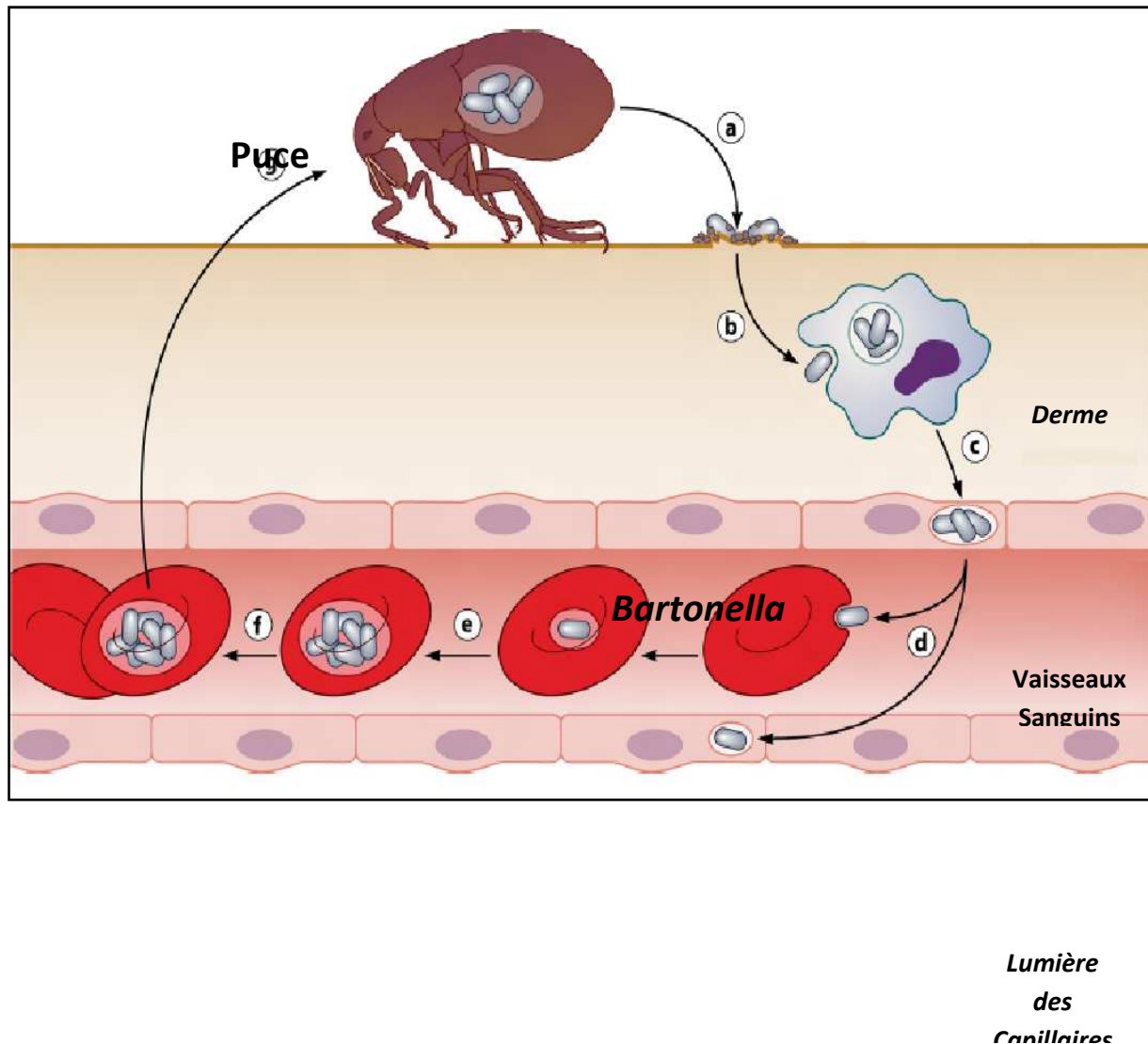


Figure 4 : Stratégie de l'infection chez *Bartonella* (adaptée et modifiée de Dehio, 2012)

5.2. LA NICHE PRIMAIRE

Peu de travaux décrivent avec certitude le cheminement de l'infection entre la phase d'inoculation de *Bartonella* à la peau ou à la circulation sanguine et la phase de bactériémie. Dans une étude de Schülein *et al.* (2001), des rats ont été expérimentalement infectés par une souche fluorescente de *Bartonella tribocorum*. Après injection les bactéries colonisent une niche initiale de cellules dont l'identité reste incertaine. Cette colonisation commence quelques heures après l'inoculation et dure 3 à 4 jours. La phase de bactériémie a lieu 5 jours post-inoculation suite à l'invasion d'érythrocytes matures. Ainsi, environ tous les 5 jours, la niche primaire libère des bartonelles qui vont infecter de nouveaux érythrocytes matures.

En réalité, aucune preuve concluante n'a été publiée révélant sans équivoque l'identité cellulaire de la niche primaire. Néanmoins, la présence de données confirmant le tropisme de *Bartonella* pour la circulation sanguine et son interaction avec des tissus très vascularisés tels que le foie et la rate, laisse penser que les cellules endothéliales pourraient représenter cette niche primaire. Il semblerait que les cellules endothéliales soient infectées préférentiellement lorsque les bartonelles ne disposent pas des érythrocytes de leur hôte réservoir. Cette infection peut conduire à de véritables tumeurs vasculaires (Dehio, 2005).

Par ailleurs, il est probable que d'autres types de cellules puissent jouer le rôle de niche initiale. En effet, l'atteinte des ganglions lymphatiques lors d'une infection par *Bartonella* peut indiquer que le transport de cette bactérie via le système lymphatique est assuré par les lymphocytes ou les phagocytes mononucléés.

Ces cellules migratrices contribueraient donc à la dissémination de l'agent pathogène dans les tissus vasculaires et pourraient constituer une niche primaire (Kordick *et al.*, 1999a).

D'autres études, suggèrent que les cellules érythrocytaires progénitrices et les érythroblastes peuvent aussi servir de niche primaire pour les bartonelles (Rolain *et al.*, 2003a ; Mandle *et al.*, 2005).

Cependant, cette hypothèse est controversée par une expérimentation réalisée sur un modèle de rats infectés par GFP-*B. tribocorum*. On constate alors que la bactérie pouvait envahir des érythrocytes matures *in vivo* et qu'il n'est donc pas nécessaire de considérer les cellules progénitrices de la lignée érythrocytaire comme niche initiale (Schulein *et al.*, 2001).

5.3. INTERACTIONS AVEC LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET

AUTRES

CELLULES NUCLÉÉES

Un certain nombre d'études *in vitro* ont montré qu'en plus de son tropisme pour les érythrocytes, *B. henselae* pouvait envahir différentes cellules hôtes telles que les cellules endothéliales (Hill *et al.*, 1992), les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Musso *et al.*, 2001; Resto-Ruiz *et al.*, 2002; Schulte *et al.*, 2006; Vermi *et al.*, 2006). Une invasion des cellules épithéliales a été également décrite, mais ce modèle d'infection n'a pas été encore confirmé *in vitro* (Hill *et al.*, 1992; Batterman *et al.*, 1995).

L'interaction des bartonelles avec les cellules nucléées de l'hôte nécessite des pré-requis différents de ceux pour l'interaction avec les érythrocytes. Ceci est en grande partie lié à la différence de structure du cytosquelette de ces deux types de cellules.

En effet, plusieurs facteurs de virulence de *Bartonella*, tels que la protéine BadA (autotransporteurs trimériques-TAA) ou le système de sécrétion VirB/D4 (T4SS), contribuent aux mécanismes de colonisation des cellules nucléées de l'hôte. De ce fait, les bartonelles sont capables d'envahir les tissus vasculaires de plusieurs organes et y induire un processus caractéristique appelé néo-angiogenèse.

5.3.1. Adhésion

La première étape de l'infection des cellules nucléées est celle de l'adhésion à la matrice extracellulaire et à la membrane plasmique de la cellule hôte. Cette étape est médiée par des protéines de surface qui vont permettre l'attachement de la paroi bactérienne à celle de la cellule hôte. En 1995, Batterman *et al.*, ont mis en évidence le rôle des pilis dans l'adhésion des bartonelles aux HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Ces structures de surface ont été identifiées plus tard comme des adhésines appartenant à la classe des autotransporteurs trimériques TAAs (Riess *et al.*, 2004). Ces protéines non fimbriales de la membrane externe se caractérisent par trois parties : la tête (zone N-terminale), le corps (tige) et un domaine C-terminal d'ancrage dans la membrane qui appartiennent au système de sécrétion de type V (T5SS). Les principales protéines de la classe des autotransporteurs TAAS décrites chez les bartonelles sont les protéines BadA (*Bartonella* adhesin A) et les Vomps (variably expressed outer membrane proteins) qui s'expriment lors d'une infection par *B. henselae* et *B. quintana* respectivement (Zhang *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2011).

Chez *B. henselae*, la protéine Bad A module l'adhérence de la bactérie à des protéines de la matrice extracellulaire et à des protéines membranaires des cellules endothéliales

via les $\beta 1$ intégrines. Elle joue également un rôle dans la vasoprolifération, en activant le facteur HIF-1 (Hypoxia inducible facteur -1) qui est un facteur clé de transcription de l'angiogenèse et la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Riess *et al.*, 2004, Riess *et al.*, 2007).

D'autres facteurs de virulence possédant des propriétés d'adhésion aux cellules nucléées de l'hôte ont été décrits. Il s'agit de protéines de la membrane externe (OMPs) observées chez *B. henselae* et *B. quintana* (Minnick, 1994 ; Burgess and Anderson, 1998) et des protéines de la membrane externe capable de fixer l'hème HbpA (Pap31) mise en évidence chez *B. henselae* (Carroll *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2003).

5.3.2. Invasion

Le mécanisme d'invasion des cellules endothéliales par les bartonelles a été étudié *in vitro* sur les HUVEC. L'invasion des cellules en culture par *B. bacilliformis* (Hill, 1992) et *B. henselae* est actine-dépendante et aboutit à l'internalisation de petits groupes bactériens amassés à la surface de la cellule hôte dans des vacuoles appelées phagosomes. Ces caractéristiques sont celle d'une phagocytose, classique pour la cellule, mais induite par la bactérie. Cette phagocytose dépend de l'activation d'une protéine de la cellule endothéliale, la Rho GTPase. Cette dernière joue un rôle dans l'activation des molécules d'actine (Dehio, 2001).

En plus de cette phagocytose, *B. henselae* peut envahir la cellule hôte par une seconde voie qui repose sur trois étapes : agrégation des bactéries, englobement et incorporation. Une lamelle de cellules endothéliales en migration établit un contact avec des bactéries. Elle entraîne la formation d'un agrégat bactérien (constitué d'une centaine de bartonelles) à la surface de cellule hôte. Ainsi, des protrusions de membrane cellulaire viennent alors entourer cette formation, l'invasome. Par la suite, la vacuole obtenue peut pénétrer dans la cellule (Dehio, 1999). La formation de l'invasome est actine-dépendante et se déroule en 24 heures. Le système VirB/VirD4 joue un rôle dans ce processus d'invasion par *B. henselae*, puisqu'il intervient dans le réarrangement du cytosquelette à l'origine de la formation de l'invasome (Rhombert *et al.*, 2009; Truttmann *et al.*, 2011).

5.4. ANGIOGÉNÈSE

Les *Bartonella* (*B. bacilliformis*, *B. quintana* et *B. henselae*) sont les seules bactéries connues pour leur capacité à provoquer des lésions de vasoprolifération grâce à leur pouvoir d'invasion des

cellules endothéliales, et causer à la fois leur prolifération et leur migration. La protéine Bad A est un des facteurs de l'angiogenèse. Elle est exprimée durant les infections par *B. henselae* où elle intervient dans la vasoprolifération, en activant le facteur HIF-1 et induisant la sécrétion de VEGF.

L'angiogenèse est un processus pathologique observé dans la forme chronique de la maladie de Carrion (ou *verruca peruana*), dans l'angiomatose bacillaire et la péliose hépatique ou splénique provoquées par *B. henselae* et *B. quintana* chez les hôtes immunodéprimés. Ces lésions de vaso-prolifération sont constituées de cellules endothéliales, des bactéries et d'infiltrats mixtes de macrophages, de monocytes et de polynucléaires neutrophiles (Bhutto *et al.*, 1994).

5.5. PARASITISME DES ÉRYTHROCYTES

L'hémotropisme est une caractéristique des bartonelles. Le parasitisme des globules rouges confère à la bactérie le privilège non seulement d'être à l'abri des lysosomes et de la réponse immunitaire à médiation humorale, mais aussi la possibilité de persister au sein de l'hôte et par conséquent augmenter sa chance d'être absorbé par un arthropode hématophage. Toutefois, les érythrocytes matures, au contraire de toute autre cellule nucléée, ne contiennent pas de cytosquelette susceptible d'être détourné par la bartonelle. L'invasion d'un érythrocyte est donc un phénomène purement actif de la part des bartonelles.

5.5.1. Adhésion

L'adhésion spécifique des bartonelles aux érythrocytes de l'hôte semble être médiée par le système Trw T4SS. (Seubert *et al.*, 2003; Vayssier-Taussat *et al.*, 2010). Le gène Trw est exprimé exclusivement par les espèces de *Bartonella* de la 4^e lignée, dites modernes (Engel *et al.*, 2011). En revanche, *B. bacilliformis* et les espèces de *Bartonella* de la 2^e et 3^e lignée n'expriment pas ce gène, mais possèdent de multiples flagelles (Harms and Dehio, 2012). Il est donc possible de considérer que les flagelles jouent un rôle important dans l'adhérence de ces espèces aux érythrocytes mais qu'ils soient fonctionnellement remplacés par le système Trw chez les bactéries de la 4^e lignée.

Cependant, la fixation d'une souche mutante de *B. bacilliformis*, non flagellée, sur les érythrocytes est réduite de 75% (Walker et Winkler, 1981). Le rôle du flagelle dans l'adhésion aux globules rouges reste donc controversé.

5.5.2. Invasion

Les érythrocytes possèdent un cytosquelette passif interdisant à la cellule une activité phagocytaire. Les flagelles de *B. bacilliformis* lui procurent une force de propulsion qui semble intervenir dans l'invasion des érythrocytes, processus qui se déroule en quelques heures (Hill *et al.*, 1992 ; Mernaugh and Ihler, 1992). Une des principales caractéristiques de l'interaction de *B. bacilliformis* avec les érythrocytes humains est celle de la formation d'une invagination profonde dans la membrane de ces derniers. Ce phénomène est assuré par une protéine extracellulaire: la déformine, sécrétée durant la croissance de *B. bacilliformis* et *B. henselae*. Cette protéine, induit donc de grosses invaginations dans la membrane des érythrocytes dans lesquelles s'engouffrent les bactéries (Benson *et al.*, 1986).

Deux autres protéines interviennent dans le mécanisme d'invasion des érythrocytes : une hydrolase dont le rôle dans l'invasion est à déterminer et une protéine de 18 kDa localisée sur la membrane interne de la bactérie (Coleman and Minnick, 2001). Les gènes *ialA* et *ialB* (invasion-associated locus) codent pour ces deux protéines. Ces locus sont conservés chez toutes les espèces du genre *Bartonella*. Des études *in vitro* ont montré que des souches d'*E. coli* ayant reçu les gènes *ialA* et *ialB* sont capables d'envahir les érythrocytes humains. Par contre, une mutation sur le gène *ialB* chez *B. bacilliformis* réduit de 50% ses capacités à envahir les érythrocytes humains (Mitchell and Minnick, 1995). Le mécanisme d'action de la protéine de l'*ialA* est encore inconnu.

6. PRÉVALENCE ET FACTEURS DE RISQUE

6.1. SÉROPRÉVALENCE CHEZ LES RÉSERVOIRS CARNIVORES

La plupart des enquêtes séro-épidémiologique des infections à *Bartonella*, en médecine vétérinaire, concerne principalement les félins domestiques et sauvages. En effet, Le chat est le principal réservoir de *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae*. Il est important de noter que les études sérologiques présentent parfois des limites, particulièrement dans l'interprétation exacte des résultats. Parmi ces inconvénients, il y a tout d'abord la présence de différences antigéniques entre les souches de *Bartonella henselae* expliquant

certaines discordances dans les résultats mais aussi la présence de communautés antigéniques entre *Bartonella henselae* et *Bartonella quintana*.

De plus, il existe des réactions croisées entre les *Bartonella* spp. et d'autres bactéries notamment, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* et *Chlamydophila psittaci* (La Scola et Raoult, 1996 ; Maurin et Raoult, 1997).

Enfin, un certain nombre de chats ne présentent pas d'anticorps anti- *Bartonella henselae* détectables mais sont par contre bactériémiques (Kordick et Breitschwerdt, 1997). Les données de séroprévalence de *Bartonella henselae* dans différents pays chez la population de chats errant sont indiquées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Prévalence de *B. henselae* chez les chats errants et de fourrière

Pays	Type d'enquête	Origine	Prévalence (%)	Référence
Afrique du sud	S	De fourrière	21	Kelly <i>et al.</i> , 1996
USA (Floride)	S	Errants	33.6	Luria <i>et al.</i> , 2004
Indonésie (Jakarta)	S	Errants	43	Marston <i>et al.</i> , 1999
Israël	S	Errants	83	Avidor <i>et al.</i> , 2004
Philippines (Manilla)	S	Errants	61	Chomel <i>et al.</i> , 1999
	B	Errants	68	
Singapour	S	Errants	47.5	Nasirudeen <i>et al.</i> , 1999
Thaïlande	B	Errants	15.8	Inoue <i>et al.</i> , 2009
Taiwan	S	Errants	23.7	Chang <i>et al.</i> , 2006
Danemark	B	De fourrière	26.5	Chomel <i>et al.</i> , 2002
	B	Errants	44	Engbaek <i>et al.</i> , 2004
Allemagne	B	Errants	18.7	Arvand <i>et al.</i> , 2001
République Tchèque	B	De fourrière	55	Melter <i>et al.</i> , 2003
	B	Errants	66.6	

Espagne (Madrid)	S	Errants	24.1	Ayllon <i>et al.</i> , 2012
Italie (Lombardie)	B	Errants	23	Fabbi <i>et al.</i> , 2004
Italie (Nord)	B	Errants	18	Fabbi <i>et al.</i> , 2004
Italie (Toscane)	S	Errants	38	Ebani <i>et al.</i> , 2002
Pologne	S	De fourrière	86	Podsiadly <i>et al.</i> , 2003
Turquie	B	Errants	9.8	Celebi <i>et al.</i> , 2008
France (Nancy)	B	Errants	53	Heller <i>et al.</i> , 1997
Pays Bas	B	De fourrière	22	Bergmans <i>et al.</i> , 1997
	S	De fourrière	50	

Néanmoins plusieurs études de séroprévalence ont montré qu'un pourcentage élevé de chats sont exposés à *Bartonella* spp à travers le monde. Ainsi, il a été indiqué que la séroprévalence de *B. henselae* variait de 5% à 80% en fonction de la localisation géographique, l'origine des chats (errant, de fourrière ou de propriétaire) et le climat (Boulouis *et al.*, 2005). Certaines études ont montré que les plus fortes prévalences à *B. henselae* étaient observées dans les pays à climat chaud et humide, climat présentant une forte prévalence en vecteurs arthropodes.

Bartonella clarridgeiae est variablement présente dans la population féline de différents pays du monde. Dans certaines études, la séroprévalence variait de 30% à 36% (France, Pays-Bas et Philippines) alors que dans d'autres études, elle n'excédait pas les 10% (sud-est des Etats-Unis, Japon et Taïwan) (Boulouis *et al.*, 2005).

Dans l'ensemble, la prévalence des anticorps anti- *B. vinsonii berkhoffii* chez les chiens domestiques est très faible (<5%) (Pappalardo *et al.*, 1997 ; Solano-Gallego *et al.*, 2004 ; Kernif *et al.*, 2010), mais peut être plus élevé chez les chiens errants ou vivants dans un milieu rural. En effet, un environnement rural où la fréquence d'exposition aux tiques ou aux puces est plus importante qu'en milieu urbain, constitue un facteur de risque influant sur l'accroissement de la prévalence de *B. vinsonii berkhoffii* chez les chiens ruraux (Breitschwerdt *et al.*, 2000).

6.2. CARACTÉRISTIQUES ET PRÉVALENCE DE LA BACTÉRIÉMIE

CHEZ

LES RÉSERVOIRS CARNIVORES

L'importante prévalence d'anticorps anti-*Bartonella* spp. chez les carnivores domestiques et plus particulièrement chez les chats, témoigne d'une infection fréquente, persistante, et récurrente. Kordick *et al.* ont montré que certains chats restent bactériémiques plusieurs mois voir plus d'un an. (Kordick *et al.*, 1995).

Différentes espèces de *Bartonella* spp. ont été isolées du sang de différentes population de chats à travers le monde. Les données de prévalence de *B. henselae* chez la population de chats errants dans différents pays sont indiquées dans le tableau 4.

Par ailleurs, des études ont montré que les jeune chats de moins de trois ans étaient plus bactériémiques que les chats adultes (Arvand *et al.*, 2001 ; Chomel *et al.*, 1995). La bactériémie chez les chats âgés de moins de 1 an en Espagne était de l'ordre de 12.1% (Pons *et al.*, 2005); 13% en Allemagne (Sander *et al.*, 1997) et 19% en France (Heller *et al.*, 1997). Les chats errants et les chats provenant de fourrières sont plus susceptibles d'être bactériémiques que les chats domestiques vivant avec un propriétaire car ils présentent un risque plus élevé d'exposition aux puces. En effet, en Australie, 40% des chats errants testés étaient bactériémiques contre 16% des chats domestiques (Chomel *et al.*, 1997). Dans une autre étude, *B. henselae* fut isolée chez 81 chats sur 205 soit 39.5% en Californie. La bactériémie de *B. henselae* était présente chez 3 fois plus de chats errants et/ou mis en fourrière que chez les chats domestiques. De même, les jeunes chats ainsi que les chats infectés par les puces avaient un risque plus élevé d'être infectés par *B. henselae* (Maurin *et al.*, 1997).

Deux principaux génotypes ou sérotypes I (Houston) et II (Marseille) de *B. henselae* ont été décrit (Bergmans *et al.*, 1996 ; Drancourt *et al.*, 1996), et de nombreuses études de prévalence ont montré que le génotype II était prédominant chez le chat domestique. En 2002, Fournier et ses collaborateurs ont indiqué que 76.5% des isolats humains de *B. henselae* étaient de type I. Une Co-infection de chats avec ces deux génotypes a également été signalée (Gurfield *et al.*, 1997).

Bartonella koehlerae a été isolé chez deux chats en Californie, un chat en France et en Israël (Avidor *et al.*, 2004 ; Droz *et al.*, 1999 ; Rolain *et al.*, 2003b).

Les données épidémiologiques relatives à *B. vinsonii berkhoffii* chez les chiens sont limitées. La prévalence de la bactériémie chez les chiens est faible, elle varie de 0.5 à 9.2% selon les études (Li *et al.*, 2006 ; Henn *et al.*, 2007 ; Celebi *et al.*, 2010).

Quelques cas rares d'infection de chiens par *B. henselae* ont été mis en évidence par Kusaba *et al.* (1999), Tsukahara *et al.* (1998) et Kitchell *et al.* (2000). Toutefois, une autre étude a montré une prévalence de 10,1% chez des chiens sains (10,1%) et de (27,2%) chez des chiens malades au sud-est des Etats-Unis (Salano-Gallego *et al.*, 2004) .

6.3. VECTEURS ET TRANSMISSION

Les arthropodes hématophages représentent les vecteurs de majeurs des *bartonelles*. Au sein du réservoir, ils assurent l'exportation des bactéries du flux sanguin ainsi que leur inoculation au cours de la morsure d'un hôte (Figure 5).

L'apparente spécificité des *Bartonella* spp. et des vecteurs pour un hôte vertébré particulier semble être remise en question. En effet, de nombreuses études ont montré que des vecteurs arthropodes infectant les mammifères pouvaient héberger de nombreuses espèces de bartonelles. En revanche, ces mêmes vecteurs ne sont pas toujours compétents pour transmettre toutes ces espèces à un hôte (Tsai *et al.*, 2010).

Par conséquent, le nombre d'espèces de *Bartonella* identifiées dans les ectoparasites est beaucoup plus important que celui des espèces détectées dans leurs hôtes mammifères, ce qui suggère un mécanisme d'adaptation des *bartonelles* à leur écosystème hôte-vecteur (Tsai *et al.*, 2011).

6.3.1. Chez le Chat

En 1996, Chomel *et al* démontrent que la puce du chat est le vecteur de *Bartonella henselae*. La transmission directe de chat à chat sans l'intermédiaire des puces n'est pas démontrée.

D'autres études montrent que *Bartonella henselae* est détectable dans l'intestin de la puce trois heures après le repas sanguin et jusqu'à neuf jours après, ainsi que dans les fèces. Ainsi, la bactérie présente dans les déjections est déposée sur les poils de l'animal lors du

repas sanguin et pénètre ensuite dans l'organisme de celui-ci, en cas de traumatisme cutané ou lésions de grattage (Foil *et al.*, 1998).

La transmission verticale de *B. henselae* de la mère à ses chatons semble exclue (Abott *et al.*, 1997 ; Guptill *et al.*, 1998). On suppose que *Ctenocephalides felis* est également le vecteur de *Bartonella clarridgeiae*, qui est très fréquemment isolée avec *B. henselae*.

D'autres études proposent les tiques comme vecteur de *Bartonella* spp. En effet, de l'ADN de *Bartonella henselae* a été identifié dans des tiques prélevées sur des personnes, mais aussi dans des tiques adultes avant tout repas sanguin aussi bien Amérique du Nord qu'en Europe (Chang *et al.*, 2002 ; Chang *et al.*, 2001 ; Sanogo *et al.*, 2003).

La transmission de *B. henselae* via les glandes salivaires a été démontrée expérimentalement chez les tiques du genre *Ixodes ricinus* (Cotte *et al.*, 2008). Par ailleurs, aucune preuve de la capacité naturelle des tiques à transmettre les bartonelles n'a été encore publiée, même si des situations expérimentales de transmission ont été décrites (Reis *et al.*, 2011). Enfin, l'ADN de *B. henselae* a été détecté à partir d'une mouche piqueuse (Chung *et al.*, 2004).

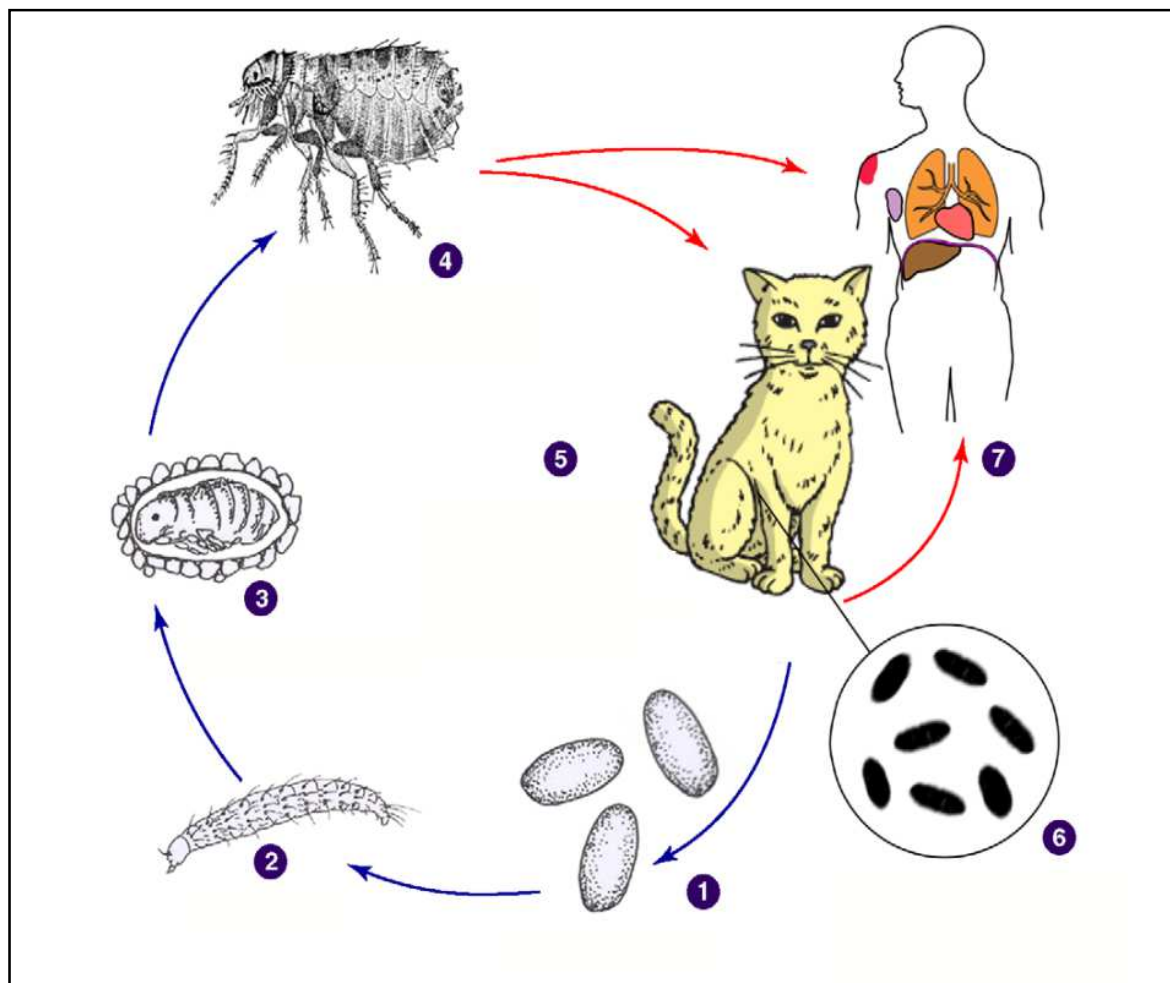


Figure 5 : Cycle de transmission de *Bartonella henselae* (adaptée de McElroy *et al.*, 2010)

6.3.2. Chez le Chien

Les vecteurs hématophages mis en cause dans l'entretien et la transmission des bartonelles chez le chien sont variés. Outre la puce du chat (*Ctenocephalides felis*) et son implication dans l'entretien de l'infection à *Bartonella henselae*, d'autres vecteurs sont impliqués, notamment les tiques (Breitschwerdt *et al.*, 2000 ; Baneth *et al.*, 1998). Dans une récente étude, des auteurs suggèrent qu'il est très probable que *R. sanguineus* soit un vecteur compétent dans la transmission de *B. vinsonii berkhoffii* à l'hôte vertébré (Billeter *et al.*, 2012).

6.3.3. De Chat / Chien à l'Homme

Le mode de transmission des carnivores domestiques à l'homme fait intervenir essentiellement une griffure ou une morsure. L'animal, en se grattant, contamine ses griffes par des bactéries sanguines ou /et par des bactéries présentes dans les déjections des puces. En réalité, la transmission des bartonelles par morsure est moins fréquente (Chomel et Kasten, 2010). En effet, l'excrétion de ces bactéries dans la salive chez le chat n'a pas été clairement démontrée. Par ailleurs, la transmission à l'homme par piqûre de puce n'a pas été également prouvée expérimentalement. Par ailleurs, le rôle de la puce est essentiel pour le maintien de l'infection chez le réservoir félin et donc indirectement assurer la transmission à l'homme.

7. MANIFESTATIONS CLINIQUES

7.1. CHEZ LE CHAT

Le chat a longtemps été considéré comme un porteur asymptomatique de l'infection *B. henselae*, *B. clarridgeiae* et *B. koehlerae*. En effet, des études ont montré que très peu de chats infectés naturellement présentaient des signes cliniques évocateurs. Ceci pourrait s'expliquer par une adaptation de l'agent pathogène à l'hôte mammifère. Cette adaptation faciliterait donc cette co-existence et minimiserait les effets pathogènes chez l'hôte infecté. Par ailleurs, l'apparition et la sévérité des signes cliniques dépendent en réalité de la souche de *Bartonella* qui infecte le chat (Mikolajczyk and O'Reilly, 2000; O'Reilly *et al.*, 1999).

Cependant, quelques études ont décrit chez la population féline des signes cliniques consécutifs à une infection naturelle par *B. henselae*. En effet, des cas d'uvéite et d'endocardite ont été associés à une infection par *B. henselae* en réalisant des tests PCR (Chomel *et al.*, 2003; Chomel *et al.*, 2000). Par ailleurs, les chats séropositifs à *Bartonella* seraient également plus susceptibles de présenter des infections rénales et urinaires, des stomatites ou des lymphadénopathies. Dans une enquête réalisée au Japon, les auteurs ont constaté que les chats séropositifs aussi bien à *B. henselae* qu'au virus de l'immunodéficience féline étaient plus susceptibles de développer une lymphadénopathie et une gingivite que des chats séropositifs à chaque agent séparément (Ueno *et al.*, 1996).

7.2. CHEZ LE CHIEN

Diverses manifestations cliniques ont été recensées avec certitude chez le chien. Différents tableaux cliniques ont été décrits dans la littérature qui se traduisent variablement par de l'endocardite (*Bartonella vinsonii berkhoffii*, *B. clarridgeiae*, *B. washoensis*), une arythmie cardiaque (*Bartonella vinsonii berkhoffii*), une rhinite granulomateuse (*Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii*), une péliose hépatique (*B. henselae*), une méningo-encéphalite granulomateuse neutrophilique avec une vascularite chronique (*Bartonella vinsonii berkhoffii* et enfin lymphadénite granulomateuse (*B. henselae*) (Guptill, 2010). Compte tenu de ces différentes manifestations cliniques, le chien pourrait constituer un excellent modèle pour les infections humaines à *Bartonella*, puisque les symptômes chez cette espèce sont assez similaires au tableau clinique chez l'homme et que les espèces de *Bartonella* incriminées chez le chien sont aussi celles qui ont été identifiées comme pathogènes dans l'espèce humaine (Boulouis *et al.*, 2007).

7.3. BARTONELLOSES CHEZ L'HOMME DUES AUX *BARTONELLA* ISSUES DE CARNIVORES

7.3.1. Maladie des griffes du chat chez l'homme (MGC)

B. henselae est responsable de la maladie des griffes du chat. Toutefois *Bartonella clarridgeiae* semble également impliquée dans cette maladie. Sous sa forme classique, cette affection est peu grave. Le nombre de cas annuels de MGC est estimé à plusieurs milliers dans différents pays d'Europe, et entre 22000 et 24000 aux États Unis. Les jeunes âgés de moins de 20 ans constituent la tranche de population la plus atteinte par cette maladie (Boulouis *et al.*, 2005).

Chez les personnes immunocompétentes, on retrouve des lésions cutanées au site d'inoculation trois à dix jours après la contamination. Ces lésions évoluent successivement par une phase vésiculeuse, érythémateuse et papuleuse. Puis il y a apparition d'une adénopathie régionale qui peut passer d'abord inaperçue puis qui peut se traduire par une augmentation marquée de la taille des nœuds lymphatiques. Ces adénites peuvent durer plusieurs semaines à plusieurs mois. L'évolution peut se faire vers la suppuration et la formation d'une fistule.

Des manifestations cliniques inhabituelles, de pronostic souvent favorable, sont notées dans environ 5 à 13 % des cas : adénopathies mésentériques ou médiastinales, syndromes oculoganglionnaires de Parinaud (conjonctivite granulomateuse suivie d'une adénopathie pré-auriculaire contiguë), abcès des parois latérales du pharynx avec suppuration des parotides, encéphalites, méningites, myélites avec paraplégie, radiculites, convulsions, confusions mentales, comportements agressifs, rétinopathie stellaire de Leber (perte de vision, généralement unilatérale, avec scotome central et formation d'une étoile maculaire, guérissant spontanément en un à trois mois), abcès viscéraux, granulomes hépatiques, granulomes spléniques, ostéomyélites, arthrites, purpuras thrombopéniques, érythèmes noueux, pneumopathies atypiques, glomérulonéphrites d'origine immunopathologique, maladies généralisées avec ou sans hépatosplénomégalie, syndrome de fatigue chronique (Chomel *et al.*, 1997).

7.3.2. Autres affections partagées par l'homme et les carnivores

7.3.2.1. Angiomatose bacillaire et peliose hépatique

Chez les personnes immunodéprimées, on observe, entre autre une angiomatose bacillaire ou une peliose. L'angiomatose bacillaire est provoquée par *B. quintana* ou par *B. henselae*. Cette affection se caractérise par une prolifération vasculaire et des cellules endothéliales. L'angiomatose bacillaire cutanée se caractérise par la formation de pseudotumeurs angiomateuses uniques ou multiples, superficielles, violacées, saignant facilement au contact, dermique ou sous-cutanées (Edouard et Raoult, 2010). Ces lésions peuvent s'étendre aux tissus profonds, notamment à l'os (Relman *et al.*, 1990). La peliose hépatique est une affection caractérisée par une prolifération des capillaires sinusoides hépatiques conduisant à la formation de larges espaces vasculaires. Des lésions similaires ont été décrites dans la rate et les ganglions lymphatiques, d'où le terme proposé de peliose bacillaire. La peliose bacillaire peut être associée à des lésions d'angiomatose bacillaire, mais s'en distingue par l'absence de prolifération endothéliale. Cette forme d'infection à *B. henselae* touche en général les patients VIH bien qu'elle ait été décrite chez un patient transplanté rénal (Blanco *et al.*, 2005).

7.3.2.2. Endocardite

Environ 20% des endocardites humaine à *Bartonella* sont imputées à *B. henselae* (Fournier *et al.*, 2001). La prévalence des endocardites à *Bartonella* est plus faible dans les pays du Nord que dans ce du Sud, ce qui suggère la présence d'un gradient de distribution géographique du nord au sud, des endocardites à *Bartonella* (Brouqui et Raoult, 2006).

En effet, en Algérie et en Tunisie, les endocardites représentent respectivement 15% et 9,8% des endocardites infectieuses alors, qu'elles représentent 1,1% au Royaume-Uni et 3% en Allemagne et en France (Edouard et Raoult, 2010 ; Benslimani *et al.*, 2005). Dans les différentes études réalisées, les endocardites infectieuses à *B. henselae* sont associées principalement à deux facteurs de risque: morsures et ou griffures de chats et présence d'une valvulopathie préexistante.

Par ailleurs, quelques rares cas d'endocardite ou de myocardite ont été associés à des infections par *B. koehlerae* et *B. vinsonii berkhoffii* (Avidor *et al.*, 2004 ; Roux *et al.*, 2000).

8. DIAGNOSTIC DE L'INFECTION CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES

Les données épidémiologiques et cliniques permettent d'émettre une hypothèse diagnostique quant à une infection par une espèce de bartonelle. Cependant, seuls les examens de laboratoire permettent de déterminer le germe responsable. Ainsi, le diagnostic d'une infection à *Bartonella* repose sur la mise en évidence de la bactérie par hémoculture ou amplification génique et/ou sur des tests sérologiques.

8.1. DIAGNOSTIC CLINIQUE ET HISTOLOGIQUE

Le diagnostic clinique est difficile à établir chez les chiens et les chats. En effet, les signes cliniques observés sont peu caractéristiques. Une infection à *Bartonella* devrait être suspectée chez un chien atteint d'une endocardite et plus spécifiquement d'une endocardiose valvulaire (MacDonald *et al.*, 2004). Une bartonellose doit être également évoquée chez des chiens présentant une fièvre intermittente, une léthargie, une boiterie et une atteinte granulomateuse inexpliquées.

Chez les chiens séropositifs à *B. vinsonii berkhoffii*, on constate très souvent une anomalie de la formule de numération sanguine qui se traduit par de la thrombocytopénie, de l'anémie, une leucocytose neutrophile et une éosinophilie (Breitschwerdt *et al.*, 2004). Par ailleurs, certains chats développent une anémie transitoire en début d'infection et d'autres une éosinophilie persistante (Kordick *et al.*, 1999a).

L'inoculation expérimentale de 13 chats SPF par du sang provenant de deux chats naturellement infectés par *B. henselae* (type II) ou co-infecté par *B. clarridgeiae* et *B. henselae* (type II) a révélé des lésions histopathologiques peu spécifiques : une hyperplasie folliculaire des nœuds lymphatiques périphériques pour tous les chats, une hyperplasie folliculaire de la rate (69% des chats), des agrégats de mononucléaires dans le foie (46%) et des lymphocytes ou des cellules plasmatiques entourant mais aussi obstruant les canaux biliaires dans les systèmes porte (69%). (Guptill *et al.*, 1997 ; Kordick *et al.*, 1999b).

8.2. DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

La sérologie est d'intérêt plus limité dans les espèces réservoirs, en particulier chez l'espèce féline. En effet, une sérologie positive ne renseigne pas sur l'état bactériémique et elle n'est pas suffisante pour confirmer une infection à *Bartonella* chez un chat malade.

Les anticorps apparaissent quelques jours après la bactériémie et persistent plusieurs semaines après disparition de la bactériémie. Ils n'ont pas de réel effet protecteur. Ceci explique pourquoi un faible pourcentage de chats bactériémiques sont trouvés séronégatifs. De plus, une baisse des titres en anticorps précédant une recrudescence de bactériémie a pu être observée. À l'inverse, une élévation des titres en anticorps peut précéder une baisse de la bactériémie (Chomel *et al.*, 1995).

La recherche des anticorps dirigés contre *B. henselae* fait appel soit à l'Immunofluorescence Indirecte (IFI), soit aux techniques immuno-enzymatiques représentées essentiellement par l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), et le Western Blot (WB) (Maurin *et al.*, 2002). Les antigènes sont préparés soit à partir de bactéries cultivées sur milieu gélosé soit à partir de bactéries cultivées sur cultures cellulaires mais les titres en anticorps varient suivant le mode de préparation.

L'immunofluorescence semble être la technique de choix. Le seuil de positivité est compris entre 1/50 et 1/256, la valeur prédictive positive (PPV) de ce test est comprise entre 39 et 46 % et la valeur prédictive négative est comprise entre 90% et 96 % (Boulouis *et al.*, 2005). Le test Western blot a été proposé pour le sérodiagnostic des infections félines à *B. henselae* en utilisant des antigènes reconnus comme spécifique d'espèce et de type.

Cependant la technique est en cours d'amélioration et de standardisation. Dans un récent rapport, il a été indiqué que la valeur prédictive positive du test Western blot lors d'une infection naturelle par *Bartonella* chez des chats, était seulement de 18.8% (Lappin *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la séropositivité à *Bartonella* ne persiste pas longtemps chez des chiens infectés naturellement. Ainsi, des chiens inoculés expérimentalement par *B. vinsonii berkhoffii* développent durant les 4 première semaines post inoculation (Pi), un titre IgG très élevée avec un seuil de positivité au 1/4096 mais qui après 243 jours PI baisse avec une positivité au 1/64 (Pappalardo *et al.*, 2000).

De même, il a été démontré que des chiens naturellement infectés par *Bartonella* (confirmé par des tests PCR) pouvaient être séronégatifs et qu'il semblerait donc que le diagnostic sérologique soit plus sensible chez la population féline que canine (Diniz *et al.*, 2007; Duncan *et al.*, 2008).

8.3. CULTURE ET ISOLEMENT

La culture des bartonelles est fastidieuse, c'est pourquoi la culture sur gélose et la culture cellulaire sont parfois réalisées en parallèle pour obtenir un résultat optimal. La culture peut être réalisée à partir de sang prélevé sur tube EDTA ou de biopsies ganglionnaires, de valves cardiaques, de biopsies cutanées, de biopsies ostéomédullaires. Ces échantillons biologiques doivent être obligatoirement prélevés stérilement. En effet, les bartonelles sont des bactéries à croissance lente (4 à 6 semaines) et les risques de contamination par des germes secondaires introduits accidentellement lors du prélèvement peuvent stopper leur croissance ou fausser la lecture. Par ailleurs, la congélation du prélèvement est possible en attente d'acheminement de plus elle contribuerait à la libération des bactéries intra érythrocytaires.

Les conditions optimales de culture sur milieu axénique requièrent une gélose additionnée de 5% de sang frais de lapin ou cheval, une incubation à 35°C, en atmosphère humide enrichie en CO₂. Les colonies apparaissent en dix à 15 jours mais leur délai de croissance peut atteindre les 45 jours.

La culture cellulaire en tubes bijoux est réalisée sur cellules L929, HeLa, Véro ou sur cellules endothéliales. Les cultures sont observées à j15 et j30 avant d'être rendues stériles. Lorsqu'une croissance bactérienne est observée, une coloration de Gimenez est réalisée pour révéler le bacille intracellulaire (Edouard et Raoult, 2010).

Un résultat positif à *Bartonella* en hémoculture ou sur culture de tissus est l'élément le plus indicateur d'une infection active à *Bartonella*. En revanche, en raison du caractère récurrent de la bactériémie chez les chats infectés, la culture n'est donc pas toujours un outil de diagnostic sensible à 100%. Elle a aussi peu d'intérêt pour le diagnostic des bartonelloses canines. En effet, la culture du sang prélevé à partir de chiens inoculés expérimentalement, s'est révélée positive seulement pour une durée de 42 jours PI, alors que l'ADN a été détecté dans les ganglions lymphatiques périphériques par PCR jusqu'à 142 jours PI et dans le foie 247 jours PI (Pappalardo *et al.*, 2001).

Cependant, une pré-culture en milieu liquide (Maggi *et al.*, 2005) peut être associée à l'isolement ou à la PCR. Ce type de technique utilisant un milieu complexe a permis d'augmenter la sensibilité de détection des bartonelles chez les espèces non réservoirs.

8.4. AMPLIFICATION GÉNÉRIQUE PAR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

En réalité, seule la biologie moléculaire permet d'établir une identification spécifique et rapide des bartonelles. De nombreuses techniques de PCR simple ou emboîtée ont été développées afin de diagnostiquer les infections dues aux différentes espèces du genre *Bartonella*. Plusieurs séquences d'amorces ciblant différents gènes sont utilisables. Les gènes les plus souvent amplifiés sont: *gltA*, *ITS*, *ribC*, *groEL*, *rpoB*, *PAP* et *ftsZ*. L'amplification de gène par PCR peut être pratiquée directement sur des biopsies (ganglionnaires, hépatiques, spléniques, cutanées, valves cardiaques) ou sur du sang prélevé sur des animaux suspects.

Des PCR quantitatives en temps réel utilisant des sondes spécifiques ont été développées. Ce type de PCR est simple, reproductible, rapide, précis et potentiellement transférable à des échantillons cliniques (Colbom *et al.*, 2010).

DEUXIÈME PARTIE : AUTRES BACTÉRIES HÉMOTROPES CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES

Dans cette partie nous nous limiterons qu'aux bactéries ayant fait l'objet de notre étude. Les autres bactéries hémotropes sont décrites dans le tableau 5 ci-après. Dans cette seconde partie nous abordons les principales caractéristiques des genres *Anaplasma* et *Borrelia* ainsi que l'épidémiologie et le diagnostic des affections induites par ces pathogènes chez les carnivores domestiques.

1. ÉTUDE DU GENRE *ANAPLASMA*

1.1. HISTORIQUE

En 1932, des chercheurs étudiant le Louping-ill des ovins, observent chez ces animaux des signes cliniques qui semblent être survenus suite à des morsures de tiques. Cette maladie fut dénommée alors « fièvre à tiques » ou « tick-born fever » ou TBF. En 1940, l'agent étiologique de la TBF est alors identifié puis baptisé *Rickettsia phagocytophila* en raison de son tropisme pour les granulocytes ou macrophages. Ce même agent est à nouveau associé à une TBF chez des bovins, dont le premier cas fut décrit en 1950. En raison de sa morphologie similaire à celle de *Cytoecetes microti*, l'organisme est renommé *Cytoecetes phagocytophila*.

En 1945, *Cytoecetes phagocytophila* est nommée *Ehrlichia phagocytophila* après établissement du genre *Ehrlichia*.

En 1969, Gribble décrit une infection des équidés, observée en Californie est due à *Ehrlichia equi*. Comme les morulas sont mises en évidence dans les granulocytes la maladie est alors appelée « Ehrlichiose granulocytaire équine ». En 1982, le premier cas d'infection chez un chien par un agent semblable à *Ehrlichia equi* fut décrit aux Etats-Unis et à partir de cette date d'autres cas identiques ont été observés dans plusieurs autres pays. En 1994, les premiers cas d'Ehrlichiose Granulocytaire Humaine furent observés au Minnesota et au Wisconsin. Les sérums des patients réagissent positivement avec *Ehrlichia phagocytophila* et/ou *Ehrlichia equi*. L'agent responsable étant inconnu, il est nommé alors agent de l'Ehrlichiose Granulocytaire Humaine ou HGE. L'analyse de la séquence de l'ARNr 16S révèle un pourcentage d'homologie de 99.9 % avec l'ARNr 16S de *Ehrlichia phagocytophila* et de 99.8 % avec l'ARNr 16S de *Ehrlichia equi*. Des test de PCR, effectués sur 6 patients, permettent à Chen *et al.* (1994) d'identifier une nouvelle espèce du genre *Ehrlichia* responsable d'infections humaines.

Tableau 5 : Principales bactéries vectorisées transmises par les arthropodes hématophages chez les carnivores domestiques (Tsai *et al.*, 2011)

Bactérie	Cellules Cibles	Hôte Mammifère	Vecteur	Pathologie	Répartition Géographique
<i>Ehrlichiae</i>					
<i>E. canis</i>	Monocytes, macrophages, lymphocytes	Chien, chat	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Pancytopenie tropicale canine, typhus du chien, fièvre hémorragique du chien. Chez le chat on observe une polyarthrite associée à une lymphadénomégalie.	Mondiale, zones d'enzootie tropicales et subtropicales
<i>E. chaffeensis</i>	monocytes, macrophages	Chien	<i>Ambyloma americanum</i> , <i>Ixodes scapularis</i> ,	Syndrome fébrile modéré	USA, Europe ?, Asie ?
<i>E. ewingii</i>	granulocytes	Chien	<i>Ambyloma americanum</i>	Ehrlichiose cliniquement moins grave qu'une Ehrlichiose à <i>E. canis</i> .	USA, Cameroun, Brésil

<i>Rickettsiae</i>					
<i>R. rickettsii</i>	Cellules endothéliales	Chien, chat	<i>Dermacentor andersoni</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Amblyomma canjennense</i> ,	Fièvre pourprée des Montagnes rocheuses. chez le chat Evidence sérologique d'exposition	USA
<i>R. conorii</i>	Cellules endothéliales	Chien	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Syndrome fébrile modéré	Europe, Asie, USA, bassin méditerranéen,
<i>R. parkeri</i>	Cellules endothéliales	Chien	<i>Amblyomma maculatum</i> , <i>A. americanum</i>	Evidence sérologique d'exposition	USA, Brésil, Bolivie.
<i>R. felis</i> .	Cellules endothéliales	Chat, chien	<i>Ctenocephalides felis</i> , <i>Pulex irritans</i> .	Syndrome fébrile. Le chien se comporte comme réservoir potentiel.	USA, Mexique, Brésil, Ethiopie, Espagne, France.

Tableau 5 (suite) : Principales bactéries vectorisées transmises par les arthropodes hématophages
chez les carnivores domestiques (Tsai *et al.*, 2011)

Bactérie	Cellules Cibles	Hôte Mammifère	Vecteur	Pathologie	Répartition Géographique
<i>Mycoplasma</i>					
<i>M. haemocanis</i>	Globule rouge	Chien	<i>Ripicephalus sanguineus</i>	Anémie et fièvre	Mondiale
<i>M. haemofelis</i>	Globule rouge	Chat	<i>Ripicephalus sanguineus</i>	Anémie infectieuse féline	Mondiale
<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>	Globule rouge	Chat	inconnu	Anémie modérée	USA, Royaume uni
<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i>	Globule rouge	Chien, chat ?	inconnu	inconnu	USA, Royaume uni
<i>Francisella tularensis</i>	Phagocytes mononucléés	Chat, chien	<i>Amblyomma</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Haemaphysalis</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Ornithodoros</i>	Fièvre et lymphadénopathie. Rare chez le chien (fièvre modérée et diarrhée)	Mondiale

<i>Coxiella burnetii.</i>	Monocytes, macrophages	Chat	<i>Amblyomma</i> sp., <i>Boophilus</i> sp., <i>Dermanyssus</i> sp., <i>Hyalomma</i> sp., <i>Ixodes</i> sp., <i>Rhipicephalus</i> sp.	Fièvre et anorexie	Mondiale
----------------------------------	------------------------	------	--	--------------------	----------

1.2. TAXONOMIE

La famille des *Anaplasmataceae*, incluse dans l'ordre des Rickettsiales, a été proposée par Philip en 1957. Par la suite, les genres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Wolbachia* et *Neorickettsia* ont été inclus dans cette famille (Figure 6).

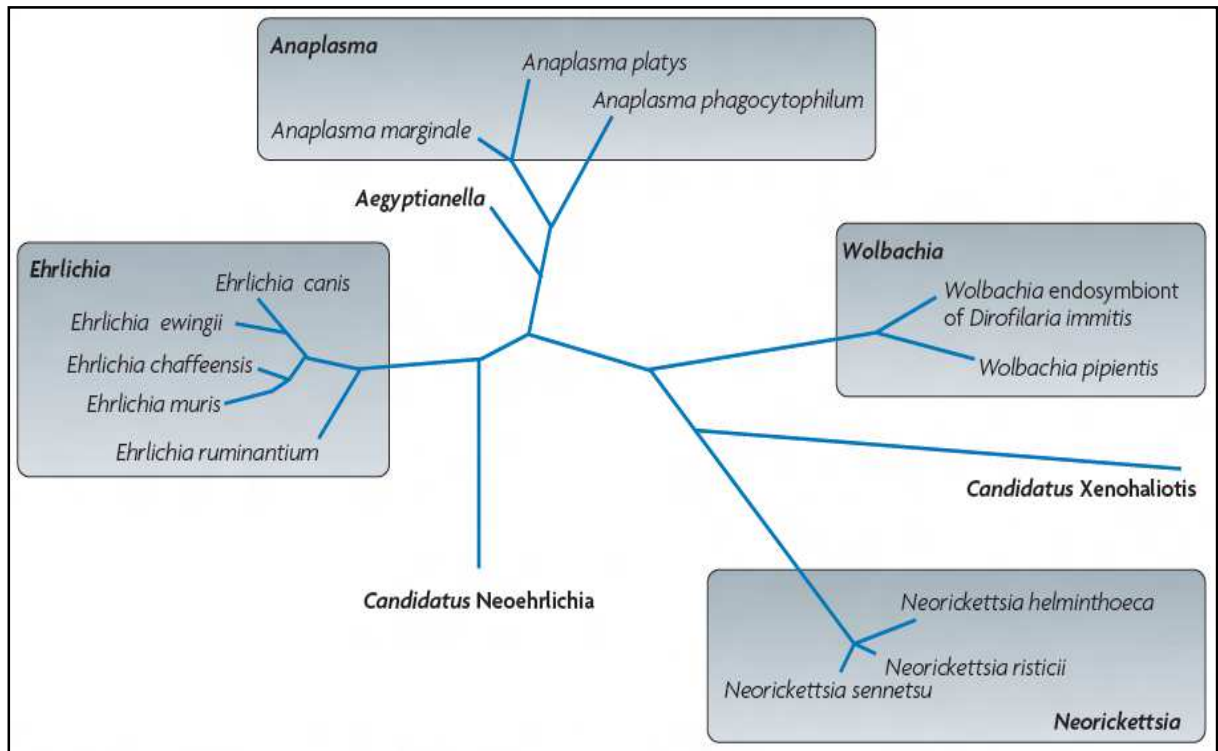


Figure 6 : Phylogramme de la famille *Anaplasmataceae* sur la base de la comparaison de séquences d'ARN 16S ribosomale (Rikihisa, 2010)

En 2001, Dumler *et al.* procèdent à une réorganisation de l'ordre des *Rickettsiales* basée sur

l'analyse des séquences des ARNr 16S, l'analyse des gènes des opérons *groESL* et l'analyse des gènes codant pour des protéines de surface. Aussi, ces auteurs rassemblent *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* et l'agent EGH au sein d'une unique espèce qui, compte tenu des règles de priorité, est appelée *Anaplasma phagocytophilum*. Ces trois bactéries partagent également de nombreuses communautés antigéniques, elles infectent les cellules de la lignée myéloblastique et elles sont majoritairement transmises par des tiques du genre *Ixodes*. Néanmoins, il existe au sein de cette espèce de légères différences entre souches portant sur certaines séquences. Les souches d'*A. phagocytophilum* expriment peu de variation au niveau des séquences nucléotidiques des gènes *ARN16S r* et *groESL* (De La Fuente *et al.*, 2005 ; Morissette *et al.*, 2009), mais aussi sur des caractères biologiques, notamment quant à leur spectre d'hôtes (Foley *et al.*, 2008), leur pouvoir pathogène et leur répartition géographique. C'est pourquoi on reconnaît des variants (ou biovars) au sein de cette espèce (variants équin, humain et bovin).

Le genre *Anaplasma* infecte les cellules matures ou immatures de la lignée hématopoïétique dans son ensemble : hématie, plaquettes, granuleux ou monocytes et macrophages.

Chez le chien, deux espèces du genre *Anaplasma* sont reconnues comme pathogènes :

- *Anaplasma platys*, découverte pour la première fois en 1978 aux USA (Harvey *et al.*, 1978). Parasite des plaquettes et des mégacaryocytes, elle est l'agent responsable de la thrombopénie cyclique chez le chien. Son vecteur est supposé être la tique du chien *Rhipicephalus sanguineus* ;
- *Anaplasma phagocytophilum*, agent de l'Anaplasmosse Granulocytaire Canine (AGC).

Anaplasma phagocytophilum, sujet d'une partie de notre travail, est l'objet du développement ci-dessous.

1.3. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE D'*ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*

Anaplasma phagocytophilum est une bactérie gram négative, non mobile, intra cellulaire obligatoire. Elle est entourée par deux membranes ce qui représente une caractéristique morphologique des espèces de la famille des *Anaplasmataceae*. Ces bactéries sont de petite taille de 0,3 à 1,3 μm , souvent de forme coccoïde ou ellipsoïde. Elles se situent dans des inclusions intra cytoplasmiques en forme de morulas (1,5 -2,5 μm

de diamètre) retrouvées principalement au sein des granulocytes neutrophiles circulants. Leur présence dans ces inclusions est en partie facilitée par le fait qu'*A. phagocytophilum* est dépourvue de peptidoglycane et de lipopolysaccharide (Linn et Rikihisa, 2003). La microscopie électronique révèle la présence de deux formes morphologiques au sein des morulas : des corps élémentaires (0.5 µm de diamètre) et des corps réticulés (2 µm de diamètre). Ces bactéries peuvent être visualisées par la coloration May-Grimwald-Giemsa ou plus souvent avec la coloration rapide au Diff-Quik (Popov *et al.*, 1998).

A. phagocytophilum se cultive *in vitro* dans les cellules IDE8 (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.

La taille du génome d'*A. phagocytophilum* est de 1.47Mb et le contenu en G+C % de son ADN varie entre 30 et 56%. Cette espèce ne peut synthétiser que quatre acides aminés : glycine, glutamine, glutamate et aspartate.

1.4. PROPRIÉTÉS ANTIGÉNIQUES ET IMMUNOGÈNES ET VARIATION DES SOUCHES

Des réactions sérologiques croisées entre les souches d'*A. phagocytophilum* et entre *A. phagocytophilum* et d'autres espèces bactériennes telles que *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffensis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma platys* sont dues à des communautés antigéniques. En effet, ces bactéries ont en commun des protéines de surface spécifiques de genre ou de groupe dont le poids moléculaire varie entre 42 et 49 kDa (Dumler *et al.*, 1995 ; Kawahara *et al.*, 2006 ; Rikihisa, 2010). Ces protéines immunogènes sont codées par une famille multigénique. Parmi elles, la protéine de surface majeure (major surface protein) msp2 (p44), décrite chez *A. phagocytophilum*, est formée d'une région centrale hypervariable limitée par des séquences conservées.

Le gène codant pour la protéine de surface majeure décrite chez *A. phagocytophilum* est sujet à de fréquentes recombinaisons ce qui conduit donc à de nombreux ARNm msp2 et par conséquent à des variations antigéniques qui pourraient expliquer les infections persistantes des animaux. Ainsi, le génome d'*A. phagocytophilum* contiendrait plus d'une centaine de pseudo-gènes msp2 (P44) présents sur le chromosome (Dunning Hotopp *et al.*, 2006).

Des phénomènes de conversion combinatoire concernent les gènes P44, P44ESup1 (omp-1N), msp2 et ankA, certains d'entre eux codant des protéines de surface. Ceci entraîne une diversité phénotypique de la membrane qui pourrait expliquer en partie l'échappement de la bactérie à la réponse immunitaire de l'hôte et son adaptation à un nouvel environnement.

Par ailleurs, Ge et Rikihisa (2007) ont identifié de nouvelles protéines de surface Asp62 et Asp55, ces dernières sont susceptibles d'être utilisées comme cibles pour le sérodiagnostic des infections à *A. phagocytophilum*.

1.5. PATHOGÉNIE

La pathogénie de l'infection à *A. phagocytophilum* commence tout juste à être élucidée. La plupart des recherches concernant la pathogénie de l'infection ont été réalisées *in vitro* et principalement sur des cellules humaines ou de souris.

Différentes études ont montré qu'*A. phagocytophilum* avait un tropisme pour les granulocytes neutrophiles matures et plus rarement pour les fibroblastes et les phagocytes mononucléés (Lepidi *et al.*, 2000 ; Munderloh *et al.*, 2004). Les molécules d'adhésion d'*A. phagocytophilum* qui permettent la liaison aux récepteurs membranaires des neutrophiles sont en cours d'exploration et ne sont pas complètement identifiées. Par ailleurs, une étude de Park *et al.*, (2003) suggère que la protéine de surface msp2 (P44) faciliterait l'adhésion aux récepteurs PSGL-1 des granulocytes neutrophiles.

Pour survivre, *A. phagocytophilum* doit échapper à la réponse immunitaire et l'activité bactéricide des neutrophiles. Pour cela, elle inhibe la fusion phagosomes-lysosome et limite les attaques oxydatives (Gokce *et al.*, 1999 ; Choi et Dumler, 2003 ; Ohashi *et al.*, 2002). D'autre part, pour persister, la bactérie peut retarder la survenue de l'apoptose et par conséquent allonger la durée de vie des neutrophiles (Scaife *et al.*, 2003). Les observations *in vitro* suggèrent que cette inhibition de l'apoptose est liée à l'attachement de la bactérie à des protéines membranaires des granulocytes et à la phase de pénétration (Yoshiie *et al.*, 2000). De plus, la pérennisation d'*A. phagocytophilum* est liée 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 favorise la survie intracellulaire des bactéries (Sukumaran *et al.*, 2011).

Par ailleurs, *Anaplasma phagocytophilum* possède des gènes codant des systèmes

de sécrétions de type IV qui permettent l'infection des cellules hôtes (Ohashi *et al.*, 2002). 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 Abl-1 et stimulerait l'activité de l'Abl-1kinase (Lin *et al.*, 2007).

D'autre part, le passage d'*A. phagocytophilum* du derme – lieu d'inoculation par la tique – au neutrophile est encore incompris. On suppose qu'au point d'inoculation, la bactérie se multiplierait en premier dans les cellules endothéliales de la micro-vascularisation. Ces dernières assureraient, lors de la diapédèse, le transfert du pathogène vers les neutrophiles sans que ceux-ci quittent la lumière des capillaires. Ainsi, l'endothélium vasculaire jouerait le rôle de niche primaire qui permettrait l'intégration et la multiplication d'*A. phagocytophilum* ainsi que la persistance de l'infection.

L'affluence des granulocytes neutrophiles au site de morsure favorise leur contamination mais aussi la dissémination des bactéries à la faveur de leur migration. Pour se propager la bactérie stimule l'augmentation du taux d'interféron gamma (IFN- γ) et d'interleukines (Dumler *et al.*, 2000)(88). Ainsi, la sécrétion d'interleukines telle que l'interleukine-8 va induire un appel massif de neutrophiles naïfs sur le site de l'infection ce qui par conséquent optimisera la voie de diffusion d'*A. phagocytophilum*. Quant à l'IFN- γ il peut entraîner des effets néfastes sur les cellules hôtes qui se traduisent par des lésions tissulaires et une expression clinique plus importante lors d'anaplasmose (Fresno *et al.*, 1997 ; Walker et Dumler *et al.*, 1997 ; Dumler et Brouqui, 2004).

1.6. EPIDÉMIOLOGIE ET PRÉVALENCE

1.6.1. Hôtes et réservoir

1.6.1.1. Réservoirs principaux

L'hôte réservoir ou primaire est par définition un être vivant qui héberge et entretient dans des conditions naturelles un pathogène. En général, les espèces réservoirs présentent peu ou pas de signes cliniques. Différents mammifères sauvages ont été proposés comme réservoirs potentiels et naturels d'*A. phagocytophilum*.

Les petits mammifères sauvages sont décrits comme des hôtes de prédilection pour les stades immatures de tiques et représentent donc des réservoirs d'*A. phagocytophilum*. En fonction de leurs localisations géographiques, les principales espèces animales réservoirs sont : en Europe le campagnol roussâtre *Clethrionomys glareolus* (Liz *et al.*, 2002), en Grande-Bretagne le mulot sylvestre *Apodemus sylvaticus* (Bown *et al.*, 2006), en Suisse les petits rongeurs *Apodemus flavicollis* et *Sorex araneus* (Liz *et al.*, 2002) et enfin aux Etats-Unis la

souris à patte blanche *Peromyscus leucopus*, le raton laveur *Procyon lotor* (Telford et al., 1996), l'écureuil gris *Sciurus carolinensis* (Levin et al., 2002), le tamia rayé *Tamias striatus* et le rat musqué *Ondatra zibethicus* (Telford et al., 1996 ; Walls et al., 1997). De même, quelques grands animaux sauvages ont été également proposés comme réservoirs d'*A. phagocytophilum*, principalement des cervidés tel que les cerfs (*Cervus*) et le chevreuil (*Capreolus capreolus*).

Par ailleurs, des espèces animales sauvages telles que le coyote (*Canis latrans*), le lion des montagnes (*Puma concolor*) ont été qualifiées de sentinelles car ils sont peu susceptibles d'être infectés par de jeunes tiques et développent peu de symptômes cliniques (Foley et al., 2004).

1.6.1.2. Espèces atteintes

Anaplasma phagocytophilum est présente chez de nombreux hôtes dont les animaux sauvages (ruminants, ours, lamas) et domestiques (chevaux, ovins, bovins, caprins) (Dumler, 2005). De même, l'homme et le chien sont considérés comme hôtes accidentels car leur bactériémie semble être de courte durée (<28 jours).

De nombreuses souches d'*Anaplasma phagocytophilum* qui circulent parmi les animaux domestiques et sauvages. Ces souches peuvent avoir des hôtes variés et un pouvoir pathogène différent. Ainsi, des études expérimentales ont montré que des souches d'*A. phagocytophilum* isolées chez des chevaux n'infectent pas les ruminants (Rikihisa, 2011). De même des souches isolées de rongeurs n'entraînent aucun signe clinique apparent une fois inoculées à des chevaux (Folley et al., 2008 ; Rikihisa, 2011). D'autre part, des tiques de l'espèce *Ixodes scapularis* hébergeant la souche AP-Variant 1 infectent les chèvres et le cerf mais pas les souris (Massung, 2005 ; Massung et al., 2006).

Chez le chien, Silaghi et ses collaborateurs (2011) émettent l'hypothèse que des souches d'*A. phagocytophilum* présentant des différences de quelques nucléotides dans une séquence du gène ARNr16S peuvent être impliquées dans l'infection naturelle des chiens séparément ou simultanément. Ces variants génétiques entraîneraient différentes manifestations cliniques. Par ailleurs, dans une autre étude, cinq variants génétiques ont été identifiés chez des chiens. Ces variants présentaient une différence de 1 à 2 nucléotides dans les séquences du gène ARNr16S aux positions 54, 84, 86 et 120 (Poitout et al., 2005). En revanche, des travaux plus récents, réalisés en Suisse, ont montré que des souches d'*A. phagocytophilum* identifiées chez deux chiens avaient des séquences de gène ARNr16S identiques, séquences retrouvées chez l'espèce *A. phagocytophilum* biovar EGH (Pusterla et al., 1997). De même, en Suède des isolats

canins d'*A. phagocytophilum* ont montré 100% d'homologie avec des isolats humains (Johansson *et al.*, 1995). Le degré avec lequel les variations génétiques contribuent aux modifications du pouvoir pathogène des souches d'*A. phagocytophilum* est encore mal connu.

1.6.2. Transmission d'*A. phagocytophilum*

A. phagocytophilum est transmis aux mammifères par des tiques dures du genre *Ixodes*, notamment *Ixodes scapularis* et *Ixodes pacificus* aux USA et *Ixodes ricinus* en Europe du nord (Bown *et al.*, 2006; Pusterla *et al.*, 1999). En Chine et en Europe du sud, de l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été mis en évidence chez des tiques de l'espèce *Ixodes persulcatus*. La bactérie a aussi été retrouvée chez *I. trianguliceps* au Royaume-Uni (Bown *et al.*, 2006).

Le nombre de bactéries présentes chez ces arthropodes est lié à la durée d'attachement et celle du repas sanguin qui doit durer au minimum 24 heures. *Anaplasma phagocytophilum* se multiplie chez les tiques contaminées, notamment au moment de la mue larvaire et lors de l'engorgement de la tique au stade larvaire, nymphal et adulte. Si les tiques ne peuvent pas constituer un réservoir de germes - il n'existe pas de transmission trans - ovariale mais seulement une transmission trans-stadiale (Ogden *et al.*, 2002 ; Telford *et al.*, 1996) - elles peuvent cependant jouer un rôle important d'amplification en permettant la multiplication des bactéries ingérées.

Chez les tiques infectées, *A. phagocytophilum* est localisé principalement dans les glandes salivaires si bien que la transmission de l'infection aux animaux vertébrés ne nécessite pas un attachement de longue durée et peut se réaliser en une trentaine d'heures.

Les espèces du genre *Ixodes* se nourrissent sur des hôtes différents selon leur stade de développement. La larve et la nymphe sont observées chez les rongeurs et les petits mammifères, alors que l'adulte est plus souvent retrouvé chez les grands mammifères. Cette biologie conditionne le cycle de transmission d'*A. phagocytophilum* (Figure 7).

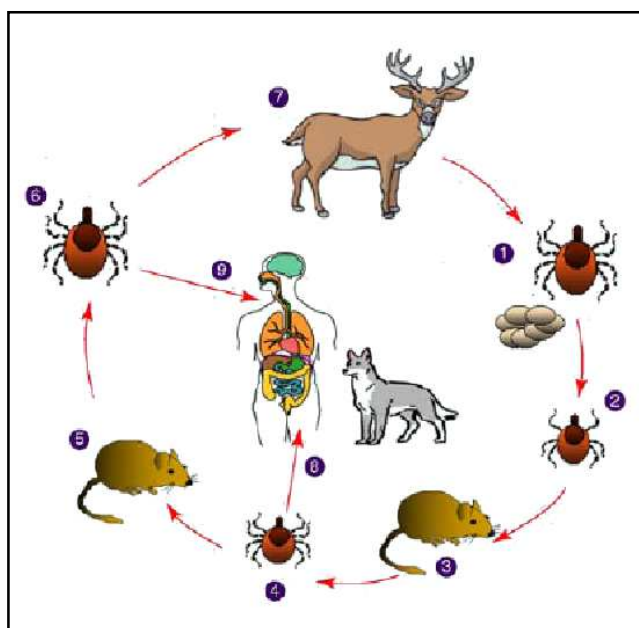


Figure 7 : Cycle de transmission d'*Anaplasma phagocytophilum* (Nicholson *et al.*, 2010)

1.6.3. Prévalence et facteurs de risques

La prévalence d'*A. phagocytophilum* chez le chien a été étudiée dans différentes régions du monde (tableau 6), 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 55% et 50 % respectivement (Beall *et al.*, 2008, Barutzki *et al.*, 2006). Dans une étude réalisée en Suisse, 996 échantillons de sérum ont été prélevés chez des chiens entre mars 1991 et mars 1998, dont 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 immuno-fluorescence indirecte, 25% se sont révélés séropositifs 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 co-infection avec d'autres pathogènes vectorisés. Ainsi la saisonnalité dépend de celle du vecteur dans la région concernée et du climat qui y règne. Aux Etats-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.

Un chenil de chiens de chasse en Caroline du Nord a montré un degré élevé de co-infection par *Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. et *Babesia* spp. Sur les 27 chiens testés par IFI, 26 étaient *Ehrlichia* ou *Anaplasma* séropositifs, 16 *Babesia canis* séropositifs, 25 *Bartonella vinsonii* séropositifs, 22 *Rickettsia rickettsii* séropositifs, et 3 avaient des anticorps qui ont réagi à *A. phagocytophilum*. En revanche, les résultats de la PCR ont montré que parmi les 27 chiens analysés, 15 étaient infectés par *Ehrlichia canis*, 9 avec *Ehrlichia chaffeensis*, 8 avec *Ehrlichia ewingii*, 3 avec *A. phagocytophilum* et 9 avec *A. platys* (Kordick *et al.*, 1999b).

Des cas de co-infection à *A. phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi* ont été également décrits chez des chiens. Une étude sérologique réalisée au Minnesota et portant sur 731 chiens a montré que 29% des chiens testés étaient séropositifs à *A. phagocytophilum*, 11% à *Borrelia burgdorferi* et 25% aux deux agents infectieux (Beall *et al.*, 2008). Foley *et al.* (2001) ont constaté dans leur enquête sérologique que les chiens qui étaient séropositifs à *A. phagocytophilum* étaient 18,2 fois plus susceptibles d'être séropositifs à *Bartonella vinsonii berkhoffii* que les chiens qui étaient *Anaplasma* séronégatifs.

Tableau 6 : Prévalence ou séoprévalence pour *Anaplasma phagocytophilum* chez des chiens de propriétaires (sains ou malades)

Pays	Type d'enquête	Prévalence	Référence
Allemagne	S	50.1	Barutzki <i>et al.</i> , 2006
Italie (centre)	S	8.8	Ebani <i>et al.</i> , 2011
Italie (Cécile)	S	32.8	Torina <i>et al.</i> , 2006
Pologne	PCR	1.0	Skotarczak <i>et al.</i> , 2004
Portugal	S	55	Alves <i>et al.</i> , 2009
Espagne (nord-ouest)	S	11.5	Amusategui <i>et al.</i> , 2008
Suède	S	17.7	Egenvall <i>et al.</i> , 2000
Suisse	S	7.5	Pusterla <i>et al.</i> , 1998
Angleterre	PCR	0.8	Shaw <i>et al.</i> , 2005
Brésil (sud-est)	PCR	0	De Paiva Diniz <i>et al.</i> , 2007
Japon	PCR	0	Inokuma <i>et al.</i> , 2001
Tunisie	S	25.2	M'ghirbi <i>et al.</i> , 2009
Canada	S	0	Gary <i>et al.</i> , 2006
USA (NewYork)	S	9.4	Magnarelli <i>et al.</i> , 1997
USA (Oklahoma)	S	33	Rodgers <i>et al.</i> , 1989
USA(Minnesota)	S/PCR	55.4	Beall <i>et al.</i> , 2008
USA (Californie)	S	8.7	Foley <i>et al.</i> , 2001

1.7. ÉTUDE CLINIQUE

1.7.1. Chez le chien

La plupart des enquêtes sérologiques réalisées à travers le monde dans des régions endémiques indiquent un fort pourcentage d'exposition à *A. phagocytophilum* chez les chiens. En revanche, aucun signe clinique évident d'une infection par cet agent pathogène n'a été associé à une sérologie positive chez plus de la moitié des chiens testés, ce qui laisse penser que le chien est un porteur asymptomatique et que ceci peut être à l'origine d'une réponse immunitaire efficace. À ce

jour, il n'existe aucune étude faisant état de cas de mortalité chez des chiens infectés par *A. phagocytophilum*.

Certaines études ont cependant décrit les signes cliniques observés lors d'une infection naturelle à *A. phagocytophilum* chez des chiens en Allemagne (18 chiens) (Kohn *et al.*, 2008), en Scandinavie (14 chiens) (Egenvall *et al.*, 1997), à Washington (8 chiens) (Poitout *et al.*, 2005) et aux Etats-Unis (17 chiens) (Greig *et al.*, 1996). Les symptômes ne sont pas spécifiques mais les plus fréquemment rencontrés sont : de la léthargie chez l'ensemble des chiens examinés (Greig *et al.*, 1996 ; Egenvall *et al.*, 1997 ; Poitout *et al.*, 2005 ; Kohn *et al.*, 2008), une hyperthermie chez 90% d'entre eux (Greig *et al.*, 1996 ; Egenvall *et al.*, 1997 ; Poitout *et al.*, 2005). Des signes de boiteries avec des difficultés à se mouvoir ont également été observés et 47-88% des chiens atteints présentaient de l'anorexie (Kohn *et al.*, 2008 ; Greig *et al.*, 1996 ; Poitout *et al.*, 2005). D'autres signes moins fréquents et atypiques ont été notés : il s'agit essentiellement de troubles digestifs se traduisant par de la diarrhée et des vomissements ou encore une polydipsie, une épistaxis, une pâleur des muqueuses. Plus rarement, une atteinte pulmonaire avec toux non productive et des signes neurologiques (épilepsie idiopathique, déficits proprioceptifs) ont été rapportés (Eberts *et al.*, 2011). Silaghi et ses collaborateurs (2011) supposent que la diversité du tableau clinique lors de l'anaplasmose canine est liée à une co-infection par différents variant génétique d'*A. phagocytophilum* comme cela a été observée lors d'une infection naturelle chez des chevaux. (Silaghi *et al.*, 2011).

L'infection naturelle par *A. phagocytophilum* semble être auto-stérilisante. En effet, des chiens développant une forme chronique de l'affection et chez qui la bactérie persiste longtemps sont peu décrits. Cependant, dans une étude de Egenvall *et al.*, des chiens inoculés expérimentalement par *A. phagocytophilum* puis traités à la prednisolone ont présenté, 6 mois après l'infection, la présence d'ADN dans différents organes et celle de morulas sur un étalement sanguin chez quelques chiens ainsi qu'une thrombopénie (Egenvall *et al.*, 2000).

Par ailleurs, les anomalies de l'hémogramme sont principalement une thrombopénie persistante (90% des cas), une leucopénie et une anémie modérée non régénérative. Lors de la leucopénie, le nombre des lymphocytes diminue de façon modérée à intense lors du pic d'hyperthermie mais augmente au-delà des valeurs initiales après la phase d'hyperthermie (dans 67% des cas) (Kohn *et al.*, 2008 ; Greig *et al.*, 1996 ; Poitout *et al.*, 2005). Parmi les paramètres biochimiques, on note une tendance à l'hypo albuminémie, une hyperglobulinémie et une élévation modérée des enzymes hépatiques (phosphatases alcalines principalement) (Gravino *et al.*, 1997 ; Egenvall *et al.*, 1997).

Les lésions anatomo-pathologiques relevées chez les chiens atteints sont une hépatite non spécifique, une splénomégalie et une lymphadénopathie associées à une hyperplasie lymphoïde

réactive. Des analyses immuno-histochimiques ont montré la présence d'*A. phagocytophilum* dans les phagocytes de nombreux organes comme la rate, les poumons et le foie (Lepidi *et al.*, 2000).

1.7.2. Chez le chat

Bien que décrite par certains auteurs, l'infection à *A. phagocytophilum* chez les chats est peu commune et semble rare comparée aux chiens. Des enquêtes de séroprévalence ont montré que 4,3% des chats aux États-Unis et 30% des chats dans les régions endémiques étaient séropositifs en immunofluorescence indirecte (Billeter *et al.*, 2007; Magnarelli *et al.*, 2005). Des essais expérimentaux ont montré que les chats étaient sensibles à une infection par *A. phagocytophilum* (Little, 2010). En effet, l'infection naturelle chez les chats se traduit par des signes cliniques similaires à ceux décrits chez l'espèce canine tels que de la fièvre, une léthargie, une anorexie, des problèmes respiratoires, des douleurs musculaires et articulaires, une lymphadénopathie, une conjonctivite, une inflammation de la cavité buccale, une lymphopénie et une thrombopénie (Tarello, 2005; Bjoersdorff *et al.* 1999; Lappin *et al.*, 2004; Heikkilä *et al.*, 2010). La présence de l'infection a été confirmée par la visualisation de morula en microscopie et/ou en détectant l'ADN de la bactérie par PCR.

1.8. DIAGNOSTIC

1.8.1. Signes cliniques et bilan hématologique

Le diagnostic de l'anaplasmose granulocytaire canine débute habituellement par une évaluation clinique d'un état fébrile et d'une myalgie. L'historique d'une exposition à des tiques associé à des troubles hématologiques telle qu'une thrombocytopénie confortent la suspicion. Des examens complémentaires de laboratoire tels que la sérologie et la PCR confirment le diagnostic. L'examen du frottis sanguin permet de mettre en évidence des morulas caractéristiques au sein des granulocytes neutrophiles. Ce test manque de sensibilité et il ne peut donner une réponse positive qu'au stade aigu de l'infection. En effet, le pourcentage de granulocytes neutrophiles contenant des morulas lors d'infection aiguë chez le chien varie de 7 à 32% (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 1997; Poitout *et al.*, 2005). Par ailleurs, il est à noter que lors d'une infection expérimentale chez le chien, les morulas apparaissent au 4^{ème} jour post-inoculation et persistent pendant 4-8 jours (Egenvall *et al.*, 1998).

L'hémogramme met en évidence le plus souvent une thrombopénie : le nombre de plaquettes sanguines est souvent de 50.10^9 L^{-1} (norme 200 à 500.10^9 L^{-1}) (Bexfield *et al.*, 2005). Cependant, bien que la thrombopénie soit très fréquente, des cas où les chiens

ne présentaient pas de thrombopénie ont été décrits (Shaw *et al.*, 2005).

1.8.2. Culture et isolement

En général, la méthode de choix pour le diagnostic bactériologique est la mise en évidence de la bactérie en culture. Or, *Anaplasma phagocytophilum* ne pousse pas sur milieu gélosé. Néanmoins, l'isolement et/ou la culture de la bactérie sont possibles *in vitro* avec : des granulocytes ou leurs précurseurs (Woldehiwet et Scott, 1982), plusieurs lignées de cellules sanguines humaines - HL-60, KG-1, THP-1 - et des lignées de cellules adhérentes des tiques - IDE8, ISE6. Mais, encore aujourd'hui, la culture reste difficile et peu de laboratoires possèdent l'équipement pour la réaliser. De plus, il faut plusieurs jours, voire semaines, avant de pouvoir identifier la bactérie en culture avec la lignée HL-60 et une confirmation du diagnostic est nécessaire. Cette confirmation passe par une méthode de PCR et le séquençage de gènes spécifiques de la bactérie.

1.8.3. Méthodes sérologiques

Les analyses sérologiques sont fréquemment utilisées dans de nombreux laboratoires. L'immunofluorescence indirecte est la technique de référence bien qu'il existe des communautés antigéniques entre *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma marginale* et *Anaplasma platys* ce qui complique l'interprétation des résultats. Ces derniers, doivent être analysés en fonction du contexte épidémiologique et clinique. Mais malgré ces inconvénients, cette technique est actuellement la plus utilisée en pratique par les laboratoires vétérinaires car elle permet souvent de confirmer ou infirmer une exposition initiale à *A. phagocytophilum* chez un chien.

Les immunoglobulines de classe G (IgG) sont décelées approximativement 8 jours après une première exposition à *A. phagocytophilum* ainsi que 2 à 5 jours après l'apparition des morulas et ils peuvent persister durant plusieurs mois. Dans une précédente étude, des anticorps ont été détectés jusqu'à 12 mois après disparition des symptômes lors d'une anaplasmose canine aiguë (Poitout *et al.*, 2005). Par ailleurs, d'autres méthodes sérologiques ont été développées telles que les techniques immuno-enzymatiques (ELISA). Ces techniques, sont basées sur l'utilisation comme antigène des protéines de surface obtenues par recombinaison. Ainsi, l'utilisation de la protéine p44 comme antigène permet de tester des sérums aussi bien chez le chien que chez le cheval (Magnarelli *et al.*, 2001). Un autre test utilisant la protéine majeure de surface recombinante Msp2/p44 est en cours d'évaluation et semble donner des résultats prometteurs pour rechercher les anticorps

à *Anaplasma phagocytophilum* dans les sérums de chiens. De plus, l'utilisation de ce peptide synthétique a montré une sensibilité de 99,1% et une spécificité de 100% comparé à la technique immunofluorescence indirecte (Eberts *et al.*, 2011).

Cependant, il est important de noter qu'une sérologie positive n'est pas synonyme d'infection aiguë. Ravnik et ses collaborateurs (2011) ont montré la nécessité d'introduire d'autres stratégies de diagnostic en pratique vétérinaire, car la sérologie et les paramètres hématologiques à eux seuls ne sont pas suffisants pour confirmer un cas d'anaplasmose granulocytaire canine. Ainsi, seule la technique PCR permettra alors un diagnostic de certitude.

1.8.4. Méthodes de Biologie moléculaire (PCR)

Différents tests de PCR (RT-PCR, RFLP-PCR, Nested-PCR) ont été développés pour la détection de l'ADN d'*A. phagocytophilum* à partir du sang total, du buffy coat, de la moelle osseuse ou encore à partir d'échantillons de rate. La spécificité des techniques de PCR varie en fonction des amorces utilisées; les gènes les plus fréquemment recherchés sont : ARNr16S, ankA, msp2 (p44), msp4, rrs, epank1 et gro EL (Lester *et al.*, 2005). Selon, Massung et ses collaborateurs (2003)(194), la limite de détection des techniques de PCR varie de 0,25 à 25 cellules infectées. Par ailleurs, un autre type de PCR dite quantitative ou en temps réel a été mise au point pour le gène msp2 (Drazenovich *et al.*, 2006).

Beall et ses collaborateurs rapportent dans leur étude que 37% (19/51) des chiens présentant des signes cliniques d'AGC et que 3% (7/222) des chiens cliniquement sains sont positifs en PCR (Beall *et al.*, 2008). D'autre part, Khon *et al.*, ont décrits que 18 chiens atteints d'AGC étaient positifs en PCR et qu'en revanche, 2 à 6 semaines après traitement à la doxycycline les résultats devenaient négatifs en PCR et aucune morula n'a été visualisée sur frottis sanguin après coloration. Ces deux études confirment qu'il existe une corrélation entre les chiens cliniquement atteints d'AGC et des résultats positifs en PCR (Kohn *et al.*, 2008).

2. ÉTUDE DU GENRE *BORRELIA*

Le genre *Borrelia* est principalement représenté chez le chien et le chat par l'espèce *B. burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme. Seule cette espèce sera traitée ci-dessous.

2.1. HISTORIQUE

La maladie de Lyme est une maladie d'expression polysystémique due à *Borrelia burgdorferi*, bactérie de l'ordre des spirochètales transmise par les tiques. Les borrélioses affectent de très nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux. Les carnivores domestiques représentent une des cibles de la borréliose de Lyme qui est par ailleurs une zoonose majeure.

L'histoire de la borréliose de Lyme commence en Europe à la fin du XIX^e siècle puis se poursuit aux États-Unis. C'est en Allemagne qu'est décrite en 1883 l'acrodermatite chronique atrophiante puis en 1910 en Suède, l'érythème chronique migrant, enfin en 1911 le lymphocytome cutané bénin. Même si ces deux dernières affections étaient associées à des piqûres de tiques, ces syndromes sont alors considérés comme trois maladies différentes. En 1922, Garin et Bujadoux décrivent le premier cas d'atteinte neurologique, la transmission par une tique y clairement évoquée. C'est Sterne et ses collaborateurs qui ont rattachés les différents aspects dermatologiques, rhumatologiques, neurologiques et cardiologiques de la maladie en enquêtant sur une épidémie d'arthrite atteignant surtout des enfants dans la commune de Old Lyme dans l'Etat du Connecticut aux États-Unis au milieu des années 1970.(Sterne *et al.*, 1977).

En 1982, la preuve de l'étiologie bactérienne de la borréliose de Lyme est apportée. Un spirochète est mis en évidence dans l'intestin d'une tique *Ixodes dammini* par Burgdorfer (Burgdorfer *et al.*, 1982) et cultivé dans le milieu de Kelly modifié par Barbour (Stoenner *et al.*, 1982).

C'est au cours des années 80 que la grande majorité des études consacrées à la borréliose de Lyme chez les carnivores domestiques ont été réalisées et sont presque exclusivement d'origine américaine. L'identification a eu lieu en 1984 au Connecticut chez le chien puis chez le chat et le cheval en 1986, chez les petits ruminants en 1987 (Greene, 1991 ; Levy et Dreesen, 1992).

2.2. TAXONOMIE

Les spirochètes représentent phylogénétiquement un des 11 phylums des eubactéries (Woese, 1987)(293). 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 de Postic et Baranton portant sur l'homologie d'ADN entre les souches ont montré l'existence de trois espèces au sein de *B. burgdorferi* devenu *B. burgdorferi sensu lato* : *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* et *Borrelia afzelii* (Postic, 1990 ; Baranton, 1992); ces trois 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) (Figure 8).

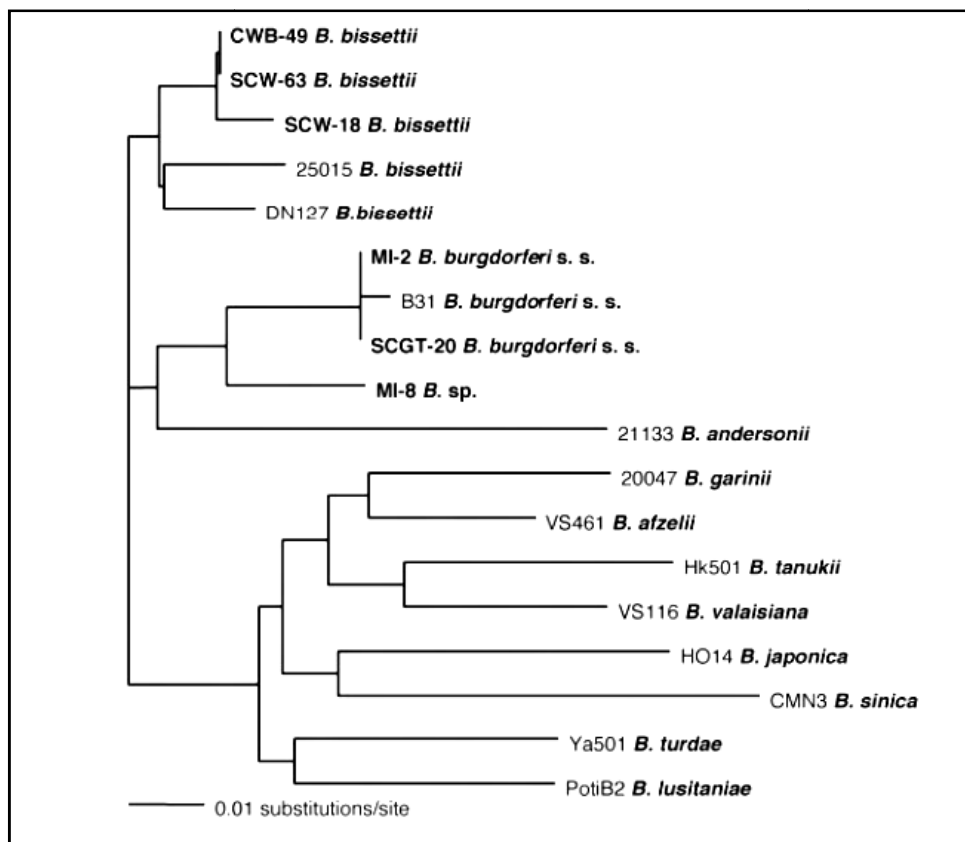


Figure 8 : Arbre phylogénétique de *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Mircean, 2012)

Chez le chien, l'espèce *Borrelia burgdorferi sensu stricto* a été désignée comme responsable de la maladie de Lyme aux États-Unis. En Europe, *B. garini* et *B. afzelii* sont aussi décrites (Steere, 2001; Littman, 2003).

2.3. CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET ORGANISATION DU GÉNOME

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 au nombre de 7 à 11 et localisés entre l'enveloppe externe et le corps bactérien (Figure 9).

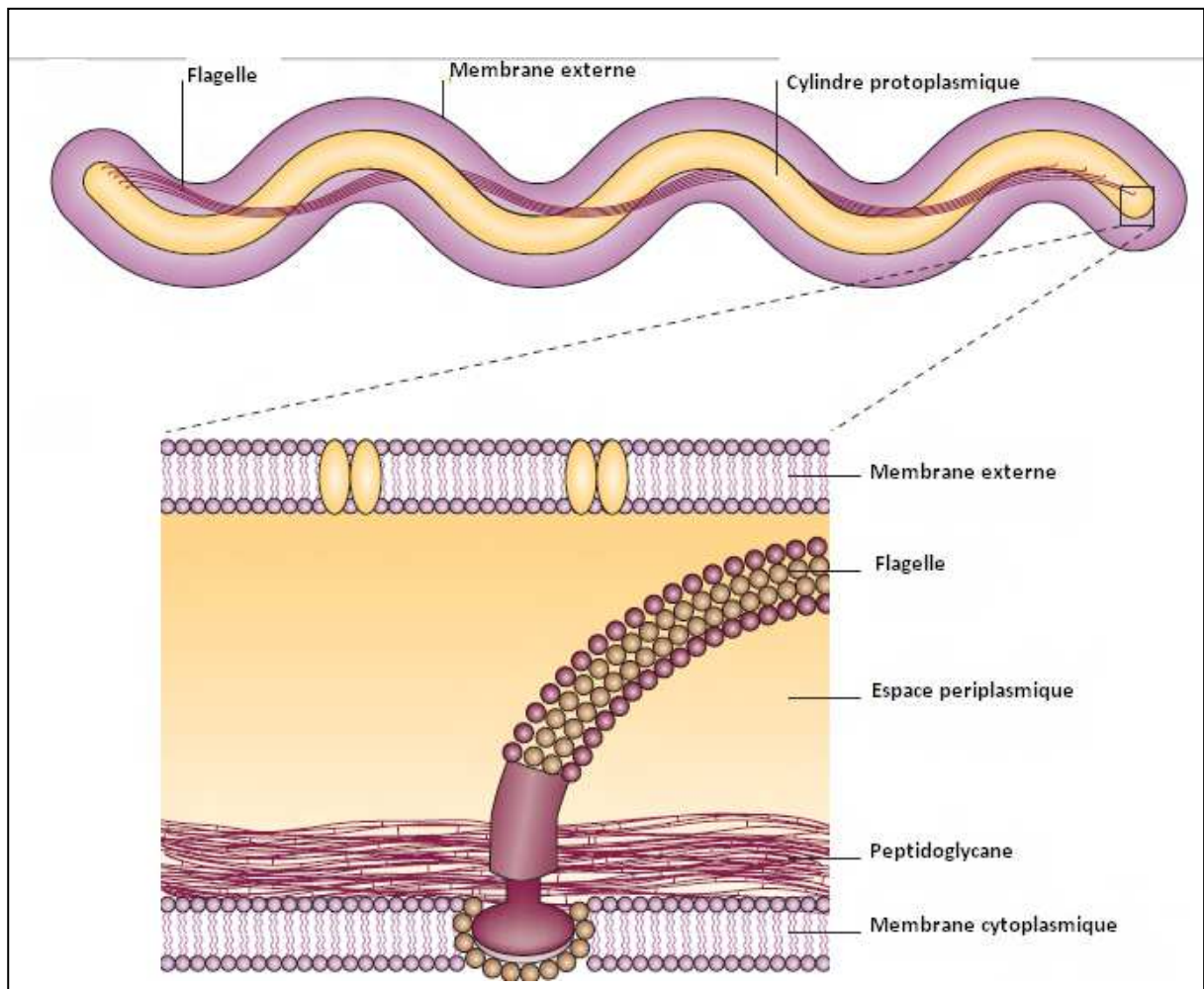


Figure 9 : Structure et morphologie de *Borrelia Burgdorferi* (Rosa *et al.*, 2005)

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 $1 \text{ à } 4 \times 10^8$ bactéries /ml à partir de 1 à 2 spirochètes. La croissance y est de type micro-aérophile (4% d'O₂) 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 autorise une quantité importante de recombinaisons (Casjens *et al.*, 2000 ; Fraser *et al.*, 1997). 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).

2.4. POUVOIR ANTIGÉNIQUE ET IMMUNOGÈNE

La description des structures antigénique de *B. burgdorferi* n'est pas complètement aboutie. Au total, environ 150 gènes de lipoprotéines ont été décrits. Parmi les plus étudiés, on distingue :

2.4.1. Les protéines de membrane externe Osp

Elles représentent une partie importante de la structure protéique de la bactérie et jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. Elles sont appelées Osp pour "Outer Surface Protein" et sont codées par des gènes plasmidiques. Actuellement, six protéines de surface ont été identifiées et désignées sous l'appellation d'OspA, OspB, OspC, OspD, OspE et OspF (Fikrig *et al.*, 1998 ; Schwan et Piesman, 2002).

Les protéines OspA et OspB sont des protéines majeures et immunogènes lorsqu'elles sont inoculées à l'animal. Ces deux protéines ne sont exprimées que chez la tique et elles font place à OspC dès que la bactérie se trouve chez un mammifère (Figure 10). En effet, dès que la migration vers les glandes salivaires commence, et lors de la transmission, la protéine OspC est exprimée au détriment des protéines OspA et OspB dont la production diminue. Ainsi, les protéines OspA et OspB ont peu d'intérêt pour le diagnostic biologique chez l'hôte, contrairement à la protéine OspC qui entraîne la synthèse des tout premiers anticorps de classe IgM (De Silva et Fikrig, 1997; Ohnishi *et al.*, 2001).

La protéine OspD quant à elle n'est exprimée que chez certaines souches du complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Le rôle exact de cette protéine de surface n'est pas clairement défini (Marconi *et al.*, 1994).

Enfin, les protéines OspE et OspF interviennent dans la défense contre la réponse immunitaire de l'hôte infecté, elles se lient au facteur H du complément et empêchent ainsi son activation (Lam *et al.*, 1994).

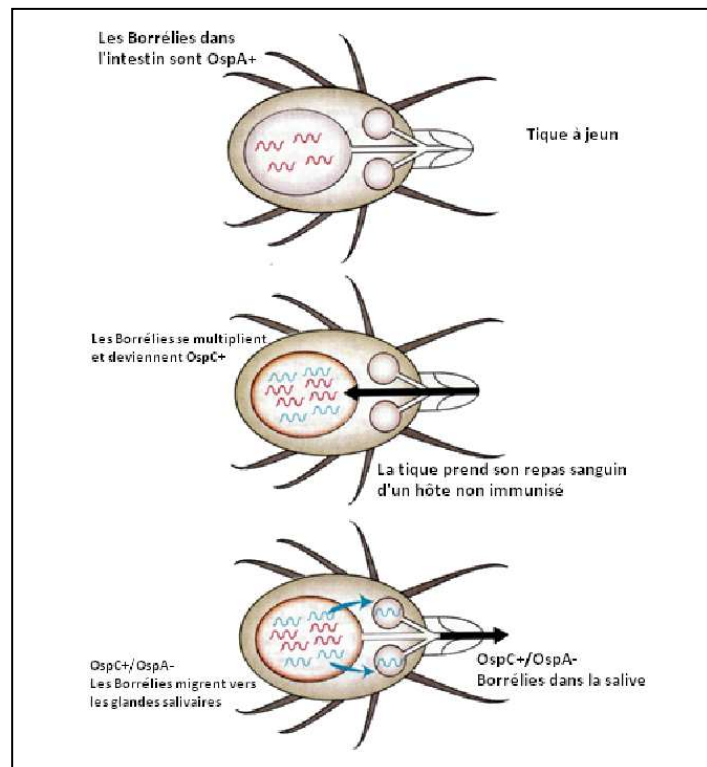


Figure 10 : Transmission de *Borrelia burgdorferi* chez la tique *Ixodes* (Dr China, photo personnelle)

2.4.2. Les protéines DbpA et DbpB (decorin-binding-protein)

Il s'agit de deux protéines de membrane externe qui ont des propriétés d'adhésion à la décorine du tissu conjonctif des mammifères. Elles entraînent une réponse immunitaire intense en modèle expérimentale murin (Hubner *et al.*, 2001; Crother *et al.*, 2003).

2.4.3. La protéine BBK32

Elle est caractérisée par un poids moléculaire de 47 KDa et assure la liaison à la fibronectine. Le cycle de cette protéine est similaire à celui de l'OspC. En effet, cette protéine est détectée chez la bactérie durant le gorgement de la tique, mais son taux décroît après réplétion. Des anticorps contre BBK32 ont été observés chez l'homme et chez la souris. Cependant l'implication de cette protéine dans le cycle infectieux est remise en cause (Fikrig *et al.*, 1997 ; Akin *et al.*, 1999 ; Fikrig *et al.*, 2000).

2.4.4. VlsE

VlsE (pour Vmp like sequence Expression) est une lipoprotéine de surface immunogène dont la structure varie en fonction de réarrangements complexes de la structure du gène correspondant. Ces variations de structure permettent l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. Cependant il existe au niveau de ce gène une zone conservée "région invariable" (IR6-peptide C6), exposée à la surface de la bactérie (Ohnishi *et al.*, 2001 ; Embers *et al.*, 2007). Ce peptide est utilisé comme outil spécifique dans le diagnostic sérologique de la maladie de Lyme chez l'homme et le chien (Liang et Philipp, 1999 ; Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

2.4.5. Flagelline et protéine P39

Le gène *fla* code pour une flagelline spécifique du genre *Borrelia*. Cette protéine immunogène entraîne une réponse sérologique pouvant présenter des réactions croisées avec les tréponèmes et les leptospires. En revanche, la protéine immunogène P39 est considérée comme une protéine associée à la membrane et est considérée comme spécifique en cas de réactivité en immuno-blot. Elle joue un rôle important dans l'adhésion aux tissus et aux cellules épithéliales (Simpson *et al.*, 1991).

2.5. PATHOGÉNIE ET MÉCANISMES IMMUNITAIRES

Le mécanisme à travers lequel les *Borrelia* se propagent et se disséminent dans l'organisme de l'hôte mammifère est encore mal compris car la reproduction expérimentale est difficile à réaliser.

La transmission des *Borrelia* chez l'hôte débute 24-48 après la morsure de la tique. Les bactéries se multiplient au lieu de l'inoculation, dans la peau et les muscles. Le tropisme des

Borrelia pour la peau et les tissus riches en collagène s'explique par son besoin en N-acétyl glucosamine, monosaccharide nécessaire à la structure du collagène (Fraser *et al.*, 1997 ; Krupka et Straubinger, 2010 vet clin small anim). *Borrelia burgdorferi* utilise ses lipoprotéines et protéines de surface telle que l'OmpC qui, une fois fixée aux protéines salivaires de la tique (Salp 15), inhibe la sécrétion d'interféron et l'action des macrophages chez l'hôte infecté (Schuijt *et al.*, 2008), lui permettant de disséminer dans tous l'organisme. De plus, pour migrer plus activement, elle stimule l'activation du plasminogène en plasmine, enzyme protéolytique qui permet de lyser la matrice extracellulaire des tissus (Klempner *et al.*, 1995).

D'autre part, *Borrelia burgdorferi* est capable de traverser l'endothélium des vaisseaux sanguins grâce à sa protéine de liaison BBK32 qui se fixe à la fibronectine et par conséquent permet à la bactérie de se propager par voie hématogène (Fikrig *et al.*, 2000 ; Revell *et al.*, 2002). La bactériémie chez l'hôte infecté reste néanmoins de courte durée et de faible intensité. La bactérie est retrouvée en quelques semaines dans les organes et tissus tels que le foie, la rate, le muscle et les articulations (Skotarczak, 2005).

La lipoprotéine de membrane externe VlsE, à l'origine d'une réponse immunitaire protectrice, joue un rôle majeur dans l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. La séquence d'acides aminés de cette protéine subit des variations dès les premiers jours qui suivent l'infection (Embers *et al.*, 2007). Il a été démontré que les clones de *Borrelia* qui ne sont pas en mesure de présenter ces variations antigéniques sont préférentiellement reconnus puis éliminés par le système immunitaire (Coutte *et al.*, 2009). En revanche, la production d'anticorps neutralisant les souches présentant une hétérogénéité génétique se produit beaucoup plus lentement. Par ailleurs, *Borrelia* peut aussi probablement survivre à l'attaque du système immunitaire de l'hôte, par un mécanisme actif d'endocytose. Cette particularité lui confère la possibilité de persister dans une vacuole et à l'intérieur du cytoplasme de certaines cellules telles que les macrophages et sans être éliminée (Gruntar *et al.*, 2001).

La production d'anticorps spécifiques dirigés contre *Borrelia burgdorferi* débute tardivement par comparaison aux autres infections bactériennes. Le taux d'IgM commence à augmenter 2 à 4 semaines post-infection et celui des IgG est détectable 4 à 6 semaines post-infection (Craft *et al.*, 1984). L'infection expérimentale de chien de race Beagle a montré que le pic de production des IgG était observé 90 jours après exposition aux tiques (Straubinger *et al.*, 2000).

Les anticorps produits n'induisent pas une immunité protectrice chez l'homme ou le chien. Dans la phase tardive et chronique de la maladie, des infiltrats massifs de lymphocytes T peuvent être observés dans les membranes synoviales des chiens infectés. Ces

réactions sont induites par des cytokines comme l'interleukine IL-8 ou encore les interleukines IL-10 et IL-4 (Straubinger *et al.*, 1997 ; Lazarus *et al.*, 2008).

Par conséquent, les lésions observées au cours de la borréliose de Lyme semblent plus la conséquence d'un dérèglement du système immunitaire que le résultat d'une action directe des *Borrelia* (Krupka et Straubinger, 2010).

2.6. HÔTES ET RÉSERVOIRS

De nombreux mammifères sauvages, rongeurs essentiellement, constituent le réservoir de la bactérie. En effet, ils demeurent porteurs de *Borrelia burgdorferi* pendant plusieurs mois voire des années. Parmi ces micromammifères, on décrit le mulot, la musaraigne, le campagnol roux mais aussi le hérisson et l'écureuil. Ces derniers sont parasités principalement par les larves et les nymphes d'*Ixodes*. En revanche, les formes adultes s'alimentent sur des grands mammifères tels que les cervidés, le renard, la marte et le sanglier. Les oiseaux jouent également un rôle important, puisqu'ils assurent la propagation et la dissémination de la bactérie ou des tiques qu'ils portent (Anderson *et al.*, 1986 ; Olsen *et al.*, 1993 ; Olsen *et al.*, 1994).

Les animaux domestiques sont réceptifs à *Borrelia burgdorferi* mais ne sont que des hôtes accidentels. L'homme et le chien sont considérés comme des hôtes occasionnels ou des culs de sac épidémiologiques. En effet, ces deux hôtes ne transmettent pas la maladie car seules les tiques adultes en fin de cycle se nourrissent de leur sang (Krupka et Straubinger, 2010 ; Littman, 2003). Cependant, lorsque la tique est porteuse de *B. burgdorferi* si, le risque de transmission à l'homme serait de l'ordre de 7 à 10 %. Cette transmission est accrue s'il s'agit d'une nymphe (Little *et al.*, 2010 ; Diuk-Wasser *et al.*, 2006) (Figure 11).

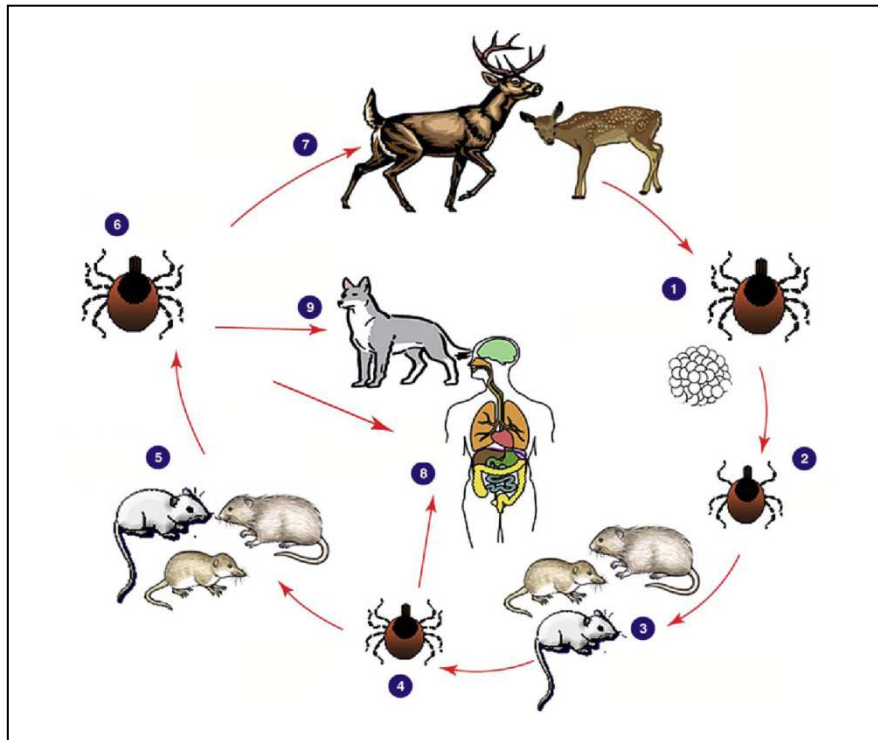


Figure 11 : cycle de transmission de *Borrelia burgdorferi*
(adaptée et modifiée de Little *et al.*, 2010)

2.7. TRANSMISSION ET CYCLE CHEZ LA TIQUE

Bien qu'il existe des travaux rapportant la capacité d'autres arthropodes à jouer le rôle de vecteur de *Borrelia burgdorferi*, seule la famille des *Ixodidae* est considérée comme compétente.

Durant les 12 à 24 premières heures qui suivent la morsure infectante de la tique, les *Borrelia* vont se localiser au niveau de son intestin où elles se multiplient par division binaire. C'est au cours du second repas (stade suivant) que le nombre des borrelies augmente fortement.

Elles migrent alors du tube digestif vers l'hémocoel puis vers les glandes salivaires pour être inoculées à un autre hôte (Littman, 2003). Pendant ce temps, les spirochètes subissent un processus complexe de restructuration de leurs protéines externes de surface qui leur permettra de survivre chez l'hôte immunocompétent mammifère ou aviaire.

2.8. PRÉVALENCE ET FACTEURS DE RISQUE

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 à 100% dans les régions 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 (Skotarczak, 2002 ; Goossens *et al.*, 2001) (Tableau 7).

Tableau 7 : Séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* chez des chiens de propriétaires (sains et malades)

Pays	Technique Utilisée	Nombre de Chiens	Sérorévalence (%)	Référence
USA(Alabama)	IF	579	1.7	Wright <i>et al.</i> , 1997
USA (Newyork)	Lyme multiplex	451	23	Wagner et Erb, 2012
USA (le Maine)	SNAP 4 Dx	1087	12.7	Rand <i>et al.</i> , 2011
USA (Minnesota)	ELISA	731	11	Beall <i>et al.</i> , 2008
	ELISA			

USA (Californie, Oregon, Washington)		2431	1.2	Carrade <i>et al.</i> , 2011
Allemagne (Munich)	SNAP 4 Dx	448	4.9	Barth <i>et al.</i> , 2012
Chine (Beijing, Shenzhen, Shanghai)	SNAP 4 Dx	600	0.17	Xia <i>et al.</i> , 2012
Roumanie	SNAP 4 Dx	1146	0.5	Mircean <i>et al.</i> , 2012
Espagne (centre)	SNAP 4 Dx	131	0	Couto <i>et al.</i> , 2010
Espagne (nord-ouest)	IF	649	15	Amusatequi <i>et al.</i> , 2008
Espagne (nord-est)	IF	466	0.6	Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2006
Israël	IF	40	10	Banneth <i>et al.</i> , 1998
Pays bas	ELISA	448	18	Goossens <i>et al.</i> , 2001
Portugal	SNAP 4 Dx	1185	0.2	Cardoso <i>et al.</i> , 2012
Canada	SNAP 4 Dx	86251	0.72	Villeneuve <i>et al.</i> , 2011

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).

2.9. SIGNES CLINIQUES

2.9.1. Chez le chien

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 (Littman, 2003).

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 végétante, des blocs atrio-ventriculaire et des arythmies ventriculaires.

2.9.2. Chez le chat

Bien que les chats soient également considérés comme des hôtes pour les tiques *Ixodes*, la fréquence de la maladie de Lyme est beaucoup plus exceptionnelle que chez le chien. Cependant, des cas cliniques de chats présentant une boiterie et une méningite associés à des morsures de tiques ont été décrits. Dans certaines régions du Nord des États-Unis,

où la maladie de Lyme sévit d'une manière endémique, 13% à 47% des chats testés ont été séropositifs à *Borrelia burgdorferi* (Magnarelli *et al.*, 2005).

Le manque de sensibilité des chats à une infection par *Borrelia* laisse supposer que la diffusion des spirochètes n'est pas aussi importante que chez le chien ou bien que la réponse immunitaire chez le chat réussit à neutraliser les bactéries avant que la maladie ne s'exprime cliniquement (Krupka et Straubinger, 2010).

2.10. DIAGNOSTIC

Le diagnostic de la maladie de Lyme chez le chien est difficile en raison de l'absence de signes cliniques pathognomoniques. Le diagnostic dépend donc du contexte épidémiologique évocateur et de l'examen biologique.

2.10.1. Examen directe 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 et 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.

2.10.2. Méthodes moléculaires

Le séquençage du génome de *Borrelia burgdorferi* 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 (Straubinger, 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 et 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.

2.10.3. Méthodes sérologiques

Compte tenu du manque de sensibilité de la microscopie ou de la culture, la détection indirecte de *B. burgdorferi* 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 2^{ème} à la 4^{ème} 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 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.

2.10.4. 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 coûteuses et bien adaptées au diagnostic de routine, elles présentent certains inconvénients tels que la présence de réactions croisées entre les borrelies 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 de Levy et Magnarelli 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 Magnarelli, 1992).

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

2.10.5. 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 du 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 chez les carnivores.

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 données épidémiologiques, signes cliniques et biologiques avant de confirmer avec certitude un cas de maladie de Lyme chez un chien.

CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. INTRODUCTION

Tous les travaux de recherche présentés dans ce document ont été réalisés au sein de deux structures: le Laboratoire de Microbiologie-Immunologie de l'École Vétérinaire d'Alfort (ENVA) et l'UMR 0956-BIPAR (Biologie Immunologie Parasitaires et Fongiques) de l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses).

L'UMR 0956-BIPAR est dirigée par le Professeur Nadia Haddad. L'équipe «Vecteur Agent Microbien Pathogène» de l'UMR 0956, est animée par le Professeur Henri Jean Boulouis. Cette équipe a pour mission de comprendre les relations hôtes-pathogènes et de leurs conséquences pour le diagnostic et les moyens de lutte vis-à-vis des maladies induites, en particulier les maladies vectorielles.

Au départ de cette étude, rien n'était connu sur la situation de la bartonellose féline et canine (chiens errants) en Algérie. De même nous ne disposons pas de données publiées sur la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi* chez les chiens de fourrière et de propriétaire. Ce travail avait pour objectif principal de faire un état des lieux de la situation en l'Algérie tant au niveau des chiens qu'au niveau des chats.

La première partie de ce travail a visé à effectuer une enquête épidémiologique concernant les espèces de *Bartonella* chez une population de chats errants. À partir de cette enquête, cinq axes essentiels ont été poursuivis :

- Estimer la prévalence à *Bartonella* par deux méthodes : sérologique et bactériologiques ;

- Estimer le pourcentage de positivité chez la population de chattes gestantes /non gestantes et étudier son impact sur la reproduction ;
- Isoler, identifier et caractériser les espèces de *Bartonella* par les méthodes moléculaires ;
- Étudier la diversité et la variabilité génétique de l'espèce *Bartonellahenselae* inter-chats et intra-chat ;
- Étudier le pourcentage de positivité aux virus de l'immunodéficience féline FelV et Fiv.

Dans une deuxième étape, nous avons étudié la prévalence des anticorps anti-*Anaplasma phagocytophilum*, anti-*Borrelia burgdorferi*, anti-*Bartonellahenselae*, anti-*Bartonellavinsonii* et *Bartonella berkhoffii* sur la base d'un échantillon représentatif chez deux populations de chiens :

- de fourrière ;
- de propriétaire : sains et malades.

Nous envisagerons d'abord la description du matériel et des méthodes utilisés, puis nous exposerons les résultats de l'enquête et enfin nous les discuterons.

2. TECHNIQUES ET PROTOCOLES

2.1. ÉTUDE CHEZ LES CHATS

2.1.1. La population

Cette étude a été menée de juillet 2008 à août 2011. Les 282 chats choisis pour l'étude provenaient tous de la fourrière féline d'Alger. L'âge des chats a été estimé en fonction de la morphologie et de la denture. Les femelles ont été soumises à une palpation abdominale en vue de détecter la présence d'ampoules fœtales révélant un état de gestation.

2.1.2. Les prélèvements

Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur des chats anesthésiés (0.5 mg/Kg d'acépromazine, Vetranquil/ Sanofi et 15 mg/Kg de kétamine Immalgène 1000/ Merial). La ponction est faite de manière aseptique à la veine jugulaire ou en intracardiaque. Chaque ponction fournit au maximum 5 mL répartis dans un tube sec (2 mL) et un tube EDTA (3mL). Le sérum est décanté puis congelé. Le tube de sang prélevé sur EDTA est conservé à -20°C jusqu'à la culture.

Une laparotomie a été réalisée sur 76 chattes gestantes. Des prélèvements de foie et de rate ont été réalisés sur les fœtus de plus de 4 semaines d'âge en évitant scrupuleusement le contact avec le sang maternel. Les embryons ont été prélevés en entier lorsque la gestation était inférieure à 3 semaines. Les organes ont été conservés à -20°C dans des flacons de prélèvements stériles jusqu'à la mise en culture.

2.1.3. Isolement et mise en culture

Après décongélation à température ambiante, le sang est centrifugé 75 minutes à 3500 rotation/minute (2800xg). Le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 250 µL de milieu pour culture cellulaire (RPMI 1640, GIBCO, USA). La totalité du volume de suspension obtenue (entre 300 et 500 µL) est divisée en deux inoculums de volume égal. Chaque inoculum est étalé sur une boîte de gélose BHI (BrainHeart Infusion Agar, DIFCOND) enrichie de 5% de sang de lapin défibriné sur billes de verre. Les géloses sont utilisées dans les 15 jours suivant leur fabrication. Les boîtes sont incubées à l'étuve (SANYOND) à 35°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Chaque boîte est contrôlée dans les deux jours suivants l'ensemencement (pour éliminer les éventuelles boîtes contaminées) puis une à deux fois par semaine pendant quatre semaines.

Les colonies pouvant correspondre à des colonies de *Bartonella* de par leur taille, leur couleur grise et leur aspect rugueux ainsi que leur temps d'apparition ont été repiquées individuellement à raison d'une à 14 colonies par chat et suivant les conditions précédemment citées.

Le comptage des colonies observables sur la gélose est effectué afin d'obtenir le nombre d'Unités Formant Colonies (CFU) par millilitre de sang permettant d'évaluer la charge en bactéries du sang au moment de l'ensemencement des géloses.

2.1.4. Caractérisation génétique des *Bartonella* isolées

2.1.4.1. Identification des espèces de *Bartonella* par PCR-(ITS 16S-23S)

La caractérisation définitive (après coloration de Gram) des espèces de *Bartonella* isolées en culture a été réalisée par amplification en chaîne (PCR) de la portion du génome comprise entre les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S et 23S. Cette séquence intergénique comporte la partie 5' de 16S et la partie 3' de 23S.

Lysat bactérien

Les colonies issues du repiquage de chaque souche de *Bartonella* ont été récoltées dans 500 µL d'eau distillée stérile. La suspension a été chauffée au bain marie pendant 10 minutes. La suspension a ensuite été centrifugée à 3000 g pendant 15 minutes, le surnageant constitué du lysat bactérien a été récolté dans des microtubes stériles puis conservés à -20°C jusqu'à l'analyse par PCR.

Amorces et programmes

Les amorces utilisées pour l'amplification de la séquence ITS 16S-23S sont celles publiées par Jensen *et al.*, (2000) et confirmées par Maillard *et al.* (2004). Il s'agit de :

B1623 R2 = AAC CAA CTG AGC TAC AAG CC

Jen = CTC TTT CTT CAG ATG ATC C

Le programme d'amplification (Tableau 8) a été adapté aux besoins de l'étude, en modifiant la température et la durée de chaque étape du cycle

Tableau 8 : Programme d'amplification de la séquence intergénique ITS 16S-23S
de *Bartonella*

Température(°C)	Temps(sec)	Répétition
95	600	1X
95	120	36X

56	60	36X
72	40	36X
72	600	1X
11	Infini	-

Mix de PCR et réactifs

Les réactifs nécessaires à la PCR ont été réunis dans les proportions détaillées dans le tableau 4. La Taq Polymérase utilisée est de la Takara (Takara Bio inc, Japon).

Le mélange des réactifs (fournis dans le kit d'amplification), l'ajout d'ADN (remplacé par

de l'eau stérile pour le témoin négatif) et la réaction d'amplification ont eu lieu chacun dans des locaux séparés afin d'éviter les contaminations (Tableau 9). Le thermocycleur employé a été un EppendorfMastercycler® (Allemagne).

Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel pour un volume de 25 µl

Réactif	Volume (µl)
Tampon 10X ExTaq Buffer TaKaRa®	2.5
Mélange de dNPTaKaRa® à 2,5 mmol/L	2
Amorce sens à 10µmol/L	2
Amorce antisens à 10µmol/L	2
Taq polymérase ExTaqTaKaRa® à 5 unités/µL	0.2
Eau stérile	11.3
ADN	5

Electrophorèse en gel d'agarose

Une électrophorèse en gel d'agarose 2% dans du tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA 50X, Lonza, Belgique) contenant du BET (Bromure d'Ethidium 0.1 µg/mL) a permis de vérifier, pour chaque réaction d'amplification, la taille des fragments obtenus. Le marqueur de poids moléculaire employé a été le 100 Pb (DNA ladder, Invitrogen), à raison de 7µL

pour un puits. Le voltage utilisé lors de la migration d'ADN est de 135 V. Le temps de migration est de 60 minutes. Les bandes sont détectées par analyseur d'image (Gel Doc, Biorad) qui s'appuie sur l'utilisation du logiciel Quantity one (Biorad).

2.1.4.2. Étude de la diversité génétique des souches de *Bartonellahenselae*

2.1.4.2.1. Typage par amplification partielle de l'ADN codant pour l'ARNr 16S

L'étude du gène codant pour la fraction 16S de l'ARNr permet de répartir les souches de *Bartonellahenselae* en deux génotypes I et II qui diffèrent par trois nucléotides localisés entre 172 et 175 dans le gène 16S rRNA.

Amorces et programmes

Les amorces ont été sélectionnées sur la base de l'étude de Bergmann et ses collaborateurs. (Bergmann *et al.*, 1996)

BH1 = CCG ATA AAT CTT TCT CCC TAA

BH2 = CCG ATA AAT CTT TCT CCA AAT

16SF = AGA GTT TGA TCC TGG YTC AG

Ces amorces ont été employées par couples (BH1 et 16SF ; BH2 et 16SF). Le programme d'amplification (tableau 10) a été adapté aux besoins de l'étude, en modifiant la température d'hybridation.

Tableau 10 : Programme d'amplification pour le génotypage de *B. henselae*

Température(°C)	Temps(sec)	Répétition
95	180	1X

95	20	29X
55	30	29X
72	60	29X
72	600	1X
11	Infini	-

Mix de PCR et réactifs

Les tests PCR ont été réalisés sous un volume de 25 µL dans les proportions détaillées dans le tableau 6. Deux mélanges réactionnels sont préparés : le premier contient les amorces qui caractérisent les souches de génotype I et le second celles qui caractérisent les souches de génotype II (Tableau 11).

Tableau 11 :Composition du mélange réactionnel

Réactif	Volume pour un tube (µL)
Tampon 10X ExTaq Buffer TaKaRa ®	2.5
Mélange de dNTP TaKaRa ® à 2,5 mmol/L	2
Amorce BH1 ou BH2 à 10µmol/L	2
Amorce 16SF à 10µmol/L	2
Taq polymérase ExTaq TaKaRa ® à 5 unités/µL	0.15
Eau stérile	11.35
ADN	5

Electrophorèse en gel d'agarose

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (2%). Le voltage utilisé lors de la migration d'ADN est de 135 V. Le temps de migration est de 60 minutes. L'obtention d'une bande à la taille attendue (184 Pb) pour l'un ou l'autre des couples d'amorces permet d'en déduire le génotype auquel appartient la souche.

Séquençage

Certaines souches de *B. henselae* pour lesquelles l'appartenance au génotype I et/ou II restait difficile à déterminer ont été sélectionnées puis testées par PCR en utilisant le couple d'amorces suivant:

16SF = AGA GTT TGA TCC TGG YTC AG

16SR = CAGTGGGGAATATTGGACA (dessin d'amorce du laboratoire)

Le programme employé est le même que celui indiqué dans le tableau 6. Les produits d'amplification ont fait ensuite l'objet d'un séquençage. Celui-ci a été sous-traité au laboratoire Qiagen (QuiagenGmbHScientist, Max-Volmer-Str.4, 40724 Hilden-Germany). Le service en ligne BLAST du National Center for Biotechnology Information (NCBI) a été utilisé pour les recherches d'homologie de séquence nucléotidique.

2.1.4.2.2. Typage par la technique MLVA

L'étude de la diversité des souches isolées de *Bartonellahenselae* ainsi que le degré de leur variabilité intra-chat et inter-chat ont été étudiés en combinant cinq séquences répétées polymorphes (ou VNTR).

Amorces et programmes

Les cinq amorces utilisées (BHV : *Bartonellahenselae*VNTR), qui encadre des séquences répétées en tandem, sont détaillées dans le tableau 12. Elles sont issues des travaux effectués dans l'équipe VAMP (Monteil *et al.*, 2007 ; Bouchouichaet *al.*, 2009).

Tableau 12 :Caractéristiques des amorces utilisées

Désignation du BHV	Taille de l'U.B. (Pb)	% GC	% conservation	Séquence des amorces 5' → 3'	T (°C) d'hybridation
-----------------------	-----------------------------	------	-------------------	---------------------------------	-------------------------

BHV9	45	52	95	F : AAATCAACACTCTCAAAAACACAAG R : TGCTCTGCTTCGTTTGCTCA	50
BHV10	45	59	84	F : AGGAACGCTCTTACGAACTT R : AAAATACTTCGGAGGAGGGT	50
BHV24	141	45	97	F : ATTCCTGAGACCTTAGTGATT R : GGTGATAAAGCATTCCATAA	50
BHV25	144	38	97	F : GGGAAAGCGAGTATTGAG R : CCCACTCTTTTGTATCTTC	50
BHV26	146	51	96	F : CCCACAAAAGAAATAATC R : TGCTGATAGTGCGGTTTTC	53

U.B. : Unité de Base

Le programme de la PCR a été adapté en fonction de l'amorce utilisée. La température d'hybridation était de 53°C pour le BHV26 et de 50°C pour les BHV9, BHV10, BHV24 et BHV25 (Tableau 13).

Tableau 13 : Programme d'amplification

Température(°C)	Temps(sec)	Répétition
94	300	1X
94	30	34X
50 ou 53	30	34X
72	120	34X
72	600	1X
11	Infini	-

Mix de PCR et réactifs

Les réactions de PCR ont été réalisées sous un volume de 25 µL en présence de 5 µL de lysat. Les caractéristiques du protocole sont détaillées dans le tableau 14. La taq polymérase employée est la Taq polymérase Pfx (Invitrogen, California, USA) fournie dans un kit avec les autres réactifs nécessaires.

Tableau 14 :Composition du mélange réactionnel

Réactif	Volume pour un tube (µl)
PfxAmplification Buffer 10X	2.5
Mélange de dNTP à 10 mM	1
MgSO ₄ à 50 mM	0.5
PCR enhancer 10X	2.5
Amorce BHV- F à 10µmol/L	2
Amorce BHV- R à 10µmol/L	2
Platinum® PfxDNA Polymerase	0.4
Eau stérile	9.1
ADN	5

Electrophorèse en gel d'agarose

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose de 1.5 % en tampon TBE (Tris-Borate-EDTA 10X, Lonza, Belgique) dans une grande cuve (30cm x 22cm, Apelex, Model MPH). Les dépôts sont effectués de façon à assurer une alternance entre les marqueurs (100 Pb et 1 kb), les souches à analyser et le témoin positif (H1 : Houston-génotype I ou B2 : Berlin-génotype II) pour faciliter la lecture de la taille des bandes.

Calcul du nombre d'unités de base présentes pour les cinq principaux VNTR de chaque souche typée

La taille des bandes sur le gel a été estimée en se référant aux échelles de poids moléculaire et à la bande correspondant à la taille du témoin positif utilisé. La taille des allèles est convertie en nombre de motifs (copies) selon la formule suivante:

$$\text{Nombre de copies} = (\text{taille de la bande} - \Delta) / \text{taille de l'unité de base}$$

Avec :

Δ : valeur correspondant à la taille des extrémités flanquantes du VNTR (calculée à partir du génome de la souche de référence H1) ;

Taille de l'unité de base : taille du motif (Tableau 15).

Tableau 15 : Taille de l'unité de base de chaque BHV et la valeur Δ correspondante

Désignation du BHV	Taille de l'U.B. (pb)	Δ (pb)
BHV9	45	291
BHV10	45	136
BHV24	141	140
BHV25	144	232

BHV26	146	89
-------	-----	----

2.1.4.2.3. Typage par la technique MLST

Douze souches de *Bartonellahenselae* isolées à partir des chats # 71, 88 et 92 ont été sélectionnées pour comparer le polymorphisme observé par MLVA et celui obtenu par MLST. Ces chats hébergeaient individuellement des souches présentant une grande variabilité génétique par le génotypage ARNr 16S et par la technique MLVA.

Amorces et programmes

Sept gènes (batR, ftsz, gltA, groEL, nplD, rpoB et ribC) ont été partiellement amplifiés selon l'étude d'Iredellet *al.* (Iredellet *al.*, 2003). Les caractéristiques des amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 16.

Tableau 16 : Caractéristiques des amorces utilisées la technique MLST
(adapté d'Iredellet *al.*, 2003)

Locus	Séquence des amorces		Site de polymorphisme	Nombre d'allèle
	5'	→ 3'		
batR	F GACCGCAATATTTTGACATC R GCATCCATCAAAGCATCACGACTT		A2 : T302C A3 : C65T, C68A, A218G, T302C A4 : C65T, A218G, T302C	4
ftsZ	F GCCTTCTCATCCTCAACTTC R CTTTGTTTTAAACGCTGCC		A2 : A1185T, G1404A, G1467T A3 : A1185T, G1467T, C1537T	4
gltA	F GGGGACCAGCTCATGGTGG R AATGCAAAAAGAACAGTAAACA		A2 : G648A, C1026T	2
groEL	F GTTGATGATGCCTTGAAC R TGGTGTGTCTTTCTTTGG		A2 : G1343A	2
npID	F GGCGCTGGTATGATACAA R GACATCTGTGCGGAAGAA		A2 : G1353A	2
rpoB	F CGTGACGTACATCCTACA R AACAGCAGCTCCTGAATC		A2 : G1779A A3 : C1733T, G1779A A4 : G711758A	4
ribC	F AGCGAGGATCAAAACAAC R GCTCTTCAACACAATTAACG		A2 : A1310G, G1360, A1494G, G1499A	2

Le programme d'amplification comporte 35 cycles (Iredellet *al.*, 2000). Les étapes sont décrites dans le tableau 17.

Tableau 17 : Programme d'amplification

Température(°C)	Temps(sec)	Répétition
-----------------	------------	------------

95	300	1X
95	60	35X
55	60	35X
72	50	35X
72	600	1X
11	Infini	-

Mix de PCR et réactifs

Les réactions de PCR ont été réalisées sous un volume de 25 µL en présence de 5 µL de lysat. Les caractéristiques du protocole sont détaillées dans le tableau 13. La Taq polymérase employée est la Takara (Takara Bio inc, Japon). Le mélange réactionnel est identique à celui présenté dans le tableau 18.

Tableau 18 :Composition du mélange réactionnel

Réactif	Volume pour un tube (µL)
1× NH ₄ buffer (Bioline)	2.5
Mélange de dNTP200 µM	1
PCR enhancer 10X	2.5
Amorce BHV- F à 200 nM	2
Amorce BHV- R à 200 nM	2
Taq polymérase ExTaqTaKaRa ® à 5 unités/µL	0.15
Eau stérile	9.1
ADN	5

Séquençage et analyse bioinformatique des séquences

Les amplicons obtenus après amplification des sept gènes ont ensuite été séquencés dans les deux sens par le service QIAGEN. Les séquences sens et anti-sens obtenues sont d'abord comparées. La séquence consensus est utilisée pour définir le type de la séquence

par comparaison avec les séquences types déposées sur le site <http://bhenselae.mlst.net/>. Cette comparaison a été effectuée en utilisant le logiciel Mega5.

2.1.5. Méthodes Sérologiques

2.1.5.1. Analyse sérologique par Immunofluorescence indirecte (IFI)

Après décongélation, tous les sérums ont été analysés afin de rechercher des anticorps contre *Bartonellahenselae* et *Bartonellaclarridgeiae* en utilisant des lames IF fabriquées au laboratoire (protocole de fabrication ci-dessous). Les souches utilisées pour cette fabrication sont les souches de référence : *B. henselae* H1 (Souche ATCC49882) et *B. clarridgeiae* (Souche ATCC51734).

2.1.5.2. Recherche des virus de l'immunodéficience FeLV et Fiv

Nous avons utilisé le Kit SNAP Fiv/FeLV (IDEXX Eragny, France) pour la détection d'anticorps spécifiques aux virus FeLV et Fiv à partir de sérums. Les résultats sont exprimés en fonction des témoins positifs et négatifs fournis dans le kit.

2.1.6. Outils statistiques

2.1.6.1. Analyse bivariée

Une analyse bivariée a été réalisée pour étudier l'association entre les deux co-variables (la classe d'âge et le sexe/ statut physiologique: mâle, femelle gestante, non gestante femelle) et trois variables d'intérêt : le statut bactériémique des chats, le logarithme du nombre de CFU/mL des ganglions et le nombre de profils MLVA.

2.1.6.2. Étude de similitude des profils obtenus chez un même chat "Bootstrap"

La similitude des profils observés chez un même chat a été analysée par la méthode Bootstrap. Seuls les chats présentant plus d'un profil ont été conservés. L'hypothèse nulle était que deux profils obtenus chez un même chat étaient proches de deux profils pris de différents chats.

La distance entre deux profils était le nombre de VNTR pour lesquels le nombre de répétitions n'est pas identique entre les deux profils (la distance variait entre 0 et 5). La valeur statistique de la distance moyenne entre profils d'un même chat a été calculée. Afin de déterminer si cette distance était significativement différente de celle observée dans la population, un ré-échantillonnage a été réalisé comme suit :

- Un tableau avec une ligne par chat et une colonne par profil, qui contient 0 ou 1 a été créée ;
- Une permutation aléatoire des noms de colonnes (qui représentent les identifiants des profils) a été effectuée ;
- La distance moyenne entre profils observés chez un même chat a été recalculée (ré-échantillonnage par l'étape 2) ;
- Les étapes 2 et 3 ont été répétées 1000 fois ;
- On calcule le nombre de fois où la distance moyenne obtenue à l'étape 3 est inférieure à la distance moyenne réelle. La proportion correspondante était la p-value du test.

2.1.6.3. Classification phylogénétique des profils par l'algorithme "Neighbor-Joining" et l'approche "Structure-Neighbor"

Deux méthodes de classification ont été appliquées à l'ensemble des profils MLVA: Neighbor-Joining et Structure-Neighbor. La méthode Neighbor-Joining permet d'élaborer un arbre de données phylogénétiques. La distance entre chaque profil a été calculée comme précédemment et elle correspond donc au nombre de VNTR pour lequel le nombre de répétition est différent. La robustesse des nœuds a été évaluée par la méthode de "bootstrap" sur 1000 ré-échantillonnages.

La détermination de clusters par l'approche "Structure-Neighbor" a été proposée par Hall et Salipante (2000) comme une méthode alternative aux méthodes d'analyse de groupe classiques lorsque le nombre de caractères est réduit, comme c'est souvent le cas dans les études MLVA où le nombre de VNTR testés est faible. En bref, cette méthode commence par une étape bayésienne pour déterminer le nombre le plus probable de clusters: le résultat est une table avec en ligne les profils, en colonne les clusters, et dont le contenu est la probabilité que le profil appartienne au cluster. Chaque profil a été rattaché à un cluster avec une probabilité seuil de 0.8. Les profils pour lesquels les probabilités d'appartenance aux différents clusters < 0.8 n'ont pas été classés. La distance entre deux profils à l'intérieur de

chaque cluster représente la moyenne de la valeur absolue des différences de répétitions (pour chaque VNTR).

Pour la méthode Structure-Neighbour, l'analyse des données a été effectuée à l'aide du programme R (Team, 2011) et avec un logiciel fourni par Hall et Salipante (2000).

2.1.6.4. Calcul de l'indice de diversité

Le degré de polymorphisme a été évalué en se basant sur le calcul de l'index de diversité (D) de Hunter et Gaston. Cet index permet de mesurer la probabilité que deux souches prises au hasard parmi d'autres présentent des types différents. Il tient compte du nombre d'allèle et de leur fréquence et doit avoir une valeur ≥ 0.95 pour être considéré comme discriminant. Il est défini par la formule suivante :

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j (n_j - 1)$$

où :

N: nombre de souches testées;

n_j : nombre de souches ayant l'allèle j ;

S : nombre total des allèles.

2.1.6.5. Construction d'un minimum Spanning Tree

Les profils MLVA obtenus ont été comparés puis exprimés sous la forme d'un algorithme graphique appelé MinimumSpanningTree (MST). Le MinimumSpanningTree a été calculé en utilisant la version Bionumerics logiciel 4.6 (Applied-Maths, Sont-Martens-Latem, Belgique).

2.2. ÉTUDE CHEZ LE CHIEN

2.2.1. Les populations

Au cours de cette étude, 213 chiens de la région d'Alger ont été prélevés durant la période d'avril 2008 à Juillet 2011. Les chiens sont repartis en deux catégories :

- 63 chiens de la fourrière canine d'Alger capturés dans le cadre du contrôle des populations de chiens errants. Les données relatives à la race, le sexe, l'âge (morphologie et examen de la denture) et la présence d'ectoparasites (Puces et/ou tiques) ont été relevées pour chaque chien ;
- 150 chiens de propriétaires présentés en consultation médicale aux services de Médecine et de Chirurgie à l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger. Une copie du dossier de chaque chien prélevé a été réalisée.

2.2.2. Les prélèvements

La prise de sang a été réalisée à partir de la veine céphalique, 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. Le sérum a été récolté dans des microtubes stériles puis conservés à -20°C jusqu'à l'utilisation.

2.2.3. Analyse sérologique par Immunofluorescence indirecte (IFI)

Après décongélation, tous les sérums ont été analysés afin de rechercher des anticorps contre *Bartonellavinsonii* (Souche ATCC51672) et *Bartonellahenselae* H1 (Souche ATCC49882) en utilisant des lames IF fabriquées au laboratoire (protocole de fabrication ci-dessous).

La recherche des anticorps anti-*Anaplasma phagocytophilum* et anti-*Borrelia burgdorferi* a été réalisée en utilisant des lames commerciales MegaScreenFluoanaplasma ph. et MegaScreenFluoborrelia (MegaCorDiagnostik, Autriche).

2.2.3.1. Technique de fabrication des lames de *Bartonella* (IF)

2.2.3.1.1. Culture et repiquage des cellules

Les lames ont été fabriquées à partir des cellules Véro (cellules de rein de singe vert, Sanofi-Pasteur) pour les différentes espèces de *Bartonella*. Ce protocole trouve sa source chez Chomel et ses collaborateurs (Chomelet *al.*, 1995). Les cellules sont conservées dans de l'azote liquide. La première étape a consisté à cultiver les cellules dans un milieu de culture dont la composition est indiquée dans le tableau 19.

Tableau 19 :Composition du milieu de culture pour les cellules Véro

Composant	Volume (mL)
Milieu RPMI sans glutamine (Gibco)	45
Sérum de veau fœtale 5%	2.5
L-glutamine à 2 µmol/ml, 1%	2
Pénicilline à 100 UI/ml - streptomycine à 100 µg/ml, 1%	0.5

Deux flacons de cellules de 25 mL ont été placés à l'étuve à CO₂ à 37°C. Le premier a été utilisé pour le repiquage et le second a été conservé en cas de problème de contamination. L'entretien de la culture s'effectue deux fois par semaine par repiquage après trypsination (0.05% EDTA et 0.02% de trypsine dans une solution saline, Gibco, USA) et dilution au 1/4 des cellules.

2.2.3.1.2. Protocole utilisé pour la fabrication des lames

Pour chaque série de lames, les étapes ont été les suivantes :

1^{ère} étape: un repiquage de l'espèce de *Bartonella* à tester a été réalisé. Après cinq jours de culture, une suspension bactérienne (équivalent d'une gélose) est réalisée dans 0.5 ml de solution saline. La suspension est transférée sur une culture de cellules Vero à 70% de confluence (flacon de 25 cm²).

2^{ème} étape: après 72h de culture, les cellules infectées sont trypsinées puis lavées dans 15 ml de milieu RPMI (centrifugation 200 g pendant 10 minutes) à 5% de SVF (sérum de

veau foetal). Le culot est repris dans 40 ml de milieu de culture (concentration cellulaire d'environ 10^5 cellules /ml. 40 μ l de la suspension cellulaire ont été déposées dans chaque puits de lames traitées au téflon (Menzel GmbH&Co, Allemagne) pour permettre l'adhérence de cellules. Les lames sont placées à l'étuve (5% de CO₂) pour 18h.

3^{ème} étape: les lames ont été lavées au PBS deux fois puis fixées à l'acétone pendant 20 minutes à température ambiante, séchées puis conservées au congélateur (-20°C) jusqu'à l'utilisation.

2.2.3.1.3. Validation des lames

Avant utilisation, les lames ont été observées au microscope (grossissement x150) afin de vérifier que les puits contenaient des cellules et des bactéries. Les lames ont ensuite été vérifiées avec des sérums préalablement testés. La lame était validée quand les témoins positifs et négatifs étaient valables et quand les sérums connus répondaient de la manière attendue.

2.2.3.2. Technique du screening et lecture des lames

Les sérums sont décongelés à température ambiante. Une homogénéisation au vortex est réalisée pour chaque tube avant de prélever le sérum pour effectuer la dilution. Le criblage des sérums a été réalisé à la dilution du 1/50 (10 μ L de sérum dans 490 μ L de PBS). Chaque lame de douze puits comporte un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif.

Les lames sont incubées 30 minutes à 37°C sous atmosphère humide suivi de 2 rinçages de 5 minutes dans du PBS. Le conjugué (anti-IgG de chien -Jackson immunoresearch, USA), dilué au 50^{ème}, est préparé à partir d'une solution de bleu d'Evans (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) dans du PBS (40 μ L par puits). Les lames sont de nouveau incubées à 37°C sous atmosphère humide pendant 30 minutes. Deux rinçages de 5 minutes sont ensuite effectués puis du fluoprep (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) est ajouté. La lame est recouverte d'une lamelle. Les lames ont été lues au microscope sous huile à immersion (grossissement 10x100) (Merck, Darmstadt, Allemagne) et à fluorescence.

2.2.3.3. Lecture des lames

Chaque lame est lue par deux opérateurs, de manière indépendante (lecture en double aveugle) et selon un barème prédéfini comme indiqué dans le tableau 20.

Tableau 20 :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

2.2.3.4.Titrage

Tous les sérums positifs au criblage ou screening (deux croix ou plus pour les deux lecteurs) ont été analysés en dilution pour déterminer leur titre en anticorps. Des dilutions ont été effectuées du 50^{ème} au 1600^{ème}. La méthode d'Immunofluorescence est la même que précédemment décrite.

2.2.4 Outils statistiques

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel *Stata* (version 12). Tout d'abord, nous avons établi les valeurs de fréquence et de prévalence. La différence entre les variables a été testée à l'aide du test chi-deux. Nous avons choisi comme variable: l'âge, le sexe, la race, le type de chien, l'état de santé du chien. La différence a été considérée comme significative si $p < 0.05$.

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

1. ÉTUDE LA DIVERSITÉ DES SOUCHES DE *B. HENSELAE* CHEZ LE CHAT

1.1. DESCRIPTION DE LA POPULATION FÉLINE ÉTUDIÉE

282 chats sont inclus dans cette étude. Tous sont de race européenne et leur statut médical est inconnu. L'âge moyen des chats est de 18 mois, avec une fourchette de 8 à 36 mois. L'échantillon comprend 91 male et 191 femelles dont 76 gestantes (Tableau 21).

Parmi les chattes gestantes, 56 (73.7%) sont à un stade de gestation $\geq$ à 4 semaines et 20 (26.3%) à un stade $<$ 4 semaines. La moyenne du nombre d'ampoule fœtale est de 5 avec une fourchette de 1 à 8 ampoules.

Tableau 21: Distribution de *Bartonellahenselae* chez la population féline étudiée

Paramètres	Nombre total des chats (%)	Nombre de chats bactériémique (%)
Sexe		
Male	84 (33.3)	17 (6.7)
Femelle	168 (66.6)	22 (8.7)
Gestante	65	7
Non gestante	103	15
Age (mois)		
<12	12 (4.7)	4 (1.6)

12-17	116 (46.03)	25 (9.9)
18-23	42 (16.6)	4 (1.6)
24-35	66 (26.19)	6 (2.3)
>=36	16 (6.3)	0
Total	252	39 (15.4)

Concernant les chattes gestantes, la moyenne d'âge observée est de 12.85 mois (IC95% 10.75-14.95) et 18 mois (IC95%15.64-20.39) pour les bactériémiques et non bactériémiques respectivement.

1.2. RÉSULTATS DE LA CULTURE

1.2.1. Hémoculture

Après ensemencement sur gélose au sang de lapin, 39 (15.4%) des 282 échantillons sanguins ont abouti après 2 à 4 semaines au développement de colonies. Parmi, les 282 échantillons ensemencés, 15 (5%) ont été contaminés et éliminés. La charge bactériémique varie de 1 à plus de 1500 CFU/ml de sang.

Les colonies obtenues possèdent les caractéristiques morphologiques de *Bartonella*. Par ailleurs, la coloration de Gram effectuée sur les colonies repiquées montre une morphologie de petit bacille Gram négatif. La PCR ITS16S-23S (voir plus loin) confirme l'identification au genre *Bartonella*.

Une collection de 259 souches a été ainsi obtenue à partir de 30 chats bactériémiques. Des souches isolées de 9 chats sur le total de 39 chats bactériémiques ont été perdues au cours du repiquage.

1.2.2. Culture des embryons

Un total de 24 embryons ou contenus d'ampoules fœtales issus de chattes bactériémiques et non bactériémiques ont été ensemencés. Aucun de ces ensemencements n'a abouti à l'isolement de bartonelles.

1.3. CARACTÉRISATION DES SOUCHES

1.3.1. Identification et typage moléculaire

1.3.1.1. Amplification par PCR ITS 16S-23S

L'analyse par PCR ITS 16S-23S des 259 souches isolées a permis d'obtenir une amplification. La taille des fragments amplifiés (174 Pb) correspond à l'espèce *Bartonellahenselae* (Figure 12). Aucune amplification obtenue ne correspond à *B. clarridgeiae* (156 Pb).



Figure 12 : Résultat de la migration des produits d'amplification de la PCR ITS 16S-23S de 6 souches

1.3.1.2. Résultats du typage et de l'étude de la diversité des souches de *B. henselae*

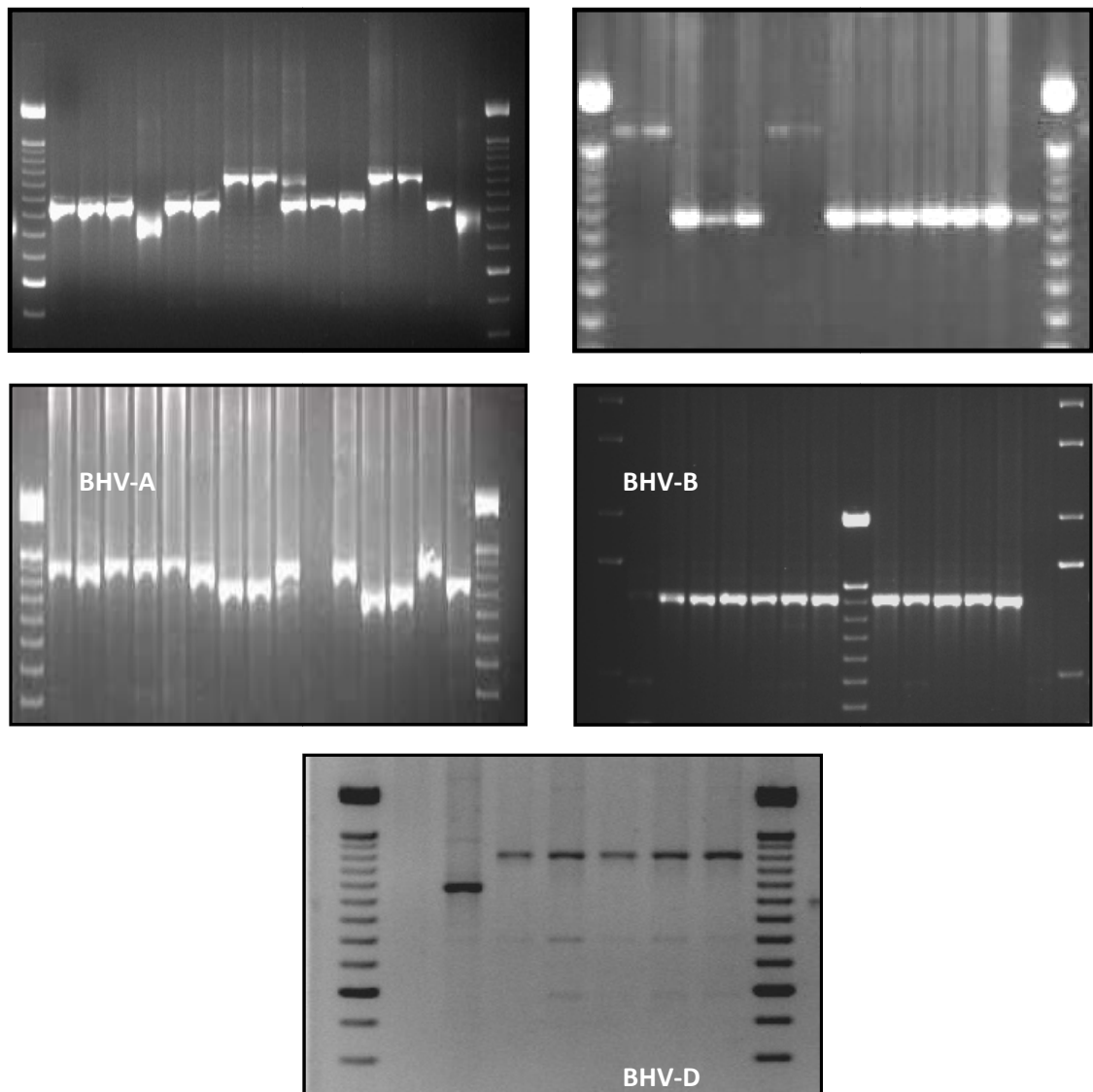
1.3.1.2.1. Diversité en fonction du génotype 16S rDNA

L'amplification de la séquence codant pour l'ARN16S révèle que 14 chats sont porteurs uniquement de souches de génotype I (46.7%), 10 chats uniquement de souches de génotype II (33.33%) et 6 de souches de génotype I et II (20%). Dans le dernier groupe une souche du génotype III (I/II) est isolée d'un chat et les 5 autres chats présentent une co-infection par les génotypes I et II.

1.3.1.2.2. Diversité en fonction des BHV

A-Étude globale de la diversité

Un exemple des résultats obtenus avec les 5 VNTR est présenté dans la figure 13. L'analyse globale des 5 VNTR pour les 259 souches montre que les BHV-A (9 allèles) et BHV-B (12 allèles) sont les plus polymorphes suivis des BHV-C (12 allèles), BHV-D (3 allèles) et BHV-E (3 allèles) (Figure 13).



BHV-E

Figure 13 : Résultats de la migration d'amplifiats obtenus pour chaque BHV

L'amplification de l'ADN obtenu des 259 souches testées par les 5 BHVs (A à E) révèle 52 profils différents (Tableau 22). Parmi ces profils, 25 correspondent à des souches de génotype I (49%), 26 au génotype II (ratio du génotype I/II=25/26) et 1 au génotype I/II. Il n'y a pas de profils communs aux trois génotypes. L'index de diversité de Hunter et Gaston calculé pour l'ensemble des 5 BHV est de 0,95. Il est de 0,90 pour les souches de génotype I et de 0,94 pour les souches de génotype II. La lecture du tableau 22 fait ressortir que certains profils sont plus souvent retrouvés dans notre population, en particulier les profils 9.20.10.8.2 (41 fois) et 8.20.10.8.2 (21 fois).

Tableau 22 : Description des 52 profils alléliques et répartition par chats et par génotype ARNr16S

Profil allélique	Nombre de profil MLVA	16S rRNA génotype	Numéros de chats
7.10.10.8.2	1	I	88
7.20.8.8.2	1	I	81
7.20.10.8.2	2	I	88
7.34.10.7.3	1	I	138
8.20.8.8.2	6	I	81
8.20.10.8.2	21	I	134, 92, 204
8.34.10.7.3	4	I	138
9.17.6.7.3	1	II	267
9.18.5.7.4	15	II	51, 88, 247

9.18.6.7.3	4	II	267
9.18.6.7.4	9	II	51, 142, 247
9.18.10.8.2	1	I	273
9.20.5.8.2	4	I	91
9.20.6.7.4	1	II	9
9.20.6.8.4	1	II	9
9.20.8.8.2	3	I	81
9.20.10.8.2	41	I, I/II	50, 79, 92, 127, 37, 242
9.25.5.8.4	1	II	237
9.31.10.7.3	6	I	237
9.32.10.7.3	11	I	232
9.34.10.7.3	3	I	138
10.18.5.7.4	1	II	88
10.18.6.7.3	2	II	267
10.20.6.7.4	6	II	9, 88
10.20.10.8.2	17	I	37, 71, 204, 79, 249, 92
10.24.6.8.4	1	II	92

Tableau 22 (Suite) : Description des 52 profils alléliques et répartition par chats et par génotype ARNr16S

Profil allélique	Nombre de profil MLVA	16S rRNA génotype	Numéros de chats
10.25.10.8.4	3	II	92
10.34.10.7.3	1	I	138
11.18.11.9.2	1	I	33
11.20.5.8.2	4	I	91

11.20.6.7.4	3	II	9
11.20.6.8.2	2	I	91
11.20.7.8.2	1	I	91
11.20.10.7.4	1	II	273
11.20.10.8.2	11	I	71, 134, 204
11.20.10.8.4	10	I	104
11.24.6.8.2	1	II	92
11.24.6.8.4	1	I+II	92
11.25.10.8.4	8	II	28
11.32.10.7.3	1	I	232
11.34.10.7.3	1	I	138
12.18.6.7.4	1	II	247
12.28.8.7.4	9	II	55
12.32.8.7.4	1	II	40
13.32.8.7.4	3	II	40
14.20.10.8.2	11	I	43, 127
14.26.8.7.4	4	II	71
14.27.10.7.4	1	II	67
14.32.8.7.4	6	II	40, 191
15.32.8.7.4	2	II	40

B-Étude de la diversité des souches par chat

Les résultats obtenus par chat sont indiqués dans le tableau 23.

Tableau 23 : Répartition des différentes souches et types par chat

Chat No	Nbr souches/chat	16S rDNA		Nombre d'unité de Base pour chaque BHV					Nbr de MLVA type/Chat
		I	II	A	B	C	D	E	
9	10	0	10	9, 10, 11	20	6	7,8	4	4
28	8	0	8	11	25	10	8	4	1
33	9	1	8	11	18	5, 6, 11	7, 9	2, 4	3
37	11	11	0	9, 10	20	10	8	2	2
40	9	0	9	12, 13, 14, 15	32	8	7	4	4
43	10	10	0	14	20	10	8	2	1
50	10	10	0	9	20	10	8	2	1
51	5	0	5	9	18	5,6	7	4	2
55	9	0	9	12	28	8	7	4	1
67	1	0	1	14	27	10	7	4	1
71	14	10	4	10, 11, 14	20, 26	8, 10	7, 8	2, 4	3
79	10	10	0	9, 10	20	10	8	2	2
81	10	10	0	7, 8, 9	20	8	8	2	3

88	8	4	4	7, 9, 10	10, 18, 20	5, 6, 10	7, 8	2, 4	5
91	11	11	0	9, 11	20	5, 6, 7	8	2	4
92	10	4*	6	8, 9, 10, 11	20, 24, 25	6, 10	8	2, 4	6
104	10	10	0	11	20	10	7	4	1
127	2	2	0	9, 14	20	10	8	2	2
134	10	10	0	8, 11	20	10	8	2	2
138	10	10	0	7, 8, 9, 10, 11	34	10	7	3	5
142	5	0	5	9	18	6	7	4	1
191	3	0	3	14	32	8	7	4	1
204	14	14	0	8, 10, 11	20	10	8	2	3
232	12	12	0	9, 11	32	10	7	3	2
237	7	6	1	9	25.31	5, 10	7, 8	3, 4	2
242	12	12	0	9	20	10	8	2	1
247	12	0	12	9, 12	18	5, 6	7	4	3
249	8	8	0	10	20	10	8	2	1
267	7	0	7	9, 10	17, 18	6	7	3	3
273	2	1	1	9	18, 20	10	7, 8	2, 4	2

Total:30	259	166	93	-	-	-	-	-	72
-----------------	------------	------------	-----------	---	---	---	---	---	-----------

Deux populations de chats émergent de ces résultats :

- 10 chats ne sont infectés que par un seul profil MLVA ;
- 20 chats sont infectés par plus d'un profil. Dans ce cas, le nombre de profil hébergé par chat varie de 2 à 6.

C-Comparaison avec les Types MLVA obtenus pour des souches provenant d'autres régions du monde :

L'existence d'articles publiés sur des souches de *B. henselae* isolées de chats provenant de différents pays permet de comparer ces résultats avec ceux obtenus pour les souches algériennes. La plupart des profils algériens sont nouveaux (48/52, 92.3%), seul 4 sont communs aux profils observés dans d'autres pays. Le tableau 24 présente le nombre de répétition par BHV obtenu avec les souches de différentes régions du monde ainsi que la proportion des génotypes ARN16S.

Tableau 24 : Comparaison des génotypes ARN 16S et du nombre de répétition pour les 5 BHV entre souches algériennes et souches du reste du monde

	Nombre de profils MLVA	Génotype I	Génotype II	Proportion I/II	Moyenne de répétition BHV-A	BHV-A sd	BHV-A min	BHV-A max
Algérie	51	25	26	0.49	10.24	1.91	7	15
Asie	23	20	3	0.87	13.13	1.98	9	16
Europe	56	8	48	0.14	11.52	2.11	9	15
	Moyenne de répétition BHV-B	BHV-B sd	BHV-B min	BHV-B max	Moyenne de répétition BHV-C	BHV-C sd	BHV-C min	BHV-C max
Algérie	23.22	6.07	10	34	8.00	2.00	5	11
Asie	23.17	9.48	6	37	10.48	5.79	1	20
Europe	16.11	6.57	6	33	5.00	3.76	2	18
	Moyenne de répétition	BHV-D sd	BHV-D min	BHV-D max	Moyenne de répétition	BHV-E sd	BHV-E min	BHV-E max

	BHV-D				BHV-E			
Algérie	7.47	0.54	7	9	3.12	0.89	2	4
Asie	5.65	3.27	1	9	2.52	0.67	1	3
Europe	3.84	2.88	1	12	2.61	1.52	1	6

Les pourcentages et les ratios pour les génotypes 16S des 51 profils indiqués dans le tableau montrent que les souches algériennes (49%, 25/26) sont intermédiaires entre les souches asiatiques (87%, 20/3) et les souches européennes (14%, 8/48). De plus, la proportion algérienne du génotype I vs génotype II est significativement différente aux autres régions du monde (test de Fisher's exact, $p < 0.0001$). L'intervalle du nombre de répétition du BHV-A est similaire à celui observé en Asie et en Europe. À l'inverse, l'intervalle et la déviation standard du nombre de répétitions des BHV-B, BHV-C, BHV-D et BHV-E sont proches de ceux observés en Asie et en Europe. Dans une étude antérieure, il a été montré que les BHV-C et BHV-E peuvent avoir un intérêt comme marqueurs d'origine géographique. La comparaison des allèles dominants pour ces deux BHV chez les souches des différentes régions est présentée dans le tableau 25.

Tableau 25 : Répartition des allèles majoritaires des BHV-C et BHV-E dans les différentes populations étudiées

Allèle dominante	Europe	Amérique du Nord	Asie	Australie/NZ	Algérie	
		Est	Ouest			
BHV-C	2 ou 6			10		
	(74-83%)	2 ou 6	10 ou 2	(60-100%)	10	10 ou 6
	10	(58%)	(64%)	2 ou 6	(83%)	(72%)
	(0-8%)			(0-15%)		
BHV-E	1 ou 4			3 ou 2		
	(71-100%)	1 ou 4	1 ou 4	(80-100%)	10	2 ou 4 ou 3
	3 or 2	(58%)	(77%)	1 or 4	(83%)	(100%)
	(0-12%)			(0-20%)		

Dans le cas des BHV-C et BVH-E, toutes les allèles (2, 6 & 10 pour BHV-C et 2, 3 & 4 pour BHV-E), à l'exception d'une seule (allèle 1 pour BHV-E), précédemment identifiées chez *B. henselae* de

différentes régions du monde (par exemple allèles 2 & 6 for BHV-C en Europe vs allèle 10 en Asie; allèle 4 pour BHV-E en Europe vs allèles 2 & 3 en Asie) sont également présentes dans notre population de souches.

1.3.1.2.2. Typage par la technique MLST

L'analyse de la variabilité génétique des 12 souches isolées des chats n° 71, 88 et 92 par la technique MLST permet d'identifier trois profils: ST1, ST2 et ST24. Parmi ces 12 souches, 5 sont du profil ST1, 3 du profil ST2 et 4 du profil ST24 (Tableau 26). Chaque chat héberge deux profils ST.

Tableau 26 : Typage MLST des 12 souches de *B.henselae*

Profile allèlique (BHV-A.-B.-C.-D.-E)	Type de séquence
Chat#71	
11.20.10.8.2	ST1
14.26.8.7.4	ST5
10.20.10.8.2	ST1
Chat #88	
9.18.5.7.4	ST5
10.18.5.7.4	ST5
7.20.10.8.2	ST1
Chat#92	
11.24.6.8.2	ST24
8.20.10.8.2	ST1
10.25.10.8.4	ST24
10.24.6.8.4	ST24
9.20.10.8.2	ST1
9.24.6.8.4	ST24

1.4. RESULTATS DE L'ANALYSE STATISTIQUE

1.4.1. Analyse du statut bactériémique en fonction du paramètre de la population féline étudiée

De façon significative il existe une relation entre la proportion de chats bactériémiques et l'âge (K_{i2} de tendance = 5.7518, $p = 0.01647$) (Figure 14). En revanche, il n'existe pas de corrélation entre l'âge et la charge bactérienne (test de Kruskal-Wallis, $p=0.91$).

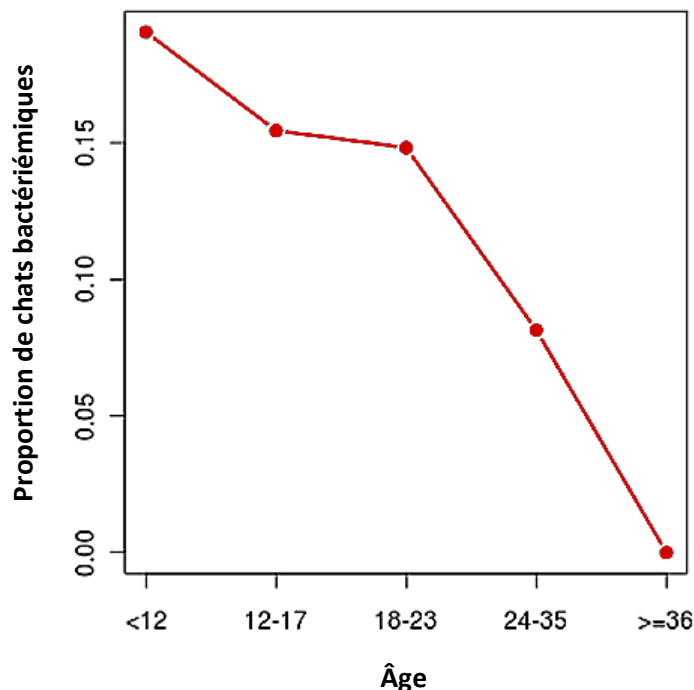


Figure 14 : Proportion des chats bactériémiques en fonction de l'âge

Le test de Fisher indique qu'il n'y a pas de relation entre la proportion de chats bactériémique et le sexe de l'animal (p -value = 0.4553). Par ailleurs, nous avons vérifié que

le statut physiologique des chattes étudiées n'influence pas la probabilité d'être bactériémique (Chi 2=0.50, $p=0.478$). De même, il n'y a pas d'association entre la charge bactérienne (CFU/ml) et le sexe/statut physiologique de l'animal (test de Kruskal-Wallis, $p=0.35$). Pour l'ensemble des chattes gestantes la différence du nombre d'ampoules fœtales entre chattes bactériémiques et non bactériémiques n'est pas significative (test de Student=0.33 et $p=0.744$).

1.4.2. Analyse statistique concernant les profils des souches isolées

Le nombre de profil obtenu chez un chat donné augmente significativement avec l'âge (test de Kruskal-Wallis: $p = 0.02$). Ainsi, la moyenne du nombre de profil est de 1 chez les chats de moins d'un an et de 3.2 chez les chats de 24-35 mois. Cependant, Il n'y a pas d'association entre le nombre de profils et le sexe/statut physiologique des chats (test de Kruskal-Wallis rank: $p = 0.93$).

1.4.3. Résultats de l'Analyse par ré-échantillonnage (bootstrap)

Parmi les 30 chats analysés, 20 présentent plus d'un profil MLVA (2-6 profils). Chez ce groupe de chat, la distance moyenne entre profils d'un même chat est de 1.8. En fonction du chat, cette valeur statistique varie de 1 à 4. La valeur minimal obtenue en 10000 simulations est supérieure à 1.8, ce qui nous permet de rejeter l'hypothèse nulle ($p < 0.0001$) et de conclure par cette méthode que deux profils observés sur un même chat sont plus proches entre eux que deux profils pris au hasard. En revanche, 4 (n° 71, 88, 273 et 237) chats parmi les 20 analysés présentent une valeur de $P > 0.05$ (Tableau 27).

Tableau 27:Distance moyenne entre les profils MLVA

N° du chat	Distance moyenne entre profils MLVA	p ²
127	1.0	<0.0001
134	1.0	<0.0001
138	1.0	<0.0001
142	1.0	<0.0001
204	1.0	<0.0001
232	1.0	<0.0001
237	4.0	0.42
247	1.3	0.001
267	1.3	0.001
273	4.0	0.43
33	2.3	0.04
37	1.0	<0.0001
40	1.0	<0.0001
51	1.0	<0.0001
71	3.7	0.41
79	1.0	<0.0001
81	1.0	<0.0001
88	3.6	0.45

9	1.3	<0.0001
91	1.3	0.0001
92	2.7	0.004

1.4.4. Classification phylogénétique des profils par l'algorithme "Neighbor-Joining"

Un total de 259 souches, 52 profils VNTR et 30 chats sont les trois paramètres pris en compte dans cette étude. Le dendrogramme obtenue montre une nette séparation entre les profils du génotype I et ceux du génotype II (Figure 15). Par ailleurs, on observe aussi que les profils MLVA spécifiques à certains chat (40, 81, 91, 138, 267) se regroupent en cluster. Ces mêmes chats présentent une valeur de $p < 0.0001$ après analyse par ré-échantillonnage (Tableau 27). À l'inverse, on observe que les souches isolées spécifiquement des chats 71, 88, 237 et 273, ne sont pas groupées dans le dendrogramme. De plus ces mêmes souches appartiennent à un génotype ARN16S différent et la valeur p spécifique à chaque chats est > 0.4 après analyse par ré-échantillonnage.

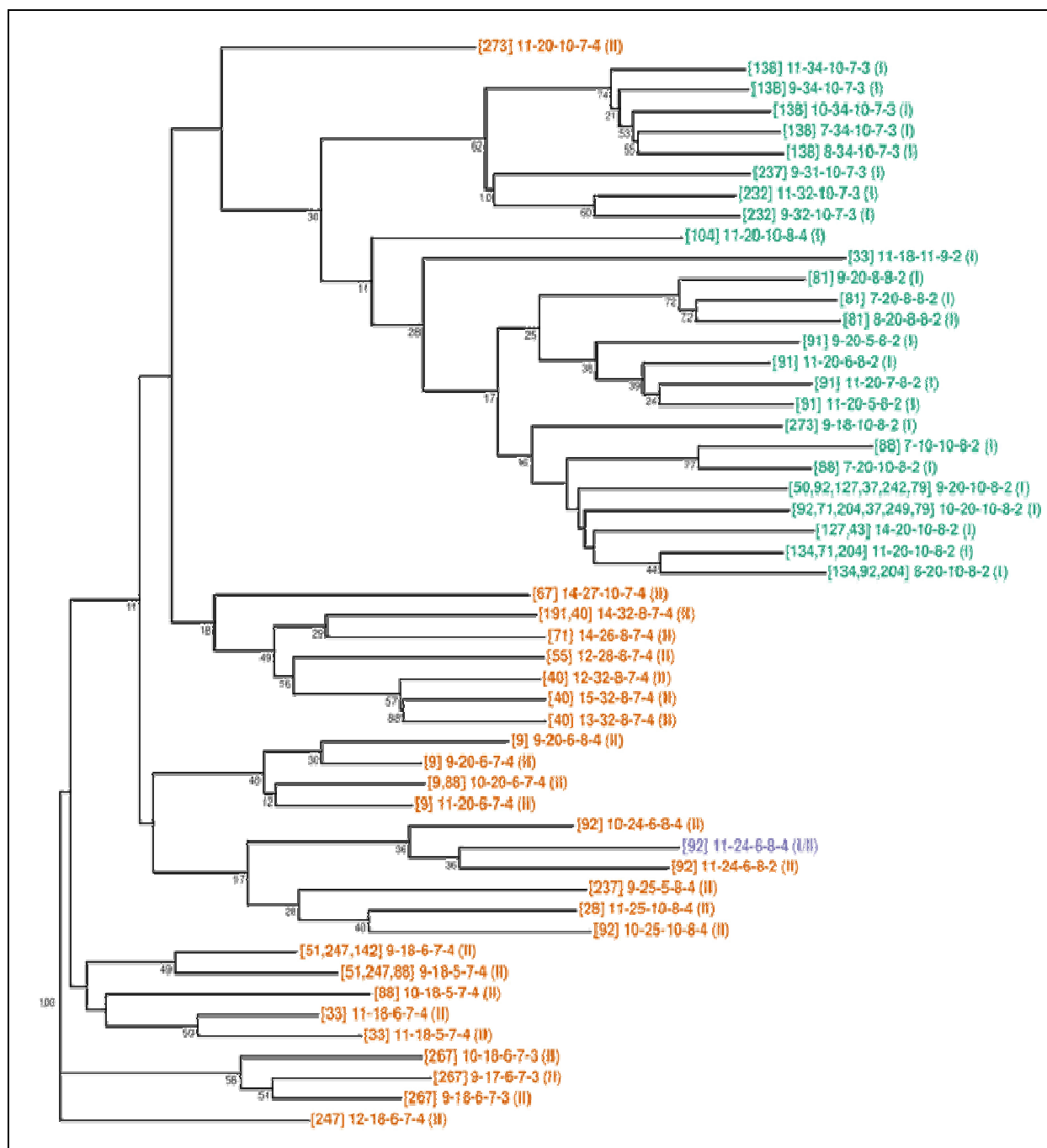


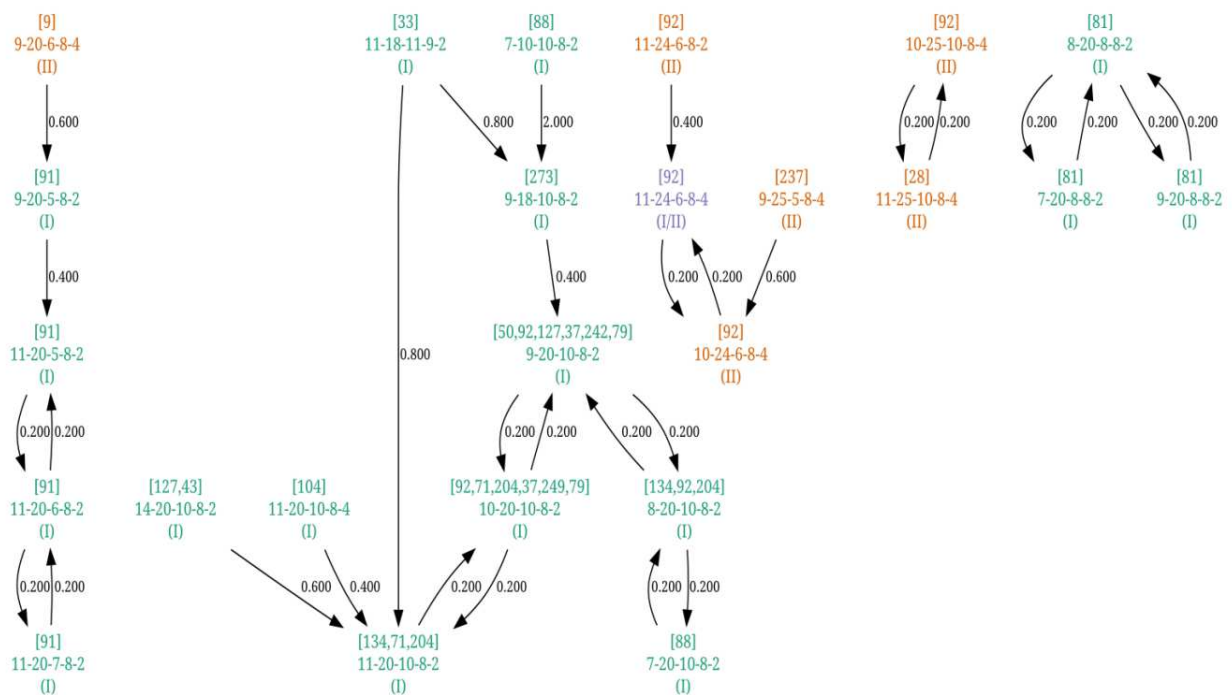
Figure 15 : Dendrogramme obtenu par la méthode "Neighbor-Joining"

1.4.5.Détermination de clusters par l'approche "Structure-Neighbor"

Deux clusters sont définis par l'approche "Structure-Neighbor" (Figure 16). 24 profils MLVA sont rattachés au cluster 1, 24 au cluster et 4 n'ont pas pu être classés.

Le diagramme indique que les génotypes I et II sont présents dans les deux groupes. Cependant, on observe que les profils des souches isolées d'un même chat sont rattachés au même groupe à l'exception des chats n° 71, 88, 237 et 273 qui hébergent des souches appartenant aux deux groupes. De plus, les profils spécifiques à chaque chat apparaissent regroupés, tels que les chats # (40, 81, 91, 138 et 267) (Figure 16). Ces résultats concordent avec ceux observés par les méthodes "Neighbor-Joining" et « Bootstrap ».

1^{er} Cluster



2^{ème} Cluster

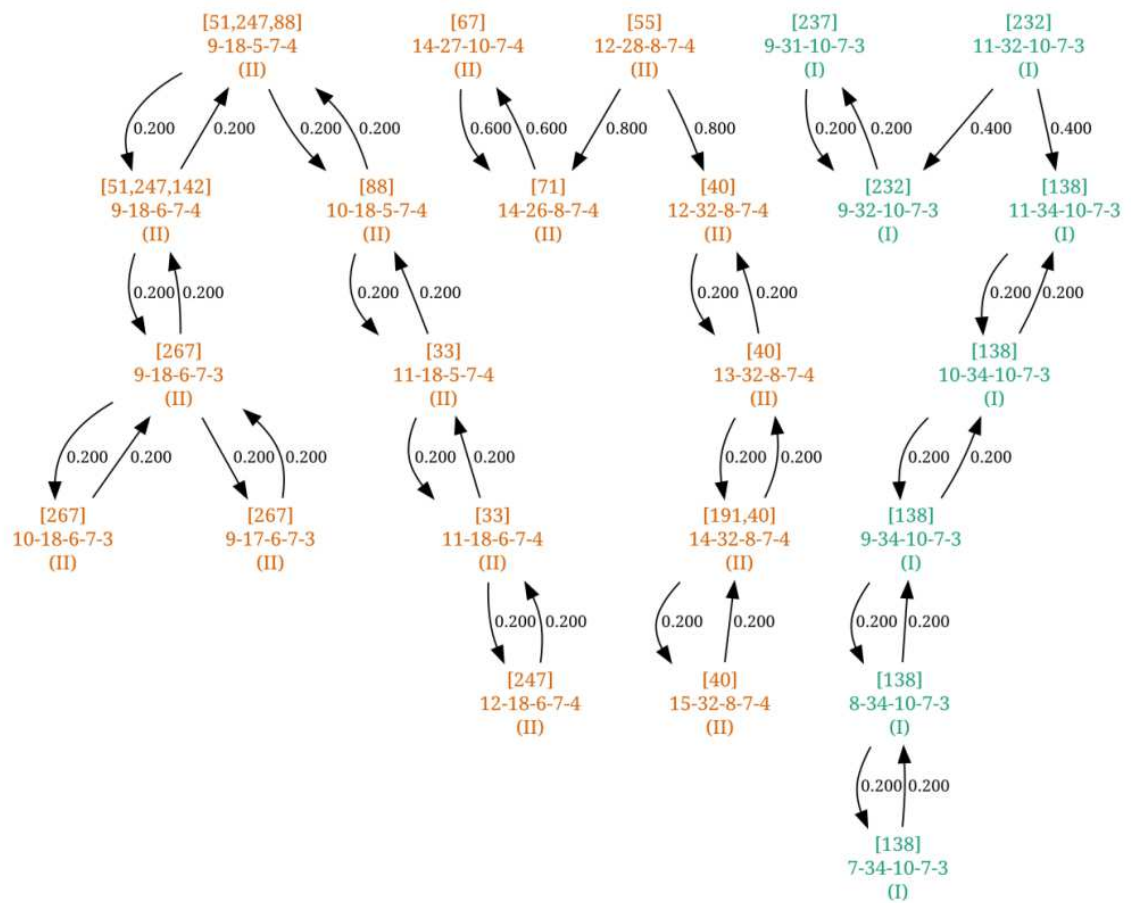


Figure 16 : Diagramme des deux clusters obtenus par la méthode "Structure-Neighbor"

1.4.6. Minimum Spanning Tree (MST)

Le Minimum Spanning Tree (MST) a confirmé que les souches algériennes formaient un groupe assez homogène au centre de l'arbre. Chaque cercle représente un génotype unique. Le diamètre des cercles correspond au nombre de souches présentant le même génotype MLVA. L'aspect des lignes de raccordement correspond au nombre de différence dans les marqueurs VNTR. Ainsi, les lignes épaisses raccordent des génotypes qui diffèrent par un seul VNTR, les lignes régulières par deux VNTR et les lignes interrompues par trois VNTR. La longueur de chaque branche est proportionnelle au nombre de différences (Figure 17).

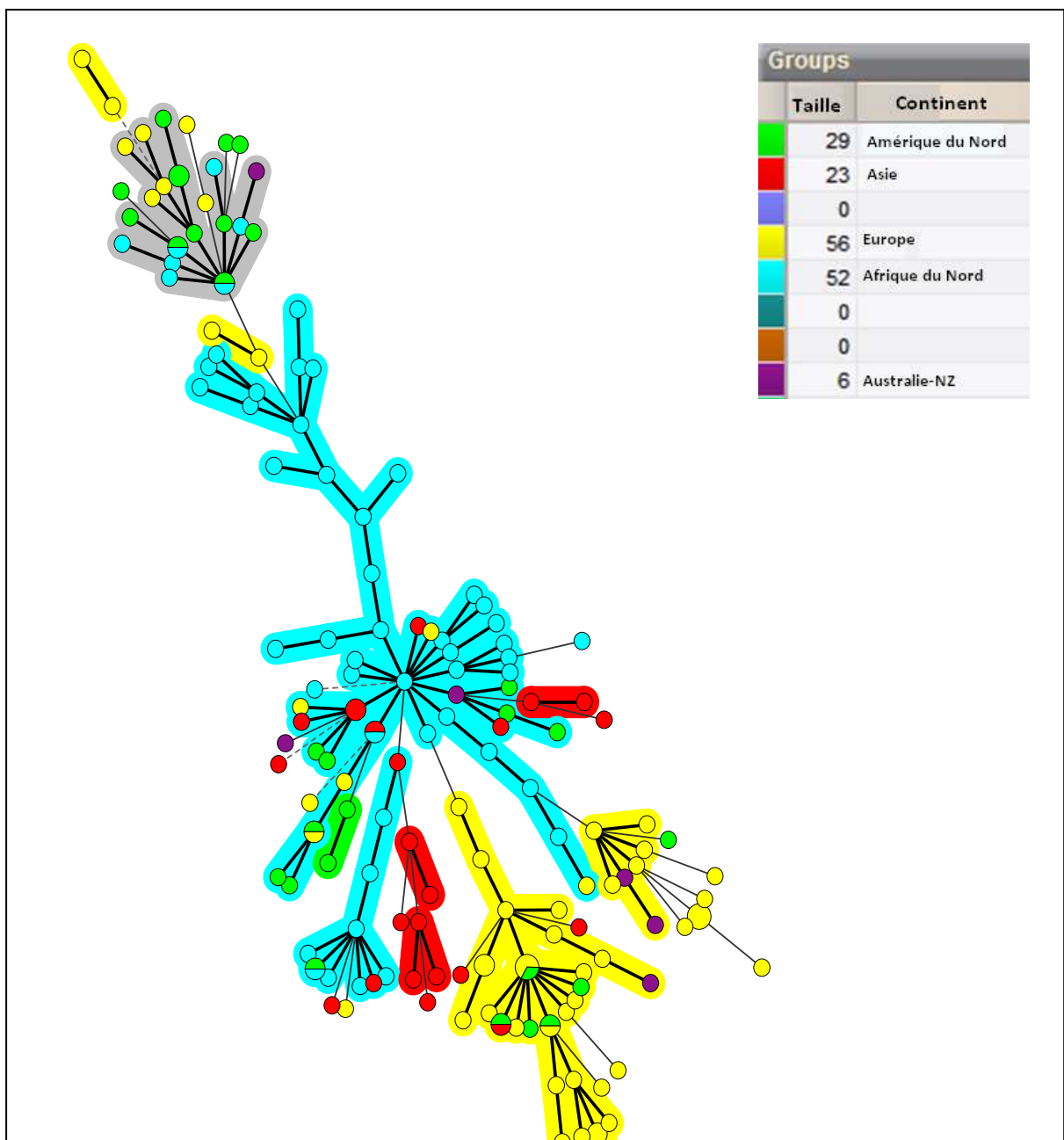


Figure 17 : Minimum Spanning Tree (MST)

2.ÉTUDE SÉROLOGIQUE

2.1. CHEZ LE CHAT

2.1.1.Immunofluorescence Indirecte (IFI)

Les résultats de l'Immunofluorescence Indirecte présentés sont les résultats du criblage à la dilution de 1/50. Sur les 252 sérums analysés par IFI, 146 sont positifs pour *B. henselae* et 191 à *B. clarridgeiae*. Ce qui donne une séroprévalence de 57.9% (51.76-63.78 IC 95%) et 75.8%(70.4-80.67 IC 95%) respectivement. L'analyse de la comparaison de l'état

bactériémique et de la séropositivité pour chacun des deux antigènes (*B.henselae* et *B. clarridgeiae*) est présentée dans les tableaux 28 et 29.

Tableau 28 :Résultats de la sérologie à *B. henselae* par IFI

<i>B. henselae</i>	Bactériémique	Non bactériémique
Sérologie +	30	116
Sérologie -	9	97
Total	39	213

Tableau 29 : Résultats de la sérologie à *B. clarridgeiae* par IFI

<i>B. clarridgeiae</i>	Bactériémique	Non bactériémique
Sérologie +	32	159
Sérologie -	7	54
Total	39	213

Il n y a pas de concordance entre ces deux variables (pour *B. henselae* : Coefficient de kappa= 0.17 ; pour *B. clarridgeiae* : Coefficient de kappa= 0.06). Il ressort de ces tableaux que 25% environ des chats séronégatifs sont bactériémiques pour *B. henselae*. Cette proportion n'est pas retrouvée pour *B. clarridgeiae*. Par ailleurs nous avons vérifié que les pourcentages de chats séropositifs à *B. henselae* et *B. clarridgeiae* n'influencent pas sur la probabilité que les chats soit bactériémiques. Un test de Khi2 montre que la probabilité d'être séropositif à *B.henselae* est supérieure chez les chats positifs à *B.clarridgeiae*(Chi2 = 25.39 ; p<0.001) (Tableau 30).

Tableau 30 : Relation entre le statut sérologique de *B.henselae* et *B. clarridgeiae*

	<i>B.clarridgeiae</i> +	<i>B.clarridgeiae</i> -
<i>B. henselae</i> +	129	61
<i>B. henselae</i> -	61	44
Total	190	105

2.1.2. Détection de l'infection aux virus de l'immunodéficience (Fiv)et de la leucémie féline (FeLV)

Un seul chat a été détecté comme positif pour l'antigène du virus de l'immunodéficience féline (chat 242), en revanche aucun chats n'est positif pour le virus de la leucémie féline.

2.2. CHEZ LE CHIEN

L'étude chez le chien de l'infection par des bactéries transmises par des arthropodes hématophages se limite à l'étude de la séroprévalence qui pour *Borrelia burgdorferi*, est le seul paramètre accessible.

2.2.1. Description de la population canine

Au cours de l'étude, 213 chiens ont été prélevés au total dont 63 chiens de fourrière et 150 chiens de propriétaire. Parmi les chiens de propriétaire, 63 sont des chiens sains et 86 présentent des pathologies diverses, infectieuses et non infectieuses. L'échantillon comporte 67 femelles et 146 mâles soit un ratio de 2.18. Le plus jeune chien a 2 mois et le plus âgé a 10 ans (moyenne d'âge : 27.48 mois).

2.2.2. Séroprévalence pour *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi*

Pour ces deux bactéries, l'étude a été réalisée en deux étapes : une étape de criblage à la dilution du 1/50° puis pour les positifs à cette dilution, une étude en dilution. Le seuil de positivité étant fixé à deux croix d'intensité au 1/50° pour les deux antigènes. 101 (47.4%) sur un total de 213 sérums de chiens se sont révélés positifs à *Anaplasma phagocytophilum* et 80 (37.5%) se sont révélés positifs à *Borrelia burgdorferi*. Les sérums issus du criblage sont confirmés et titrés pour les espèces *A. phagocytophilum* et *B. burgdorferi*. Les pourcentages de positivité et les titres sérologiques sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau 31 : Répartition des effectifs par titre pour les deux antigènes

Agent bactérien	Nombre de positifs	%(IC95%)	50	100	200	400	800	1600
<i>A. phagocytophilum</i>	101	47.42 (40.71-54.14)	27	12	16	6	17	23
<i>B. burgdorferi</i>	80	37.56 (31.32-44.23)	55	13	8	4	0	0

Les titres se répartissent différemment selon les antigènes. Pour *A. phagocytophilum* 23 sérums atteignent le titre de 1/1600. Seuls quatre sérums présentent un titre maximum d'1/400° pour *B. burgdorferi*. Par ailleurs, d'importantes différences selon l'origine des chiens sont observées (Tableau 32). La séroprévalence était de 37.3% chez les chiens de propriétaires et 71.4%

chez les chiens de fourrière pour *A. phagocytophilum*, de 30% et 55.5% pour *B. burgdorferi*.

Tableau 32:Séroprévalence à *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *B. henselae* et *B. vinsoni*iberkhoffii en fonction de l'âge, du sexe, de la race et de l'état de santé des chiens étudiés

	Nombre de chien positif(%)							
	<i>A. phagocytophilum</i> (A)		<i>B. burgdorferi</i> (B)		<i>B. vinsoni</i> iberkhoffii (BVK)		<i>C. henselae</i> (BH)	
	V	95%IC	V	95%IC	V	95%IC	V	95%IC
Nb de positif	101 (47.42)	40.81-54.11	80 (37.56)	31.32-44.23	61 (28.64)	22.98-33.05	76 (35.68)	29.55-42.32
Sexe								
Male (<i>n</i> =146)	72 (49.31)	41.32-57.34	21 (14.38)	09.60-20.99	22 (15.07)	10.16-21.77	13 (8.90)	05.27-14.64
Femelle (<i>n</i> =67)	29 (43.28)	32.10-55.20	59 (88.06)	78.16-93.83	39(58.21)	46.26-69.26	63 (94.03)	85.63-97.66
Race								
c1 (<i>n</i> =99)	41 (41.41)	32.20-51.27	38 (38. 38)	29.40-48.23	33 (33.33)	24.82-43.09	28 (28.28)	20.35-37.84
c2 (<i>n</i> =47)	34 (72.34)	58.24-83.07	27 (57.45)	43.28-70.49	11 (23.40)	13.60-37.23	23 (48.94)	35.27-62.76
c3 (<i>n</i> =30)	8 (26.67)	14.18-44.45	6 (20.00)	09.50-37.31	8 (26.68)	14.18-44.45	9 (30.00)	16.67-47.88
c4 (<i>n</i> =13)	6 (46.15)	23.20-70.86	4 (30.77)	12.68-57.64	5 (38.46)	17.70-64.48	8 (61.54)	35.52-82.30
c5 (<i>n</i> =24)	12 (50.00)	31.42-68.58	5 (20.83)	09.24-40.48	4 (16.67)	06.67-35.86	8 (33.33)	17.97-53.30

Âge								
≤12 (<i>n</i> =105)	36 (34.29)	25.90-43.78	30 (28.57)	20.80-37.85	29 (27.62)	19.97-36.85	28 (26.67)	19.14-35.84
13-36 (<i>n</i> =67)	45 (67.16)	55.25-77.21	33 (49.2)	37.65-60.94	20 (29.8)	20.23-41.66	30 (44.76)	33.47-56.65
>36 (<i>n</i> =41)	20 (48.78)	34.25-63.52	17 (41.46)	27.75-56.64	12 (29.27)	17.60-44.48	18 (43.90)	29.88-58.96
Origine								
Chien de fourrière (<i>n</i> =63)	45 (71.43)	59.29-81.10	35 (55.56)	43.31-67.16	15 (23.81)	14.99-35.64	32 (50.79)	38.76-62.74
Chien de propriétaire (<i>n</i> =150)	56 (37.33)	29.99-45.30	45 (30.00)	23.24-37.76	46 (30.67)	23.84-38.46	44 (29.33)	22.63-37.07
Sains (<i>n</i> =64)	19 (29.69)	19.90-41.78	17 (26.56)	17.29-38.49	21 (32.81)	22.57-45.01	17 (26.56)	17.29-38.49
Malade (<i>n</i> =86)	37 (43.02)	33.07-53.57	28 (32.56)	23.58-43.03	25 (29.07)	20.53-39.40	27 (31.39)	22.56-41.83
C'1 (<i>n</i> =23)	7 (30.43)	15.60-50.87	7 (30.43)	15.60-50.87	7 (30.43)	15.60-50.87	9 (39.13)	22.15-59.22
C'2 (<i>n</i> =33)	19 (57.58)	40.80-72.77	10 (30.30)	17.37-47.34	7 (21.21)	10.67-37.76	10 (30.30)	17.37-47.34
C'3 (<i>n</i> =6)	2 (33.33)	09.67-70.01	4 (66.67)	29.99-90.33	3 (50.00)	18.76-81.24	2 (33.33)	09.67-70.01
C'4 (<i>n</i> =24)	9 (37.50)	21.15-57.30	7 (29.17)	14.91-49.17	8 (33.33)	17.97-53.30	6 (25.00)	11.99-44.90

2.2.3. Séroprévalence pour *Bartonellavinsoniiberkhoffii* et *Bartonellahenselae*

Pour ces deux espèces, seule la séroprévalence sur un criblage à la dilution de 1/50 a été analysée. Les pourcentages de séropositifs sont de 28.6% (61/213) pour *B. vinsoniiberkhoffii*(BVK)et 35.7% (76/213) pour *B. henselae*(BH).Ces pourcentage sont inférieurs à ceux observés pour *A. phagocytophilum* (A) et *B. burgdorferi*(B).Les mêmes différences selon l'origine des chiens sont observés (Tableau 32).Pour *B.henselae* la séroprévalence était respectivement de 30.7% et 23.8% pour *B. vinsoniiberkhoffii* et de 29.3%et 50.8% pour *B. henselae*.

2.2.4. Cas des co-infections

Le nombre de chiens séropositifs pour deux agents infectieux ou pour les quatre agents est présenté dans le tableau 33. Ce nombre varie de 35 à 53 % pour les associations deux à deux. Onze chiens sont séropositifs pour les 4 agents.

2.2.5. Étude des facteurs de risque

La question que nous nous sommes posées était de savoir quels étaient les facteurs qui influençaient positivement ou négativement la séroprévalence. Les facteurs considérés sont les suivants : l'âge, la race, le sexe et l'état général du chien.

2.2.5.1. L'âge

213 chiens ont servi pour étudier l'effet de l'âge en fonction de la séroprévalence à *B. burgdorferi*, à *Anaplasmaphagocytophilum*, à *Bartonellavinsoniiberkhoffii* et à *Bartonellahenselae*. Les chiens ont été répartis en trois classes : ≤ 12 mois (49.2%) ; 13-36 mois (31.4%) et >36 mois (19.2%). Les chiens de 13-36 mois semblent être les plus séropositifs aux 4 agents précédemment cités comparés aux chiens de de moins de 12 mois et ceux de plus de 36 mois. Toutefois, il semble y avoir une association significative entre la présence d'anticorps anti-*Anaplasmaphagocytophilum*, anti- *B. burgdorferi* et la classe d'âge ($P<0.01$). En revanche, il n' y a pas de différences significatives en fonction des classes d'âges ($p>0.05$) à *Bartonellavinsoniiberkhoffii*et à *Bartonellahenselae*.

2.2.5.2. Race

Les chiens ont été répartis en cinq classes : Berger Allemand et Berger Belge (C1) ; Race Locale (C2) ; Rottweiler, Pitbull et Staffordshire (C3) ; Caniche, Labrador, Dog Argentin (C4) ; Croisé (C5). Une différence significative a pu être mise en évidence entre la race et *A. phagocytophilum* ainsi que à *B. burgdorferi sensu lato* ($p < 0.01$). Cependant, il n'y a pas de différences significatives en fonction de la race ($p > 0.05$) à *Bartonellavinsoniiberkhoffii* et à *Bartonellahenselae*.

2.2.5.3. Sexe

On ne constate aucune différence significative selon le sexe que ce soit pour *A. phagocytophilum* ou *B. burgdorferi*, *Bartonellavinsoniiberkhoffii* et à *Bartonellahenselae* ($p > 0.05$).

2.2.5.4. État général

Les chiens ont été répartis en cinq classes : troubles articulaires, maladies dermatologiques, et fièvre (C'1) ; infection, piroplasmose, et leishmaniose (C'2) ; Insuffisance cardiaque et rénale (C'3) ; divers (C'4). Si on analyse les chiens selon leur état général, on ne constate pas de différence significative que ce soit pour *A. phagocytophilum* ou *B. burgdorferi*, *Bartonellavinsoniiberkhoffii* et à *Bartonellahenselae* ($p > 0.05$).

2.2.5.5. Origine

De façon intéressante, le nombre de chiens séropositifs *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi*, et à *Bartonellahenselae*, à l'exception de *Bartonellavinsoniiberkhoffii*, est plus important chez les chiens de fourrière que chez les chiens de propriétaires ($P < 0.01$).

2.2.5.6. Cas des co-infections

La probabilité d'être séropositif à deux agents infectieux ou 4 à la fois ne semble pas être significative en fonction de la race, de l'âge, du sexe de l'animal et de son état général ($p > 0.05$). Cependant, la population de chiens de fourrière est significativement différente de la population de chien de propriétaires ($p < 0.01$).

Tableau 33 : Séroprévalence des co-infections par deux et quatre agents en fonction de l'âge, du sexe, de la race et de l'état de santé des chiens étudiés

	Nombre de chien positif(%)						
	A et B		A et BVK		A et BH		B
	V	95%IC	V	95%IC	V	95%IC	V
Positif	53 (24.88)	19.55-31.10	32 (15.02)	10.84-20.44	44 (20.66)	15.76-26.60	30 (14.08)
5)	40 (27.40)	20.81-35.15	21 (14.38)	09.60-20.99	33 (22.60)	16.57-30.04	22 (15.07)
67)	13 (19.40)	11.70-30.42	11(16.42)	09.42-27.06	11 (16.42)	09.42-27.06	8 (11.94)
	24 (24.24)	16.86-33.55	17 (17.17)	11.00-25.79	13 (13.13)	07.83-21.18	17 (17.17)
	23 (48.94)	35.27-62.76	8 (17.02)	08.88-30.15	17 (36.17)	23.96-50.47	7 (14.89)
	1 (3.33)	00.59-16.68	2 (6.67)	01.84-21.33	4 (13.33)	05.30-29.69	3(10.00)
	1 (7.69)	01.37-33.32	3 (23.08)	08.17-50.26	5 (38.46)	17.70-64.48	2 (15.38)
	4 (16.67)	06.67-35.86	2 (8.33)	02.31-25.85	5 (20.83)	09.24-40.48	1 (4.17)
	20 (19.05)	12.68-27.60	11 (10.48)	05.95-17.80	12 (11.43)	06.65-18.93	13 (12.38)
	24 (35.82)	25.39-47.79	14 (20.90)	12.87-32.08	22 (32.84)	22.79-44.75	12 (17.91)
	9 (21.95)	22.00-36.71	7(17.07)	08.52-31.27	10 (24.39)	13.82-39.35	5 (12.19)
rière (n=63)	29 (46.03)	34.30-58.22	12 (19.05)	11.24-30.41	23 (36.51)	25.71-48.86	10 (15.87)
propriétaire (n=150)	24 (16.00)	10.99-22.71	20 (13.33)	08.79-19.70	21 (14.00)	09.34-20.46	20 (13.3)
	9 (14.06)	07.57-24.62	10 (15.62)	08.71-26.43	7 (10.94)	05.40-20.90	10 (1.6)
6)	15 (17.44)	10.86-26.81	10 (11.63)	06.43-20.10	14 (16.28)	09.95-25.49	10 (11.63)
	3 (13.04)	04.53-32.13	3 (13.04)	04.53-32.13	3 (13.04)	04.53-32.13	2 (8.70)

Tableau 33 (suite):Séroprévalence des co-infections par deux et quatre agents en fonction de l'âge, du sexe, de la race et de l'état de santé des chiens étudiés

	Nombre de chien positif (%)					
	B et BH		BVK et BH		A, B, BVK et BH	
	V	95%IC	V	95%IC	V	95%IC
Nb de positif	35 (16.43)	12.05-22.00	33 (15.49)	11.24-20.96	11 (05.16)	02.90-09.01
Sexe						
Male (<i>n</i> =146)	23 (15.75)	10.73-21.69	20 (13.77)	09.04-20.22	6 (4.11)	01.89-08.68
Femelle (<i>n</i> =67)	12 (17.9)		13 (19.4)		5 (7.5)	
Race						
c1 (<i>n</i> =99)	13 (13.13)	07.83-21.18	13 (13.1)	07.83-21.18	4 (04.00)	00.15-07.94
c2 (<i>n</i> =47)	14 (29.79)	18.65-43.98	8 (17.02)	08.88-30.15	5 (10.64)	04.63-22.60
c3 (<i>n</i> =30)	3 (10.06)	03.45-25.63	4 (13.33)	05.30-29.69	0 (0)	00.00-11.36
c4 (<i>n</i> =13)	3 (23.08)	08.17-50.26	4 (30.77)	12.68-57.64	1 (7.69)	01.37-33.32
c5 (<i>n</i> =24)	2 (8.33)	02.31-25.85	4 (16.67)	06.67-35.86	1 (4.17)	00.73-20.25
Age						
≤12 (<i>n</i> =105)	9 (8.57)	04.47-15.50	14 (13.33)	08.11-21.15	3 (2.86)	00.97-08.07
13-36 (<i>n</i> =67)	18 (26.87)	17.72-38.52	12 (17.91)	10.55-28.75	6 (8.95)	04.16-18.20
>36 (<i>n</i> =41)	8 (19.51)	10.23-34.02	7 (17.07)	08.52-31.27	2 (4.88)	01.34-16.14
Origine						
Chien de fourrière (<i>n</i> =63)	17 (26.98)	17.58-39.04	11 (17.46)	10.03-28.63	7 (11.11)	05.48-21.21
Chien de propriétaire (<i>n</i> =150)	18 (12.00)	07 .72-18.18	22 (14.67)	09.88-21.21	4 (2.67)	01.04-06.66
Sains (<i>n</i> =64)	8 (12.50)	06.47-22.78	10 (15.62)	08.71-26.43	2 (3.12)	00.86-10.70
Malade (<i>n</i> =86)	10 (11.63)	06.43-20.10	12 (13.95)	08.16-22.83	2 (2.33)	00.64-08.08
C'1 (<i>n</i> =23)	3 (13.04)	04.53-32.13	3 (13)	04.53-32.13	0 (0)	00.00-14.32

C'2 (n=33)	3 (9.09)	03.14-23.58	2 (6.06)	01.67-19.61	0 (0)	00.00-10.43
C'3 (n=6)	2 (33.33)	09.67-70.01	2 (33.3)	09.67-70.01	1 (16.67)	03.33-56.36
C'4 (n=24)	2 (8.33)	02.31-25.85	3 (12.50)	04.34-31.01	1 (4.17)	00.73-20.25

CHAPITRE 4: DISCUSSION

Ce travail consiste en une première exploration de l'infection chez les carnivores par des bactéries vectorisées par des arthropodes hématophages en Algérie. Les bactéries incluses dans cette étude sont considérées comme majeures en médecine vétérinaire d'une part en tant que germes pathogènes reconnus pour les carnivores domestiques et d'autre part parce que les carnivores sont considérés comme des réservoirs ou comme des sentinelles de ces agents zoonotiques. Nous avons réalisé une enquête sérologique chez les chats et les chiens de la région d'Alger puis focalisé notre attention chez le chat sur une bactérie émergente, *Bartonella*.

1. ÉTUDE SÉROLOGIQUE CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT

L'immunofluorescence indirecte a été retenue dans le cadre de cette étude sur la population canine et féline. Cette technique permet d'obtenir des résultats rapides, facilement comparables et de faible coût de revient ce qui constitue des avantages majeurs dans le cadre d'un screening sérologique. De plus cette méthode, est considérée comme la méthode de référence, car elle est très sensible et assez spécifique. Ebani *et al.*, ont montré que l'IFI avait une bonne spécificité lorsque les chats séronégatifs étaient non bactériémiques et que cette technique était utile dans les enquêtes épidémiologiques (Ebani *et al.*, 2012).

Cependant, il existe des facteurs limitant à la technique. Ainsi, la lecture des lames et l'interprétation des résultats représentent l'un de ses inconvénients. L'appréciation

de l'intensité de la fluorescence est très subjective. Si les cas extrêmes ne posent pas de problèmes, les cas litigieux sont soumis à une vérification en double voire en triple aveugle. Dans certains cas la lecture de nos lames s'est avérée difficile : la fluorescence était diffuse au niveau du cytoplasme et du noyau de la cellule.

D'autre part, le seuil de positivité convenu dans notre analyse était le 1/50ème. Selon les auteurs ayant réalisé des sérologies par immuno-fluorescence sur des chats ou des chiens, les seuils retenus pour définir un sérum comme positif sont soit le 1/50ème soit le 1/64^{ème}. Ces seuils sont donc communément admis mais cela n'empêche pas les réactions croisées. En effet, la nature de l'antigène utilisé peut influencer la spécificité de la réponse sérologique et nous devons donc s'interroger sur l'antigénicité croisée qui peut subsister au sein des groupes bactériens analysés. Effectivement, des réactions croisées entre différentes espèces de bartonelles, entre différentes espèces d'*Anaplasma* ainsi qu'entre *Borellia* et d'autres groupes de Spirochète ont été constatées et décrits dans la littérature (Parola et Raoult, 2001). L'absence de réponse immunitaire hétérologue lors d'infections successives a également été observée.

1.1. SÉROPRÉVALENCE VIS À VIS D'*ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*, DE *BORRELIA BURGDORFERI* ET DE *BARTONELLA* SPP. CHEZ LES CHIENS DE PROPRIÉTAIRE ET DE FOURRIÈRE

Dans cette partie de notre travail, nous avons à tester par IFI 213 sérums de chiens à quatre importantes bactéries hémotropes vectorisées : *B. henselae*, *B. vinsoniiiberkhoffii*, *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi*.

Le niveau de prévalence obtenue pour chaque agent bactérien était respectivement de 35.7%, 28.6%, 47.4% et 37.5%. Ainsi ces pourcentages sont comparables à ceux décrits dans la littérature (Banet *et al.*, 1998 ; Mircean *et al.*, 2012 ; Cardoso *et al.*, 2012). Cependant, nos pourcentages étaient nettement plus élevés que ceux décrits dans une étude espagnole (16.8%, 1.07%, 11.5% et 0.6%)(Solano-Gallego *et al.*, 2006).

Ce travail apporte la preuve que l'espèce *A. phagocytophilum* circule en Algérie. Les titres élevés observés chez certains chiens pour cet antigène sont difficilement explicable dans le

cadre d'une réaction croisée, qui n'est cependant pas à écarter. En revanche, la positivité observée pour *B. burgdorferi*, bien que forte dans certains cas, ne permet pas d'affirmer que l'espèce *B. burgdorferi sensu stricto* est présente en Algérie, chez les chiens. Tout au plus permet-elle de supposer qu'une des espèces du complexe *B. burgdorferi sensu lato* peut être présente.

Le pourcentage de séropositifs observés pour ces deux antigènes est étonnant au regard de ce que l'on sait de la biologie de ces bactéries. Leur vecteur principal dans les pays nord méditerranéen, commun aux deux bactéries, est la tique dure *Ixodes ricinus*. Bien que ce vecteur ait été identifié en Algérie par Dib et ses collaborateurs (Bouattour *et al.*, 2004; Dib *et al.*, 2009), il est rare dans le bassin sud méditerranéen. Par ailleurs, le pourcentage de séropositifs est significativement plus élevé chez les chiens de fourrière que chez les chiens de propriétaire. Ce fait est en faveur d'une transmission par des tiques exophiles, bien qu'il ne faille pas exclure le rôle d'éventuel traitement contre les ectoparasites chez les chiens de propriétaires dans la minoration du contact tique/animal et donc des séropositifs. Cependant, l'hypothèse d'une vectorisation de ces deux bactéries par des tiques autres qu'*Ixodes ricinus* n'est pas à exclure. On sait qu'*A. phagocytophilum* a déjà été retrouvée chez des tiques autres qu'*Ixodes*, telle que *Dermacentor*, qui est maintenant considéré comme un vecteur potentiel. (Wirtgen *et al.*, 2011).

Il existe une association significative entre une sérologie positive à *A. phagocytophilum* ou *B. burgdorferi* et l'âge des chiens. Cette association pourrait être le reflet de l'hétérogénéité de la population étudiée de par son origine (fourrière/propriétaire). Ces deux populations n'ont pas la même moyenne d'âge (22,1 mois vs 26,8 mois respectivement) ni les mêmes proportions de séropositifs (voir infra).

La présence d'anticorps anti *Bartonella* chez le chien confirme l'existence de ce genre bactérien en Algérie. Il a déjà été démontré que *B. quintana* est à l'origine d'endocardite humaine en Algérie (Benslimani, 2005) et Kernif *et al.* ont montré par PCR la présence de ce genre bactérien chez le chien. Les vecteurs de transmission de ce genre bactérien ne sont pas complètement connus. Pour *B. henselae* si la puce *Ctenocephalides felis* est sans doute le vecteur principal, d'autres vecteurs arthropodes (tiques) sont suspectés. Le vecteur principal de *B. vinsonii berkhoffii* est, quant à lui, mal connu. Chez les chiens de fourrière canine, les pourcentages de séroprévalence à *A. phagocytophilum* (71.4%), *B. burgdorferi* (55%), et *B. henselae* (50.8%) sont significativement plus importants que celle des chiens de propriétaires (37.7%, 30%, et 29.3%). Le contraire est observé pour *B. vinsonii berkhoffii* (23.8% vs 30,7%). Une récente étude roumaine a abouti aux mêmes conclusions concernant la prévalence élevée aux agents bactériens vectorisés chez les chiens de fourrière en comparaison aux chiens de propriétaires (Mirceanet *al.*, 2012).

D'autre part, nous avons trouvé dans notre étude qu'il n'y avait pas de corrélation entre une sérologie positive aux 4 agents, séparément ou en association, aux facteurs de risque race sexe et

l'état général de l'animal. Ceci va dans le même sens que certaines études similaires décrites dans la littérature (Mircean *et al.*, 2012).

1.2. SÉROPRÉVALENCE DES ESPÈCES DE *BARTONELLA* CHEZ LA POPULATION FÉLINE

Le chat joue un rôle clé dans l'épidémiologie de l'infection à *Bartonella* spp. En effet, il est considéré comme le réservoir de deux principales bactéries responsables de la maladie des griffes du chat chez l'homme : de *B. henselae* et *B. clarridgeiae* (Boulouis *et al.*, 2005). De nombreuses études de séroprévalences ont été réalisées chez le chat et des différences considérables parmi les pays et les populations de chats ont été rapportées. Cependant ce travail constituait la première étude d'envergure sur la séroprévalence vis-à-vis de *Bartonella* spp. dans des populations félines en Algérie. L'étude a porté essentiellement sur la Wilaya d'Alger.

Sur les 252 chats testés, 146 se sont montrés positifs en IFI à *B. henselae* et 191 à *B. clarridgeiae* à un titre de 1/50, ce qui correspondait à une séroprévalence de 57.9% et de 75.8% respectivement. En comparant les pourcentages obtenus à ceux rapportés dans d'autres études publiées, il ressort que la séroprévalence à *B. henselae* chez le chat est bien plus élevée qu'en Afrique du sud (21%) (Kelly *et al.*, 1996)(150), qu'en Égypte (12%)(Chids *et al.*, 1995), qu'au Zimbabwe (24%)(Kelly *et al.*, 1996), qu'en Indonésie (43%) (Marston *et al.*, 1999)(200), qu'en Thaïlande (15.8%)(Inoue *et al.*, 2009) et qu'à Taiwan (23.7%)(Chang *et al.*, 2006)(55). Par contre, elle est de l'ordre de grandeur de celle observée (62.3%) dans une **étude marseillaise (La Scola *et al.*, 2003).**

Cependant, elle est moins importante que celles observée aux USA-Caroline du Nord (75%)(Chomel *et al.*, 1995), en Pologne (86%)(Podsiadly *et al.*, 2003) et en Israël (83%)(Avidor *et al.*, 2004). Par ailleurs, la comparaison de la séroprévalence à *B. clarridgeiae* aux autres pays est plus limitée car les données disponibles sont moins nombreuses dans la littérature. Ainsi, la séroprévalence obtenue est nettement plus élevée que celle observée en France (41%)(Gurfield *et al.*, 2001), en Italie (5%)(Fabbi *et al.*, 2004)(101) et au Philippines (65%)(Chomel *et al.*, 1999).

L'étude de la séroprévalence à *B. henselae* ou *B. clarridgeiae* en fonction du statut bactériémique des chats testés a montré que les chats séropositifs n'étaient pas systématiquement bactériémiques. Cette même constatation a été faite dans d'autres études (Chomel *et al.*, 1995 ; Gurfield *et al.*, 2001 ; Guptill *et al.*, 2004). De plus, nous avons montré que la probabilité d'être

séropositif à *B. clarridgeiae* était supérieure chez les chats séropositifs à *B. henselae*. Ceci nous laisse suggérer qu'il peut s'agir d'une réaction croisée entre ces deux espèces ou encore le fait d'avoir un vecteur de transmission commun (Chomel *et al.*, 1999; Tsuneoka *et al.*, 2004). Cependant, l'existence de chats simples positifs avec soit l'un soit l'autre des deux antigènes, prouve que ces réactions croisées, si elles existent ne sont pas systématiques.

Par ailleurs, 9 (23%) parmi les 39 chats bactériémiques étaient séronégatif à *B. henselae* et 7 (18%) à *B. clarridgeiae*. Ces chats peuvent avoir été récemment infectés ou ils n'ont pas eu le temps de développer des Ig G détectables. De plus ce travail est une étude transversale et donc nous n'avons pas pu tester ces chats une seconde fois à un autre temps. Ce résultat, a déjà été observé dans d'autres travaux (Kordick *et al.*, 1997; Gurfield *et al.* 2001). Par ailleurs, il est démontré que l'antigène utilisé peut ne pas être adapté (Drancourt *et al.*, 1996).

2. CARACTÉRISATION ET ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *BARTONELLA* SPP. D'UNE POPULATION DE CHATS ERRANTS DE LA RÉGION D'ALGER

Cette étude apporte des données complémentaires sur l'infection, en Algérie, des chats errants par les espèces de *Bartonella*. L'espèce *Bartonella henselae* a été la seule espèce isolée de notre cohorte.

Afin de distinguer les différentes souches de l'espèce *B. henselae*, nous avons utilisé la technique MLVA. Cette méthode de typage a été mise au point et validé au laboratoire où nous avons réalisé notre étude. Nous avons pu ainsi ériger une phylogénie des différentes souches isolées.

Nous avons également démontré grâce à cette méthode, qu'un chat donné pouvait être porteur de souches présentant le même profil allélique ou de souches avec des profils complètement différents. Chez cette deuxième catégorie de chat, la variabilité génétique constatée serait le résultat d'une co-infection ou d'une dérive génétique intra-chat.

2.1. ANALYSE DE LA PRÉVALENCE DE L'INFECTION PAR *B. HENSELAE* ET *B. CLARRIDGEIAE* ET DES FACTEURS D'INFLUENCE

Toutes les souches isolées ont été identifiées comme étant *B. henselae*. Nous n'avons pas pu isoler *B. clarridgeiae* et *B. koehlerae*, dont le chat est décrit comme réservoir principal, ni *B. bovis*. Cependant la séropositivité des chats de notre étude vis-à-vis de *B. clarridgeiae* laisse supposer que cette espèce est bien présente dans notre population.

La culture des bartonelles est fastidieuse et délicate. De plus le temps d'apparition des colonies est relativement long (2 à 4 semaines). Les exigences nutritives de ces bactéries pourraient être à l'origine de difficultés rencontrées lors de leur isolement. Ainsi, chaque espèce exige un milieu et des conditions particulières de culture (Pons *et al.*, 2005 ; Guptill *et al.*, 2004).

Ceci pourrait expliquer en partie l'absence d'isolement de *B. koehlerae* dans notre étude. Il est également intéressant de noter que cette très faible fréquence voir l'absence totale d'isolement a été décrite dans différents pays à travers le monde (Droz *et al.*, 1999 ; Rolain *et al.*, 2003 ; Avidor *et al.*, 2004 ; Chomel *et al.*, 2006). Breitschwerdt *et al.* stipulent que cette bactérie nécessite un pré-enrichissement sur milieu de croissance spécifique aux bartonelles et ceci augmenterait la sensibilité de l'isolement (*Bartonella* Alpha Proteobacteria Growth Medium, BAPGM). (Breitschwerdt *et al.*, 2010).

D'autre part, une grande majorité des enquêtes épidémiologiques dans la population féline montre que la prévalence de *B. clarridgeiae* est souvent plus faible par rapport à l'infection par *B. henselae* (Kordick *et al.*, 1997 ; Maruyama *et al.*, 2000 ; Arvand *et al.*, 2001 ; Chomel *et al.*, 2002). Cela souligne que cette espèce nécessite comme pour la précédente des conditions de culture différentes et optimales (Heller *et al.*, 1997; Maggi *et al.*, 2005).

De plus Tsai et ses collaborateurs (2010) suggèrent que la faible fréquence de *B. clarridgeiae* chez les chats bactériémiques par rapport au pourcentage de puces positives serait peut être due à une meilleure adaptation au vecteur qu'à l'hôte mammifère.

Dans notre population de chats errants étudiée, la prévalence de la bactériémie à *B. henselae* était de 15.4%. Cette faible prévalence, eu égard à l'origine de la population féline étudiée (chats errants), pourrait être due aux difficultés que nous avons rencontrées lors de la conservation et de l'acheminement des prélèvements sanguins. Néanmoins, ce résultat est comparable aux pourcentages rapportés dans d'autres études similaires publiées (Arvand *et al.*, 2001 ; Fabbi *et al.*, 2004 ; Celebi *et al.*, 2000 ; Inoue *et al.*, 2009 ; Yuan *et al.*, 2011 ; Tsai *et al.*, 2011).

Malgré l'évaluation approximative de l'âge des chats, nous avons pu montrer que la proportion de chats bactériémiques était plus importante chez les jeunes. Ce résultat vient appuyer les études indiquant que la bactériémie à *B. henselae* est plus élevée chez les jeunes chats (Chomel *et al.*, 1995; Gurfield *et al.*, 2001).

Cependant aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la concentration bactérienne (CFU/ml) et l'âge des animaux. De plus, il est important de souligner qu'il n'y a aucune variation significative de la bactériémie en fonction du sexe de l'animal et ceci n'est pas en contradiction avec ce qui a été mentionné dans la littérature (Chomel *et al.*, 1995; Pons *et al.*, 2005).

L'état de gestation chez les femelles a été considéré dans l'étude de la bactériémie. Nous n'avons pas pu confirmer que les chattes gestantes sont plus susceptibles d'être bactériémiques que les non gestantes. Bien que les études ne soient pas similaires, notre résultat est en contradiction avec ce qui a été démontré par Maillard et ses collaborateurs (2006) qui évoquent un taux de bactériémie plus élevé chez les vaches gestantes. Cependant il est important de souligner que l'effectif des chattes gestantes était inférieur à celui des non gestantes et que le faible nombre de chattes bactériémiques n'autorise pas d'évaluation statistique des différences.

Enfin, la culture des embryons issus de chattes gestantes bactériémiques s'est révélée négative et aucune résorption ou réduction du nombre d'ampoule fœtale n'a été constatée dans ce groupe en comparaison du groupe de chattes gestantes non bactériémiques. Cela suggère qu'il n'y a pas de passage transplacentaire de *B. henselae*. Cette non acquisition de l'infection a été également décrite par Guptill et ses collaborateurs (2003). Cependant ces mêmes auteurs mentionnent que l'infection expérimentale de chatte gestante par *B. henselae* avait un effet sur la reproduction qui se manifeste essentiellement par un retard de croissance des embryons, des résorptions fœtales et une réduction du nombre de fœtus de la portée.

2.2. GÉNOTYPAGE PAR LES TECHNIQUES MLVA ET MLST

Nous avons analysé le polymorphisme de 259 souches de *B. henselae* isolées de 30 chats errants.

L'évaluation de cette diversité s'est en premier lieu appuyée sur l'étude du génotype ARN 16S décrit par Bergmans *et al* (1996). Elle a révélé que 165 souches étaient de génotype I, 93 de génotype II et d'une souche de génotype I/II.

L'utilisation de la technique MLVA comme méthode de génotypage et d'appréciation de la variabilité génétique des souches de *B. henselae* nous a permis d'identifier, en utilisant cinq locus, 52 profils. Parmi ces profils, 48 sont nouveaux et s'ajoutent à ceux déjà décrits dans une précédente étude réalisée au sein de notre laboratoire (Bouchouicha *et al.*, 2009). Ainsi, lorsque nous prenons en compte le nombre total de profils identifiés dans les deux études, nous obtenons un total de 147 profils génotypes pour 437 souches typées. Par ailleurs, le nombre élevé de nouveaux profils obtenus dans notre travail est à mettre en relation avec le fait que la population de chats testés provient d'une région jusqu'à présent inexplorée de ce point de vue. La valeur de notre indice de diversité (I.D) est légèrement inférieure à celle calculée par Bouchouicha et ses collaborateurs (0.95 versus 0.98). Cette différence peut s'expliquer par le fait que ces derniers ont choisi une souche par chat, tandis que dans notre étude, nous avons sélectionné jusqu'à 14 souches par chat (Hunter, 1998).

D'autre part, l'évaluation de la diversité génétique des souches de *B. henselae* hébergées par un même chat a permis de distinguer deux populations différentes de chats. La première correspond à des chats porteurs de souches avec des profils MLVA complètement différents (chats à profils polymorphes) et la seconde à des chats hébergeant des souches présentant un unique profil MLVA (chats à profils monomorphes).

En ce qui concerne le premier groupe de chat, le dendrogramme que nous avons construit par la méthode neighbor-joining (NJ) a montré que les profils des souches de génotype I sont réunis en un seul groupe. En revanche, les profils des souches de génotype II sont repartis de façon hétérogène. Par ailleurs, l'analyse du degré de similitude des profils identifiés chez un même chat a montré que la distance entre ces derniers est significativement plus faible que celle de profils pris au hasard dans la population de chats étudiée. Ce résultat a été confirmé par l'approche structure-neighbor. Cette méthode a abouti à la construction de deux clusters à l'intérieur desquels les profils des souches d'un même chat sont rattachés de façon très rapprochée. Toutefois, quatre chats (# 71, 88, 237, and 273) ne correspondent à aucune de ces analyses. Ce groupe, appartient à une série de six chats co-infectés par des souches de génotype I et de génotype II. Les trois analyses statistiques utilisées dans notre étude vont dans le même sens et suggèrent que les différents profils identifiés chez un même chat résultent soit d'infections indépendantes par deux ou plusieurs souches, soit d'une dérive génétique d'une souche unique initiale. Chez certains chats, les deux phénomènes semblent se produire simultanément. De plus, nous avons montré qu'il existe une augmentation significative du nombre de profils VNTR en fonction de l'âge. Ainsi, nous pouvons déduire que la co-infection survient chez un chat donné soit par acquisition de souches d'un même génotype ARN16s soit de génotype différent mais avec des profils MLVA

parfaitement distincts. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la bactériémie diminue avec l'âge alors que le nombre de profils MLVA augmente.

Notre étude confirme les résultats décrit par Berghoff *et al.*, (2007). En revanche, ces auteurs ont typé un petit nombre de souches, en utilisant à la fois la technique PFGE et la technique MLST. Cette dernière a permis de révéler une importante diversité génétique, ce que nous n'avons pas réussi à obtenir (voir infra). En réalité, les deux études ne sont pas complètement comparables. En effet, Berkhoff et ses collaborateurs ont analysé des souches issues d'un repiquage d'isolat provenant de chat d'origine géographique diverse, tandis que dans notre travail nous avons typé des souches résultant de la culture primaire de prélèvements sanguins issus de chat de la même région.

Pour comparer les performances de la technique MLVA par rapport à celles de la technique MLST, nous avons sélectionné des souches dont le profil MLVA et le génotype ARN 16S sont connus. De plus ces souches proviennent de chats dits à profils polymorphes. Comme attendu, la technique MLST a permis de différencier les souches de génotype I et celles du génotype II. En revanche, la méthode s'est avérée moins discriminante que la technique MLVA pour les souches de génotype I. En effet, la majorité de ces souches avaient un même profil ST (ST1) mais des profils MLVA différents. Ce résultat confirme la stabilité de la technique MLST et le fait que cette dernière est plus adaptée à l'épidémiologie à long terme. En revanche, la technique MLVA est plus adaptée à l'épidémiologie à court terme des souches car elle étudie les V.N.T.R. qui peuvent varier rapidement sous l'effet de certaines conditions tel que la pression du système immunitaire de l'hôte infecté (Bouchouicha *et al.*, 2009 ; Chomel *et al.*, 2009).

Ceci va donc dans le sens de notre hypothèse que d'un chat à l'autre (71 et 88) ou même au sein d'un même chat (92), certaines souches émergent en changeant préférentiellement le nombre d'unité de base des VNTR les moins stables. De même, les souches de génotype II présentent au sein d'un même chat un profil allélique identique ST. Ainsi, 2 parmi les 3 chats analysés hébergeaient des souches avec le même profil ST5. Le dernier chat (92) était porteur de souches qui présentaient une rare séquence type (ST24) mais avaient 4 profils MLVA totalement différents. Ces résultats indiquent soit que la technique MLST ne permet pas de déterminer l'origine de la diversité des souches (dérive génétique ou infections indépendantes) chez un chat soit que les 5 VNTR que nous avons utilisés comme marqueurs sont sujets à une grande variabilité dont les circonstances d'induction restent à déterminer. La variabilité du nombre de répétition, estimée en calculant l'intervalle du nombre de répétition, des cinq VNTR peut permettre une tentative d'explication. La diversité allélique des 4 VNTR intragénique (BHV-B, BHV-C, BHV-D et BHV-E) est inférieure à celle des souches asiatiques et européennes. En revanche, l'intervalle du nombre de répétitions du BHVA, unique VNTR intergénique, est identique à celui observé chez les souches asiatiques et européennes.

Le second groupe correspond à dix chats hébergeant des souches (3 à 12 souches/chat) avec un profil MLVA unique. La proportion de cette catégorie de chat est inférieure à celle obtenue par Berghoff et ses collaborateurs (2007). Cela semble en réalité étonnant

car la technique de typage (PFGE) utilisée par ces derniers est connue pour avoir un pouvoir discriminant supérieur à de nombreux autres marqueurs utilisant les profils de restriction. Néanmoins nos deux techniques aboutissent aux mêmes conclusions concernant la population de chats dit monomorphes.

La diversité des profils observés chez les chats infectés par des souches présentant un seul profil semble similaire à celle des profils observés chez des chats infectés par des souches avec différents profils MLVA. Ces constatations suggèrent que tous ces profils ont des chances égales de se retrouver seuls ou associés avec d'autres profils. En appui de ce constat, huit profils MLVA observés chez les chats monomorphes sont aussi retrouvés chez les chats polymorphes.

Nous avons indiqué précédemment qu'il existait une corrélation entre l'âge et le nombre de profils VNTR. Cette donnée nous permet de supposer que le profil unique partagé par certaines souches d'un chat donné serait probablement celui d'une souche initiale qui a été inoculée via la puce vectrice à l'animal. Ce mode possible d'infection par un variant unique serait le résultat soit de l'existence d'un cluster de souche au sein de la colonie ou de la fratrie à laquelle appartient le chat prélevé soit d'une pression de sélection chez le vecteur. Dans ce dernier cas, la puce agirait comme un filtre passif et serait le siège d'un phénomène d'exclusion compétitive entre les différentes souches de *Bartonella* qu'elle héberge. Cette hypothèse va dans le même sens que l'étude effectuée par Tsai et ses collaborateurs (2011). En effet, ces derniers stipulent qu'il existe une différence entre la capacité d'héberger plusieurs espèces de *Bartonella* par la puce et sa capacité de tous les transmettre à l'hôte animal.

D'autre part, l'association significative entre la concentration bactérienne et le nombre de profil VNTR, nous permet de supposer que la présence chez un chat donné de souches avec des profils MLVA identiques ou différents ne dépend pas de l'espèce *B. henselae* mais plutôt à des facteurs intrinsèques liés à l'hôte mammifère. Par conséquent, nous avons testé la moitié de nos chats bactériémies aux virus de l'immunodéficience Fiv et FeIV. Buchman *et al.*, (2010) ont montré que lorsque le virus FeIV est présent chez un chat, il peut modifier l'évolution ainsi que le cours d'une infection par *B. henselae*.

Dans notre étude, seul un chat s'est avéré positif au virus Fiv et aucuns chats au virus FeIV. Nous pouvons donc conclure que la présence de différentes souches de *B. henselae* chez un même chat n'est pas la conséquence d'une immunodéficience induite par les virus FeIV et FIV.

Cette étude nous renseigne aussi sur certaines particularités liées à la diversité des souches algériennes de *B. henselae* lorsque nous les comparons à celles d'autres continents (Asie, Europe, USA).

Plus de la moitié des chats bactériémiques étaient infectés par des souches de *B. henselae* de génotype I. La proportion des souches de génotype I était intermédiaire avec celles observées dans la population féline d'Asie et d'Europe (Boulouis *et al.*, 2005).

Par ailleurs, lorsque nous avons analysé les caractéristiques des deux VNTR BHV-C et BHV-E, précédemment considérés comme marqueurs géographiques, il apparaît que la majorité des allèles qui sont dominants en Asie et en Europe le sont aussi pour les souches algériennes.

Enfin, la position centrale des souches algériennes dans le Minimum Spanning Tree (MST) laisse supposer que les souches provenant des autres continents ont émergé à partir de cette racine centrale.

Les séquences répétées, particulièrement celles qui sont intragéniques sont une excellente cible pour analyser le polymorphisme génétique au sein des génomes bactériens mais aussi pour étudier la genèse de la variabilité antigénique (Alsmark *et al.*, 2006 ; Frutos *et al.*, 2006; Berghoff *et al.*, 2007).

Ces caractéristiques nous permettent de suggérer que l'espèce *B. henselae* a subi une co-évolution au sein de son hôte réservoir félin et de manière plus large avec son écosystème et cela depuis l'apparition des chats domestiques au Moyen orient (Driscoll, 2007).

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1. CONCLUSION générale

Ce travail nous a permis, par différents moyens (sérologie, culture ou biologie moléculaire), de prouver de façon directe ou indirecte la présence de différentes bactéries vectorisées par des arthropodes hématophages dans la population canine et féline de la région d'Alger.

La comparaison de la séroprévalence à *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* et *Bartonella* spp. chez les chiens de fourrière avec les chiens de propriétaires a montré des résultats divergents. En effet, la séroprévalence était plus importante chez les chiens de fourrière pour tous les agents bactériens recherchés à l'exception de *Bartonella vinsonii berkhoffii*. L'évaluation du test de chi2 et le test Fisher exact a révélé une différence significative entre ces deux populations.

Le nombre relativement important de séropositifs à plusieurs valences antigéniques (onze animaux séropositifs pour les 4 antigènes) permet de supposer que les vecteurs de transmission de ces trois genres bactériens peuvent être partagés.

En revanche, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence une relation entre le statut sérologiques des chiens et leur âge, leur race ou leur état de santé.

La séroprévalence des chats testés aux antigènes de *B. henselae* et *B. clarridgeae* suggère la forte exposition de la population féline à ces deux agents bactériens vectorisés en Algérie.

Nous avons pu isoler *Bartonella henselae* de nos chats ce qui confirme les résultats de la sérologie. *B. clarridgeae* n'a pas pu être isolée ce qui est étonnant au vu des résultats sérologique mais relativement conforme aux données publiées. Enfin, dans les conditions naturelles, *B. henselae* ne semble pas être transmise par voie transplacentaire.

L'étude de la diversité génétique des 259 souches isolées de *B. henselae* en utilisant la technique MLVA a révélé 52 profils dont 48 nouveaux. Le dendrogramme que nous avons obtenu a montré une séparation complète entre les souches de génotype I et de génotype II. Les informations fournis par cette partie de l'étude nous ont permis de démontrer que dans notre population féline deux groupes de chats pouvaient subsister: un premier porteur de souches avec un profil MLVA identique et le second porteur de souches avec des profils différents

et multiples. La comparaison de la technique MLVA et de la technique MLST appliquée à certaines souches a démontré que la technique MLVA était la plus discriminante.

Par conséquent, à l'issu de ces résultats, nous pouvons conclure que *Bartonella*, *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi* sont transmis aux carnivores domestiques et/ou 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.

2. 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* et *Bartonella* spp. dans le sang. Si cette recherche s'avérait positive, le typage des souches d'*A. phagocytophilum* et de *Bartonella* serait intéressant dans l'optique de statuer sur leur caractère zoonotique ;
- ✓ Une étude systématique de l'infection par *B. berkhoffii* chez des chiens malades permettrait de construire le tableau clinique induit par cette bactérie chez les chiens algériens ;
- ✓ La recherche et l'identification d'autres bactéries hémotropes vectorisées (*Hémoplasmes* spp., *A. platys*, *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp.,...) chez les carnivores domestiques est une prolongation évidente de ce travail ;
- ✓ Par ailleurs, l'étude du portage de ces agents pathogènes bactériens par les arthropodes hématophages permettra 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 ;
- ✓ Des études portant sur les momies de chats égyptiens, en utilisant la technique MLVA, pourrait nous permettre de mieux comprendre la diffusion ancestrale des félins et des espèces de *Bartonella* vers l'Afrique du Nord.

Ces nouvelles approches permettront d'améliorer les connaissances que l'on a du risque de transmission des maladies bactériennes vectorisées en Algérie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, Pedersen NC. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1997;20: 41-51.

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

Akins DR, Caimano MJ, Yang X, Cerna F, Norgard MV, Radolf JD. Molecular and evolutionary analysis of *Borrelia burgdorferi* 297 circular plasmid-encoded lipoproteins with OspE- and OspF-like leader peptides. *Infect Immun* 1999;67: 1526-1532.

Alsmark CM, Frank AC, Karlberg EO, Legault BA, Ardell DH, Canback B, Eriksson AS, Naslund AK, Handley SA, Huvet M, La Scola B, Holmberg M, Andersson SG. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 9716-9721.

Alves AS, Milhano 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 2009 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.

Anderson B, Scotchlas D, Jones D, Johnson A, Tzianabos T, Baumstark B. Analysis of 36-kilodalton protein (PapA) associated with the bacteriophage particle of *Bartonella henselae*. *DNA Cell Biol* 1997;16: 1223-1229.

Anderson JF, Johnson RC, Magnarelli LA, Hyde FW. Involvement of birds in the epidemiology of the

Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1986;51: 394-396.

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.

Arvand M, Feil EJ, Giladi M, Boulouis HJ, Viezens J. Multi-locus sequence typing of *Bartonella henselae* isolates from three continents reveals hypervirulent and feline-associated clones. *PLoS One* 2007;2: e1346.

Arvand M, Klose AJ, Schwartz-Porsche D, Hahn H, Wendt C. Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J Clin Microbiol* 2001;39: 743-746.

Arvand M, Schubert H, Viezens J. Emergence of distinct genetic variants in the population of primary *Bartonella henselae* isolates. *Microbes Infect* 2006;8: 1315-1320.

Arvand M, Viezens J. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing for the analysis of clonal relatedness among *Bartonella henselae* isolates. *Int J Med Microbiol* 2007;297: 255-262.

Avidor B, Graidy M, Efrat G, Leibowitz C, Shapira G, Schattner A, Zimhony O, Giladi M. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. *J Clin Microbiol* 2004;42: 3462-3468.

Ayllón T, Diniz PP, Breitschwerdt EB, Villaescusa A, Rodríguez-Franco F, Sainz A. 2012. Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*. Feb;12(2):143-50. Epub 2011 Oct 24.

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.

Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA. Delineation of

Borrelia burgdorferi sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42: 378-383.

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

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

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.

Barutzki D, De Nicola A, Zeziola M, Reule M. [Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in Germany]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2006;119: 342-347.

Batterman HJ, Peek JA, Loutit JS, Falkow S, Tompkins LS. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun* 1995;63: 4553-4556.

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.

Benslimani A, Fenollar F, Lepidi H, Raoult D. Bacterial zoonoses and infective endocarditis, Algeria. *Emerg Infect Dis* 2005;11: 216-224.

Benson LA, Kar S, McLaughlin G, Ihler GM. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect Immun* 1986;54: 347-353.

Bereswill S, Hinkelmann S, Kist M, Sander A. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37: 3159-3166.

Berglund EC, Frank AC, Calteau A, Vinnere Pettersson O, Granberg F, Eriksson AS, Naslund K,

Holmberg M, Lindroos H, Andersson SG. Run-off replication of host-adaptability genes is associated with gene transfer agents in the genome of mouse-infecting *Bartonella grahamii*. PLoS Genet 2009;5: e1000546.

Bergmans AM, Schellekens JF, van Embden JD, Schouls LM. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. J Clin Microbiol 1996;34: 254-260.

Bergmans AM, de Jong CM, van Amerongen G, Schot CS, Schouls LM. 1997. [Prevalence of Bartonella species in domestic cats in The Netherlands](#). J Clin Microbiol. Sep;35(9):2256-61.

Bexfield NH, Villiers EJ, Herrtage ME. Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog. J Small Anim Pract 2005;46: 543-548.

Bhutto AM, Nonaka S, Hashiguchi Y, Gomez EA. Histopathological and electron microscopical features of skin lesions in a patient with bartonellosis (verruca peruana). J Dermatol 1994;21: 178-184.

Billeter SA, Kasten RW, Killmaster LF, Breitschwerdt EB, Levin ML, Levy MG, Kosoy MY, Chomel BB. Experimental infection by capillary tube feeding of *Rhipicephalus sanguineus* with *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2012;35: 9-15.

Billeter SA, Spencer JA, Griffin B, Dykstra CC, Blagburn BL. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. Vet Parasitol 2007;147: 194-198.

Birtles RJ, Harrison TG, Taylor AG. Cat scratch disease and bacillary angiomatosis: aetiological agents and the link with AIDS. Commun Dis Rep CDR Rev 1993;3: R107-110.

Birtles RJ, Hazel S, Bown K, Raoult D, Begon M, Bennett M. Subtyping of uncultured bartonellae using sequence comparison of 16 S/23 S rRNA intergenic spacer regions amplified directly from infected blood. Mol Cell Probes 2000;14: 79-87.

Birtles RJ, Raoult D. Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. Int J Syst Bacteriol 1996;46: 891-897.

Bitam I, Baziz B, Kernif T, Harrat Z, Parola P, Raoult D. Molecular detection of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in fleas from Algeria. Clin Microbiol Infect 2009;15 Suppl 2: 255-256.

Bitam I, Kernif T, Harrat Z, Parola P, Raoult D. First detection of *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma aegyptium* from Algeria. Clin Microbiol Infect 2009;15 Suppl 2: 253-254.

Bjoersdorff A, Svendenius L, Owens JH, Massung RF. Feline granulocytic ehrlichiosis--a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. J Small Anim Pract 1999;40: 20-24.

Blanco JR, Raoult D. [Diseases produced by Bartonella]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005;23: 313-319; quiz 320.

Bouattour A, Ghorbel A, Chabchoub A, Postic D. [Lyme borreliosis situation in North Africa]. Arch Inst Pasteur Tunis 2004;81: 13-20.

Bouchouicha R, Boulouis HJ, Berrich M, Monteil M, Chomel B, Haddad N. Comparison of the performances of MLVA vs. the main other typing techniques for *Bartonella henselae*. Clin Microbiol Infect 2009;15 Suppl 2: 104-105.

Bouchouicha R, Durand B, Monteil M, Chomel BB, Berrich M, Arvand M, Birtles RJ, Breitschwerdt EB, Koehler JE, Maggi R, Maruyama S, Kasten R, Petit E, Boulouis HJ, Haddad N. Molecular epidemiology of feline and human *Bartonella henselae* isolates. Emerg Infect Dis 2009;15: 813-816.

Boulouis H-J, Haddad N, Marignac G, Maillard R, Chomel B. Les animaux réservoirs et victimes des *Bartonella*. Bull Acad Vétérinaire de France 2008;161 211-220.

Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. Vet Res 2005;36: 383-410.

Boulouis HJ, Haddad N, Vayssier-Taussat M, Maillard R, Chomel B. [Persistent *Bartonella* infection: epidemiological and clinical implications]. Bull Acad Natl Med 2007;191: 1037-1044; discussion 1047-1039.

Bown KJ, Begon M, Bennett M, Birtles RJ, Burthe S, Lambin X, Telfer S, Woldehiwet Z, Ogden NH. Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom? Vector Borne

Zoonotic Dis 2006;6: 404-410.

Breitschwerdt EB, Blann KR, Stebbins ME, Munana KR, Davidson MG, Jackson HA, Willard MD. Clinicopathological abnormalities and treatment response in 24 dogs seroreactive to *Bartonella vinsonii* (berkhoffii) antigens. J Am Anim Hosp Assoc 2004;40: 92-101.

Breitschwerdt EB, Kordick DL. Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev 2000;13: 428-438.

Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. Int J Syst Bacteriol 1993;43: 777-786.

Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;47: 1-13.

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? Science 1982;216: 1317-1319.

Burgess AW, Anderson BE. Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. Microb Pathog 1998;25: 157-164.

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.

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. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00334.x. Epub 2011 Aug 9.

Carroll JA, Coleman SA, Smitherman LS, Minnick MF. Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. Infect Immun 2000;68: 6750-6757.

Casjens S. *Borrelia* genomes in the year 2000. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;2: 401-410.

Celebi B, Taylan Ozkan A, Kilic S, Akca A, Koenhems L, Pasa S, Yildiz K, Mamak N, Guzel M. Seroprevalence of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* in urban and rural dogs in Turkey. *J Vet Med Sci* 2010;72: 1491-1494.

Celebi B, Kilic S, Aydin N, Tarhan G, Carhan A, Babur C. 2009. Investigation of *Bartonella henselae* in cats in Ankara, Turkey. *Zoonoses Public Health*. May;56(4):169-75. Epub 2008 Nov 4.

Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Heller RM, Ueno H, Yamamoto K, Bleich VC, Pierce BM, Gonzales BJ, Swift PK, Boyce WM, Jang SS, Boulouis HJ, Piemont Y, Rossolini GM, Riccio ML, Cornaglia G, Pagani L, Lagatolla C, Selan L, Fontana R. *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. *Emerg Infect Dis* 2000;6: 306-311.

Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Romano V, Tietze N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol* 2001;39: 1221-1226.

Chang CC, Hayashidani H, Pusterla N, Kasten RW, Madigan JE, Chomel BB. Investigation of *Bartonella* infection in ixodid ticks from California. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2002;25: 229-236.

Chang CC, Lee CC, Maruyama S, Lin JW, Pan MJ. Cat-scratch disease in veterinary-associated populations and in its cat reservoir in Taiwan. *Vet Res* 2006;37: 565-577.

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

Choi KS, Dumler JS. Early induction and late abrogation of respiratory burst in *A. phagocytophilum*-infected neutrophils. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990: 488-493.

Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, Pedersen NC, Koehler JE. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol* 1995;33: 2445-2450.

Chomel BB, Boulouis HJ, Gurfield AN, Heller R, Piemont Y, Pilet C. [Cat scratch disease and associated infections]. Bull Acad Natl Med 1997;181: 441-450; discussion 451-444.

Chomel BB, Carlos ET, Kasten RW, Yamamoto K, Chang CC, Carlos RS, Abenes MV, Pajares CM. Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae infection in domestic cats from The Philippines. Am J Trop Med Hyg 1999;60: 593-597.

Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. J Appl Microbiol 2010;109: 743-750.

Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC, Koehler JE. Experimental transmission of Bartonella henselae by the cat flea. J Clin Microbiol 1996;34: 1952-1956.

Chomel BB, Kasten RW, Williams C, Wey AC, Henn JB, Maggi R, Carrasco S, Mazet J, Boulouis HJ, Maillard R, Breitschwerdt EB. Bartonella endocarditis: a pathology shared by animal reservoirs and patients. Ann N Y Acad Sci 2009;1166: 120-126.

Chomel BB, Wey AC, Kasten RW, Stacy BA, Labelle P. Fatal case of endocarditis associated with Bartonella henselae type I infection in a domestic cat. J Clin Microbiol 2003;41: 5337-5339.

Chung CY, Kasten RW, Paff SM, Van Horn BA, Vayssier-Taussat M, Boulouis HJ, Chomel BB. Bartonella spp. DNA associated with biting flies from California. Emerg Infect Dis 2004;10: 1311-1313.

Colborn JM, Kosoy MY, Motin VL, Telepnev MV, Valbuena G, Myint KS, Fofanov Y, Putonti C, Feng C, Peruski L. Improved detection of Bartonella DNA in mammalian hosts and arthropod vectors by real-time PCR using the NADH dehydrogenase gamma subunit (nuoG). J Clin Microbiol 2010;48: 4630-4633.

Coleman SA, Minnick MF. Establishing a direct role for the Bartonella bacilliformis invasion-associated locus B (IalB) protein in human erythrocyte parasitism. Infect Immun 2001;69: 4373-4381.

Cotte V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis HJ, Lecuelle B, Lilin T, Vayssier-Taussat M. Transmission of Bartonella henselae by Ixodes ricinus. Emerg Infect Dis 2008;14: 1074-1080.

Coutte L, Botkin DJ, Gao L, Norris SJ. Detailed analysis of sequence changes occurring during vlsE antigenic variation in the mouse model of *Borrelia burgdorferi* infection. *PLoS Pathog* 2009;5: e1000293.

Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. *J Infect Dis* 1984;149: 789-795.

Crother TR, Champion CI, Wu XY, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection of SCID mice. *Infect Immun* 2003;71: 3419-3428.

De la Fuente J, Lew A, Lutz H, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Shkap V, Molad T, Mangold AJ, Almazan C, Naranjo V, Gortazar C, Torina A, Caracappa S, Garcia-Perez AL, Barral M, Oporto B, Ceci L, Carelli G, Blouin EF, Kocan KM. Genetic diversity of anaplasma species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 2005;6: 75-89.

Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, Pedersen NC. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1997;20: 41-51.

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

Akins DR, Caimano MJ, Yang X, Cerna F, Norgard MV, Radolf JD. Molecular and evolutionary analysis of *Borrelia burgdorferi* 297 circular plasmid-encoded lipoproteins with OspE- and OspF-like leader peptides. *Infect Immun* 1999;67: 1526-1532.

Alsmark CM, Frank AC, Karlberg EO, Legault BA, Ardell DH, Canback B, Eriksson AS, Naslund AK, Handley SA, Huvet M, La Scola B, Holmberg M, Andersson SG. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 9716-9721.

Alves AS, Milhano 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 2009 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.

Anderson B, Scotchlas D, Jones D, Johnson A, Tzianabos T, Baumstark B. Analysis of 36-kilodalton protein (PapA) associated with the bacteriophage particle of *Bartonella henselae*. *DNA Cell Biol* 1997;16: 1223-1229.

Anderson JF, Johnson RC, Magnarelli LA, Hyde FW. Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1986;51: 394-396.

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.

Arvand M, Feil EJ, Giladi M, Boulouis HJ, Viezens J. Multi-locus sequence typing of *Bartonella henselae* isolates from three continents reveals hypervirulent and feline-associated clones. *PLoS One* 2007;2: e1346.

Arvand M, Klose AJ, Schwartz-Porsche D, Hahn H, Wendt C. Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J Clin Microbiol* 2001;39: 743-746.

Arvand M, Schubert H, Viezens J. Emergence of distinct genetic variants in the population of primary *Bartonella henselae* isolates. *Microbes Infect* 2006;8: 1315-1320.

Arvand M, Viezens J. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing for the analysis of clonal relatedness among *Bartonella henselae* isolates. *Int J Med Microbiol* 2007;297: 255-262.

Avidor B, Graidy M, Efrat G, Leibowitz C, Shapira G, Schattner A, Zimhony O, Giladi M. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. *J Clin Microbiol* 2004;42: 3462-3468.

Ayllón T, Diniz PP, Breitschwerdt EB, Villaescusa A, Rodríguez-Franco F, Sainz A. 2012. Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* Feb;12(2):143-50. Epub 2011 Oct 24.

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.

Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42: 378-383.

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

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

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.

Barutzki D, De Nicola A, Zeziola M, Reule M. [Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in Germany]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2006;119: 342-347.

Batterman HJ, Peek JA, Loutit JS, Falkow S, Tompkins LS. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun* 1995;63: 4553-4556.

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.

Benslimani A, Fenollar F, Lepidi H, Raoult D. Bacterial zoonoses and infective endocarditis, Algeria. *Emerg Infect Dis* 2005;11: 216-224.

Benson LA, Kar S, McLaughlin G, Ihler GM. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect Immun* 1986;54: 347-353.

Bereswill S, Hinkelmann S, Kist M, Sander A. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37: 3159-3166.

Berglund EC, Frank AC, Calteau A, Vinnere Pettersson O, Granberg F, Eriksson AS, Naslund K, Holmberg M, Lindroos H, Andersson SG. Run-off replication of host-adaptability genes is associated with gene transfer agents in the genome of mouse-infecting *Bartonella grahamii*. *PLoS Genet* 2009;5: e1000546.

Bergmans AM, Schellekens JF, van Embden JD, Schouls LM. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 1996;34: 254-260.

Bergmans AM, de Jong CM, van Amerongen G, Schot CS, Schouls LM. 1997. [Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in The Netherlands.](#) *J Clin Microbiol*. Sep;35(9):2256-61.

Bexfield NH, Villiers EJ, Herrtage ME. Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog. *J Small Anim Pract* 2005;46: 543-548.

Bhutto AM, Nonaka S, Hashiguchi Y, Gomez EA. Histopathological and electron microscopical features of skin lesions in a patient with bartonellosis (verruca peruana). *J Dermatol* 1994;21: 178-184.

Billeter SA, Kasten RW, Killmaster LF, Breitschwerdt EB, Levin ML, Levy MG, Kosoy MY, Chomel BB. Experimental infection by capillary tube feeding of *Rhipicephalus sanguineus* with *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012;35: 9-15.

Billeter SA, Spencer JA, Griffin B, Dykstra CC, Blagburn BL. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. *Vet Parasitol* 2007;147: 194-198.

Birtles RJ, Harrison TG, Taylor AG. Cat scratch disease and bacillary angiomatosis: aetiological agents and the link with AIDS. *Commun Dis Rep CDR Rev* 1993;3: R107-110.

Birtles RJ, Hazel S, Bown K, Raoult D, Begon M, Bennett M. Subtyping of uncultured bartonellae using sequence comparison of 16 S/23 S rRNA intergenic spacer regions amplified directly from infected blood. *Mol Cell Probes* 2000;14: 79-87.

- Birtles RJ, Raoult D. Comparison of partial citrate synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46: 891-897.
- Bitam I, Baziz B, Kernif T, Harrat Z, Parola P, Raoult D. Molecular detection of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in fleas from Algeria. *Clin Microbiol Infect* 2009;15 Suppl 2: 255-256.
- Bitam I, Kernif T, Harrat Z, Parola P, Raoult D. First detection of *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma aegyptium* from Algeria. *Clin Microbiol Infect* 2009;15 Suppl 2: 253-254.
- Bjoersdorff A, Svendenius L, Owens JH, Massung RF. Feline granulocytic ehrlichiosis--a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. *J Small Anim Pract* 1999;40: 20-24.
- Blanco JR, Raoult D. [Diseases produced by *Bartonella*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23: 313-319; quiz 320.
- Bouattour A, Ghorbel A, Chabchoub A, Postic D. [Lyme borreliosis situation in North Africa]. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2004;81: 13-20.
- Bouchouicha R, Boulouis HJ, Berrich M, Monteil M, Chomel B, Haddad N. Comparison of the performances of MLVA vs. the main other typing techniques for *Bartonella henselae*. *Clin Microbiol Infect* 2009;15 Suppl 2: 104-105.
- Bouchouicha R, Durand B, Monteil M, Chomel BB, Berrich M, Arvand M, Birtles RJ, Breitschwerdt EB, Koehler JE, Maggi R, Maruyama S, Kasten R, Petit E, Boulouis HJ, Haddad N. Molecular epidemiology of feline and human *Bartonella henselae* isolates. *Emerg Infect Dis* 2009;15: 813-816.
- Boulouis H-J, Haddad N, Marignac G, Maillard R, Chomel B. Les animaux réservoirs et victimes des *Bartonella*. *Bull Acad Vétérinaire de France* 2008;161 211-220.
- Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res* 2005;36: 383-410.
- Boulouis HJ, Haddad N, Vayssier-Taussat M, Maillard R, Chomel B. [Persistent *Bartonella* infection: epidemiological and clinical implications]. *Bull Acad Natl Med* 2007;191: 1037-1044; discussion 1047-1039.

Bown KJ, Begon M, Bennett M, Birtles RJ, Burthe S, Lambin X, Telfer S, Woldehiwet Z, Ogden NH. Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom? Vector Borne Zoonotic Dis 2006;6: 404-410.

Breitschwerdt EB, Blann KR, Stebbins ME, Munana KR, Davidson MG, Jackson HA, Willard MD. Clinicopathological abnormalities and treatment response in 24 dogs seroreactive to *Bartonella vinsonii* (berkhoffii) antigens. J Am Anim Hosp Assoc 2004;40: 92-101.

Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev 2000;13: 428-438.

Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. Int J Syst Bacteriol 1993;43: 777-786.

Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;47: 1-13.

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? Science 1982;216: 1317-1319.

Burgess AW, Anderson BE. Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. Microb Pathog 1998;25: 157-164.

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.

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. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00334.x. Epub 2011 Aug 9.

Carroll JA, Coleman SA, Smitherman LS, Minnick MF. Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infect Immun* 2000;68: 6750-6757.

Casjens S. *Borrelia* genomes in the year 2000. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;2: 401-410.

Celebi B, Taylan Ozkan A, Kilic S, Akca A, Koenhems L, Pasa S, Yildiz K, Mamak N, Guzel M. Seroprevalence of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* in urban and rural dogs in Turkey. *J Vet Med Sci* 2010;72: 1491-1494.

Celebi B, Kilic S, Aydin N, Tarhan G, Carhan A, Babur C. 2009. Investigation of *Bartonella henselae* in cats in Ankara, Turkey. *Zoonoses Public Health*. May;56(4):169-75. Epub 2008 Nov 4.

Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Heller RM, Ueno H, Yamamoto K, Bleich VC, Pierce BM, Gonzales BJ, Swift PK, Boyce WM, Jang SS, Boulouis HJ, Piemont Y, Rossolini GM, Riccio ML, Cornaglia G, Pagani L, Lagatolla C, Selan L, Fontana R. *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. *Emerg Infect Dis* 2000;6: 306-311.

Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Romano V, Tietze N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol* 2001;39: 1221-1226.

Chang CC, Hayashidani H, Pusterla N, Kasten RW, Madigan JE, Chomel BB. Investigation of *Bartonella* infection in ixodid ticks from California. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2002;25: 229-236.

Chang CC, Lee CC, Maruyama S, Lin JW, Pan MJ. Cat-scratch disease in veterinary-associated populations and in its cat reservoir in Taiwan. *Vet Res* 2006;37: 565-577.

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

Choi KS, Dumler JS. Early induction and late abrogation of respiratory burst in *A. phagocytophilum*-

infected neutrophils. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990: 488-493.

Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, Pedersen NC, Koehler JE. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol* 1995;33: 2445-2450.

Chomel BB, Boulouis HJ, Gurfield AN, Heller R, Piemont Y, Pilet C. [Cat scratch disease and associated infections]. *Bull Acad Natl Med* 1997;181: 441-450; discussion 451-444.

Chomel BB, Carlos ET, Kasten RW, Yamamoto K, Chang CC, Carlos RS, Abenes MV, Pajares CM. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from The Philippines. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60: 593-597.

Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Appl Microbiol* 2010;109: 743-750.

Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC, Koehler JE. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol* 1996;34: 1952-1956.

Chomel BB, Kasten RW, Williams C, Wey AC, Henn JB, Maggi R, Carrasco S, Mazet J, Boulouis HJ, Maillard R, Breitschwerdt EB. *Bartonella endocarditis*: a pathology shared by animal reservoirs and patients. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1166: 120-126.

Chomel BB, Wey AC, Kasten RW, Stacy BA, Labelle P. Fatal case of endocarditis associated with *Bartonella henselae* type I infection in a domestic cat. *J Clin Microbiol* 2003;41: 5337-5339.

Chung CY, Kasten RW, Paff SM, Van Horn BA, Vayssier-Taussat M, Boulouis HJ, Chomel BB. *Bartonella* spp. DNA associated with biting flies from California. *Emerg Infect Dis* 2004;10: 1311-1313.

Colborn JM, Kosoy MY, Motin VL, Telepnev MV, Valbuena G, Myint KS, Fofanov Y, Putonti C, Feng C, Peruski L. Improved detection of *Bartonella* DNA in mammalian hosts and arthropod vectors by real-time PCR using the NADH dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*). *J Clin Microbiol* 2010;48: 4630-4633.

Coleman SA, Minnick MF. Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (IalB) protein in human erythrocyte parasitism. *Infect Immun* 2001;69: 4373-4381.

Cotte V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis HJ, Lecuelle B, Lilin T, Vayssier-Taussat M. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis* 2008;14: 1074-1080.

Coutte L, Botkin DJ, Gao L, Norris SJ. Detailed analysis of sequence changes occurring during vlsE antigenic variation in the mouse model of *Borrelia burgdorferi* infection. *PLoS Pathog* 2009;5: e1000293.

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.

Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. *J Infect Dis* 1984;149: 789-795.

Crother TR, Champion CI, Wu XY, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection of SCID mice. *Infect Immun* 2003;71: 3419-3428.

De la Fuente J, Lew A, Lutz H, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Shkap V, Molad T, Mangold AJ, Almazan C, Naranjo V, Gortazar C, Torina A, Caracappa S, Garcia-Perez AL, Barral M, Oporto B, Ceci L, Carelli G, Blouin EF, Kocan KM. Genetic diversity of anaplasma species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 2005;6: 75-89.

De Silva AM, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. *Parasitol Today* 1997;13: 267-270.

De Paiva Diniz PP, Schwartz DS, de Moraes 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.

Dehio C. Bartonella-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat Rev Microbiol* 2005;3: 621-631.

Dehio C. Bartonella interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol* 2001;9: 279-285.

Dehio C. Interactions of Bartonella henselae with vascular endothelial cells. *Curr Opin Microbiol* 1999;2: 78-82.

Dehio C, Berry C, Bartenschlager R. Persistent intracellular pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36: 513.

Deng H, Le Rhun D, Buffet JP, Cotte V, Read A, Birtles RJ, Vayssier-Taussat M. Strategies of exploitation of mammalian reservoirs by Bartonella species. *Vet Res* 2012;43: 15.

Dib L, Bitam I, Bensouilah M, Parola P, Raoult D. First description of Rickettsia monacensis in Ixodes ricinus in Algeria. *Clin Microbiol Infect* 2009;15 Suppl 2: 261-262.

Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, Cadenas MB, Bradley JM, Hegarty B, Breitschwerdt EB. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with Bartonella henselae and Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii. *Vet Res* 2007;38: 697-710.

Diniz PP, Beall MJ, Omark K, Chandrashekar R, Daniluk DA, Cyr KE, Koterski JF, Robbins RG, Lalo PG, Hegarty BC, Breitschwerdt EB. 2010. High prevalence of tick-borne pathogens in dogs from an Indian reservation in northeastern Arizona. *Vector Borne Zoonotic Dis.* Mar;10(2):117-23.

Diuk-Wasser MA, Gatewood AG, Cortinas MR, Yaremych-Hamer S, Tsao J, Kitron U, Hickling G, Brownstein JS, Walker E, Piesman J, Fish D. Spatiotemporal patterns of host-seeking Ixodes scapularis nymphs (Acari: Ixodidae) in the United States. *J Med Entomol* 2006;43: 166-176.

Domingos MC, Trotta M, Briend-Marchal A, Medaille C. Anaplasmosis in two dogs in France and molecular and phylogenetic characterization of Anaplasma phagocytophilum. *Vet Clin Pathol* 2011;40: 215-221.

Drancourt M, Birtles R, Chaumentin G, Vandenesch F, Etienne J, Raoult D. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* 1996;347: 441-443.

Driscoll CA, Menotti-Raymond M, Roca AL, Hupe K, Johnson WE, Geffen E, Harley EH, Delibes M, Pontier D, Kitchener AC, Yamaguchi N, O'Brien S J, Macdonald DW. The Near Eastern origin of cat domestication. *Science* 2007;317: 519-523.

Droz S, Chi B, Horn E, Steigerwalt AG, Whitney AM, Brenner DJ. *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. *J Clin Microbiol* 1999;37: 1117-1122.

Dumler JS. Anaplasma and Ehrlichia infection. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1063: 361-373.

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

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51: 2145-2165.

Dumler JS, Brouqui P. Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4: 559-569.

Dumler JS, Triggiani ER, Bakken JS, Aguero-Rosenfeld ME, Wormser GP. Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7: 6-8.

Duncan AW, Maggi RG, Breitschwerdt EB. *Bartonella* DNA in dog saliva. *Emerg Infect Dis* 2007;13: 1948-1950.

Duncan AW, Marr HS, Birkenheuer AJ, Maggi RG, Williams LE, Correa MT, Breitschwerdt EB. *Bartonella* DNA in the blood and lymph nodes of Golden Retrievers with lymphoma and in healthy controls. *J Vet Intern Med* 2008;22: 89-95.

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, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sundaram J, Daugherty SC, Davidsen T, Durkin AS, Gwinn M, Haft 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. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. PLoS Genet 2006;2: e21.

Ebani VV, Bertelloni F, Fratini F. Occurrence of Bartonella henselae types I and II in Central Italian domestic cats. Res Vet Sci 2012;93: 63-66.

Ebani V.V., Cerri D. and Andreani E., 2002. Cat scratch disease. Survey on the presence of Bartonella henselae among cats of Tuscany. The New Microbiologica, 25, 307–313.

Eberts MD, Vissotto de Paiva Diniz PP, Beall MJ, Stillman BA, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. Typical and atypical manifestations of Anaplasma phagocytophilum infection in dogs. J Am Anim Hosp Assoc 2011;47: e86-94.

Edouard S, Raoult D. [Bartonella henselae, an ubiquitous agent of proteiform zoonotic disease]. Med Mal Infect 2010;40: 319-330.

Egenvall A, Bjoersdorff A, Lilliehook I, Olsson Engvall E, Karlstam E, Artursson K, Hedhammar A, Gunnarsson A. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish Ehrlichia species isolate. Vet Rec 1998;143: 412-417.

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

Egenvall AE, Hedhammar AA, Bjoersdorff AI. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. Vet Rec 1997;140: 222-226.

Engbaek, K. and P.A. Lawson. 2004. Identification of *Bartonella* species in rodents, shrews and cats in Denmark: detection of two *B. henselae* variants, one in cats and the other in the long-tailed field mouse. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Pathol. 112: 336- 341.

Embers ME, Liang FT, Howell JK, Jacobs MB, Purcell JE, Norris SJ, Johnson BJ, Philipp MT. Antigenicity and recombination of VlsE, the antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*, in rabbits, a host putatively resistant to long-term infection with this spirochete. FEMS Immunol Med Microbiol 2007;50: 421-429.

Engel P, Dehio C. Genomics of host-restricted pathogens of the genus *Bartonella*. Genome Dyn 2009;6: 158-169.

Engel P, Salzburger W, Liesch M, Chang CC, Maruyama S, Lanz C, Calteau A, Lajus A, Medigue C, Schuster SC, Dehio C. Parallel evolution of a type IV secretion system in radiating lineages of the host-restricted bacterial pathogen *Bartonella*. PLoS Genet 2011;7: e1001296.

Fabbi M, De Giuli L, Tranquillo M, Bragoni R, Casiraghi M, Genchi C. Prevalence of *Bartonella henselae* in Italian stray cats: evaluation of serology to assess the risk of transmission of *Bartonella* to humans. J Clin Microbiol 2004;42: 264-268.

Fikrig E, Barthold SW, Sun W, Feng W, Telford SR, 3rd, Flavell RA. *Borrelia burgdorferi* P35 and P37 proteins, expressed in vivo, elicit protective immunity. Immunity 1997;6: 531-539.

Fikrig E, Feng W, Aversa J, Schoen RT, Flavell RA. Differential expression of *Borrelia burgdorferi* genes during erythema migrans and Lyme arthritis. J Infect Dis 1998;178: 1198-1201.

Fikrig E, Feng W, Barthold SW, Telford SR, 3rd, Flavell RA. Arthropod- and host-specific *Borrelia burgdorferi* bbb32 expression and the inhibition of spirochete transmission. J Immunol 2000;164: 5344-5351.

Foil L, Andress E, Freeland RL, Roy AF, Rutledge R, Triche PC, O'Reilly KL. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. J Med Entomol 1998;35: 625-628.

Foley J, Nieto NC, Madigan J, Sykes J. Possible differential host tropism in *Anaplasma phagocytophilum* strains in the Western United States. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1149: 94-97.

Foley JE, Foley P, Brown RN, Lane RS, Dumlers JS, Madigan JE. Ecology of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in the western United States. *J Vector Ecol* 2004;29: 41-50.

Foley JE, Foley P, Madigan JE. Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. *Am J Vet Res* 2001;62: 1599-1605.

Foley JE, Nieto NC, Adjemian J, Dabritz H, Brown RN. *Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal hosts of Ixodes ticks, western United States. *Emerg Infect Dis* 2008;14: 1147-1150.

Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, Mainardi JL, Marrie TJ, Bruneel F, Roure C, Nash J, Clave D, James E, Benoit-Lemercier C, Deforges L, Tissot-Dupont H, Raoult D. Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine (Baltimore)* 2001;80: 245-251.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wathley L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1997;390: 580-586.

Fresno M, Kopf M, Rivas L. Cytokines and infectious diseases. *Immunol Today* 1997;18: 56-58.

Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998;144 (Pt 5): 1189-1196.

GARY AT, WEBB JA, HEGARTY BC, BREITSCHWERDT EB. 2006. THE LOW SEROPREVALENCE OF TICK-TRANSMITTED AGENTS OF DISEASE IN DOGS FROM SOUTHERN ONTARIO AND QUEBEC. *CAN VET J.* 2006 DECEMBER; 47(12): 1194–1200

Ge Y, Rikihisa Y. Identification of novel surface proteins of *Anaplasma phagocytophilum* by affinity purification and proteomics. *J Bacteriol* 2007;189: 7819-7828.

Gokce HI, Ross G, Woldehiwet Z. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in ovine polymorphonuclear leucocytes by *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila*. *J Comp Pathol* 1999;120: 369-381.

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.

Gräser, Y., Klare, I., Halle, E., Gantenberg, R., Buchholz, P., Jacobi, HD., Presber, W., Schönian, G. (1933) Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 31(9):2417-20.

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.

Gravino AE, De Caprariis D, Manna L, Cerundolo R, Sagazio P, Buonavoglia C. Preliminary report of infection in dogs related to *Ehrlichia equi*: description of three cases. *New Microbiol* 1997;20: 361-363.

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

Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol* 1996;34: 44-48.

Gruntar I, Malovrh T, Murgia R, Cinco M. Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo. *APMIS* 2001;109: 383-388.

Guptill L. Bartonellosis. *Vet Microbiol* 2010;140: 347-359.

Guptill L, Slater L, Wu CC, Lin TL, Glickman LT, Welch DF, HogenEsch H. Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. *J Infect Dis* 1997;176: 206-216.

Guptill L, Slater LN, Wu CC, Lin TL, Glickman LT, Welch DF, Tobolski J, HogenEsch H. Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of *Bartonella henselae* in experimentally infected cats. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;65: 177-189.

Gurfield AN, Boulouis HJ, Chomel BB, Heller R, Kasten RW, Yamamoto K, Piemont Y. Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cats. *J Clin Microbiol* 1997;35: 2120-2123.

Gurfield AN, Boulouis HJ, Chomel BB, Kasten RW, Heller R, Bouillin C, Gandoi C, Thibault D, Chang CC, Barrat F, Piemont Y. Epidemiology of *Bartonella* infection in domestic cats in France. *Vet Microbiol* 2001;80: 185-198.

Guy L, Nystedt B, Sun Y, Naslund K, Berglund EC, Andersson SG. A genome-wide study of recombination rate variation in *Bartonella henselae*. *BMC Evol Biol* 2012;12: 65.

Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clin Microbiol Rev* 2012;25: 42-78.

Harvey JW, Simpson CF, Gaskin JM. Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. *J Infect Dis* 1978;137: 182-188.

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.

Heikkila HM, Bondarenko A, Mihalkov A, Pfister K, Spillmann T. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. *Acta Vet Scand* 2010;52: 62.

Heller R, Artois M, Xemar V, De Briel D, Gehin H, Jaulhac B, Monteil H, Piemont Y. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J Clin Microbiol* 1997;35: 1327-1331.

Henn JB, Gabriel MW, Kasten RW, Brown RN, Theis JH, Foley JE, Chomel BB. Gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) as a potential reservoir of a *Bartonella clarridgeiae*-like bacterium and domestic dogs as part of a sentinel system for surveillance of zoonotic arthropod-borne pathogens in northern California. *J Clin Microbiol* 2007;45: 2411-2418.

Hill EM, Raji A, Valenzuela MS, Garcia F, Hoover R. Adhesion to and invasion of cultured human cells by *Bartonella bacilliformis*. *Infect Immun* 1992;60: 4051-4058.

Hubner A, Yang X, Nolen DM, Popova TG, Cabello FC, Norgard MV. Expression of *Borrelia burgdorferi* OspC and DbpA is controlled by a RpoN-RpoS regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98: 12724-12729.

Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988;26: 2465-2466.

Inokuma, 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.

Inoue K, Maruyama S, Kabeya H, Kawanami K, Yanai K, Jitchum S, Jittaparaong S. Prevalence of *Bartonella* infection in cats and dogs in a metropolitan area, Thailand. *Epidemiol Infect* 2009;137: 1568-1573.

Iredell J, Blanckenberg D, Arvand M, Grauling S, Feil EJ, Birtles RJ. Characterization of the natural population of *Bartonella henselae* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2003;41: 5071-5079.

Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38: 1717-1722.

Johansson KE, Pettersson B, Uhlen M, Gunnarsson A, Malmqvist M, Olsson E. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. *Res Vet Sci* 1995;58: 109-112.

Kabeya H, Maruyama S, Irei M, Takahashi R, Yamashita M, Mikami T. Genomic variations among *Bartonella henselae* isolates derived from naturally infected cats. *Vet Microbiol* 2002;89: 211-221.

Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, Isogai E, Tahara K, Itagaki A, Hiramitsu Y, Tajima T. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2006;72: 1102-1109.

Kelly PJ, Matthewman LA, Hayter D, Downey S, Wray K, Bryson NR, Raoult D. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae* in southern Africa--evidence for infections in domestic cats and implications for veterinarians. *J S Afr Vet Assoc* 1996;67: 182-187.

Kelly TM, Padmalayam I, Baumstark BR. Use of the cell division protein FtsZ as a means of differentiating among *Bartonella* species. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5: 766-772.

Kernif T, Aissi M, Doumandji SE, Chomel BB, Raoult D, Bitam I. Molecular evidence of *Bartonella* infection in domestic dogs from Algeria, North Africa, by polymerase chain reaction (PCR). *Am J Trop Med Hyg* 2010;83: 298-300.

Killoran PB, O'Connell J, Mothershed EA, Probert WS. Rapid laboratory detection of meningococcal disease outbreaks caused by serogroup C *Neisseria meningitidis*. *J Microbiol Methods* 2006;67: 330-338.

Kitchell BE, Fan TM, Kordick D, Breitschwerdt EB, Wollenberg G, Lichtensteiger CA. Peliosis hepatis in a dog infected with *Bartonella henselae*. *J Am Vet Med Assoc* 2000;216: 519-523, 517.

Klempner MS, Noring R, Epstein MP, McCloud B, Hu R, Limentani SA, Rogers RA. Binding of human plasminogen and urokinase-type plasminogen activator to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis* 1995;171: 1258-1265.

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

Kordick DL, Breitschwerdt EB. Persistent infection of pets within a household with three *Bartonella* species. *Emerg Infect Dis* 1998;4: 325-328.

Kordick DL, Brown TT, Shin K, Breitschwerdt EB. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J Clin Microbiol* 1999;37: 1536-1547.

Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Breitschwerdt EB. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol* 1997;35: 1813-1818.

Kordick DL, Wilson KH, Sexton DJ, Hadfield TL, Berkhoff HA, Breitschwerdt EB. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J Clin Microbiol* 1995;33: 3245-3251.

Kordick SK, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Southwick KL, Colitz CM, Hancock SI, Bradley JM, Rumbough R, McPherson JT, MacCormack JN. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol* 1999;37: 2631-2638.

Kosoy M, Hayman DT, Chan KS. *Bartonella* bacteria in nature: where does population variability end and a species start? *Infect Genet Evol* 2012;12: 894-904.

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.

Kusaba N, Yoshida H, Shimokawa Y, Sata M. [Two cases of suspected *Bartonella henselae* infection from a dog]. *Kansenshogaku Zasshi* 1999;73: 930-934.

La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol* 1996;34: 2270-2274.

La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. *Trends Microbiol* 2003;11: 318-321.

Lam TT, Nguyen TP, Montgomery RR, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect Immun* 1994;62: 290-298.

Lappin MR, Breitschwerdt E, Brewer M, Hawley J, Hegarty B, Radecki S. Prevalence of *Bartonella* species antibodies and *Bartonella* species DNA in the blood of cats with and without fever. *J Feline Med Surg* 2009;11: 141-148.

Lappin MR, Breitschwerdt EB, Jensen WA, Dunnigan B, Rha JY, Williams CR, Brewer M, Fall M. Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in North America. *J Am Vet Med Assoc* 2004;225: 893-896, 879.

Lazarus JJ, Kay MA, McCarter AL, Wooten RM. Viable *Borrelia burgdorferi* enhances interleukin-10 production and suppresses activation of murine macrophages. *Infect Immun* 2008;76: 1153-1162.

Lepidi H, Bunnell JE, Martin ME, Madigan JE, Stuen S, Dumler JS. Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62: 29-37.

Lester SJ, Breitschwerdt EB, Collis CD, Hegarty BC. *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. *Can Vet J* 2005;46: 825-827.

Levi O, Waner T, Baneth G, Keysary A, Bruchim Y, Silverman J, Harrus S. 2006. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among healthy dogs and horses in Israel. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. Mar;53(2):78-80.

Levin ML, Nicholson WL, Massung RF, Sumner JW, Fish D. Comparison of the reservoir competence of medium-sized mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002;2: 125-136.

Levy S, O'Connor TP, Hanscom JL, Shields P. Utility of an in-office C6 ELISA test kit for determination of infection status of dogs naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. *Vet Ther* 2002;3: 308-315.

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

Li DM, Meng FX, Song XP, Qin ZJ, Yang XR, Wu HX, Ren DS, Liu QY. [Study on *Bartonella vinsonii berkhoffii* isolated from blood of native dogs in China]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2006;27: 333-338.

Li W, Chomel BB, Maruyama S, Guptil L, Sander A, Raoult D, Fournier PE. Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *J Clin Microbiol* 2006;44: 2499-2506.

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.

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;9: 2644-2657.

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.

Lindroos H, Vinnere O, Mira A, Repsilber D, Naslund K, Andersson SG. Genome rearrangements, deletions, and amplifications in the natural population of *Bartonella henselae*. *J Bacteriol* 2006;188: 7426-7439.

Lista F, Faggioni G, Valjevac S, Ciammaruconi A, Vaissaire J, le Doujet C, Gorge O, De Santis R, Carattoli A, Ciervo A, Fasanella A, Orsini F, D'Amelio R, Pourcel C, Cassone A, Vergnaud G. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC Microbiol* 2006;6: 33.

Little SE. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010;40: 1121-1140.

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

Liz JS. Ehrlichiosis in *Ixodes ricinus* and wild mammals. *Int J Med Microbiol* 2002;291 Suppl 33: 104-105.

Luria BJ, Levy JK, Lappin MR, Breitschwerdt EB, Legendre AM, Hernandez JA, Gorman SP, Lee IT (2004) Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6, 287e296.

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

MacDonald KA, Chomel BB, Kittleson MD, Kasten RW, Thomas WP, Pesavento P. A prospective study of canine infective endocarditis in northern California (1999-2001): emergence of *Bartonella* as a prevalent etiologic agent. *J Vet Intern Med* 2004;18: 56-64.

Maggi RG, Chomel B, Hegarty BC, Henn J, Breitschwerdt EB. A *Bartonella vinsonii berkhoffii* typing scheme based upon 16S-23S ITS and Pap31 sequences from dog, coyote, gray fox, and human isolates. *Mol Cell Probes* 2006;20: 128-134.

Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven bartonella species. *J Clin Microbiol* 2005;43: 2651-2655.

Magnarelli L, Ijdo J, Wu C, Fikrig E. Recombinant protein-44-based class-specific enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20: 482-485.

Magnarelli LA, Bushmich SL, JW IJ, Fikrig E. Seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in cats. *Am J Vet Res* 2005;66: 1895-1899.

Magnarelli LA, Ijdo JW, Van Andel AE, Wu C, Fikrig E. Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses. *Am J Vet Res* 2001;62: 29-32.

Magnarelli LA, Ijdo JW, Anderson JF, Madigan JE, Dumler JS, Fikrig E. 1997. Antibodies to *Ehrlichia equi* in dogs from the northeastern United States. *J Am Vet Med Assoc*. Nov 1;211(9):1134-7.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95: 3140-3145.

Maillard R, Riegel P, Barrat F, Bouillin C, Thibault D, Gandoin C, Halos L, Demanche C, Alliot A, Guillot J, Piemont Y, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M. *Bartonella chomelii* sp. nov., isolated from French domestic cattle (*Bos taurus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54: 215-220.

Maillard R, Vayssier-Taussat M, Bouillin C, Gandoin C, Halos L, Chomel B, Piemont Y, Boulouis HJ. Identification of *Bartonella* strains isolated from wild and domestic ruminants by a single-step PCR analysis of the 16S-23S intergenic spacer region. *Vet Microbiol* 2004;98: 63-69.

Mandle T, Einsele H, Schaller M, Neumann D, Vogel W, Autenrieth IB, Kempf VA. Infection of human CD34⁺ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. *Blood* 2005;106: 1215-1222.

Marconi RT, Konkel ME, Garon CF. Variability of *osp* genes and gene products among species of Lyme disease spirochetes. *Infect Immun* 1993;61: 2611-2617.

Marston EL, Finkel B, Regnery RL, Winoto IL, Graham RR, Wignall S, Simanjuntak G, Olson JG. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in an urban Indonesian cat population. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6: 41-44.

Maruyama S, Izumikawa K, Miyashita M, Kabeya H, Mikami T, Yamanouchi H, Sasaki E, Yoshida H. First isolation of *Bartonella henselae* type I from a cat-scratch disease patient in Japan and its molecular analysis. *Microbiol Immunol* 2004;48: 103-109.

Massung RF, Courtney JW, Hiratzka SL, Pitzer VE, Smith G, Dryden RL. *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. *Emerg Infect Dis* 2005;11: 1604-1606.

Massung RF, Levin ML, Miller NJ, Mather TN. Reservoir competency of goats for *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1078: 476-478.

Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. J Clin Microbiol 2003;41: 717-722.

Matar GM, Swaminathan B, Hunter SB, Slater LN, Welch DF. Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* species for subtyping. J Clin Microbiol 1993;31: 1730-1734.

Maurin M, Birtles R, Raoult D. Current knowledge of *Bartonella* species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997;16: 487-506.

Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. J Clin Microbiol 1997;35: 2283-2287.

Maurin M, Rolain JM, Raoult D. Comparison of in-house and commercial slides for detection by immunofluorescence of immunoglobulins G and M against *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. Clin Diagn Lab Immunol 2002;9: 1004-1009.

McElroy K, Blagburn B, Breitschwerdt E, Mead P, McQuiston J. Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. Trends Parasitol 2010;26: 197-204.

Melter O, Hercík K, Weyant RS, Janecek J, Nemec A, Mecera J, Gonzorová L, Branny P. 2003. Detection and characterization of feline *Bartonella henselae* in the Czech Republic. Vet Microbiol. May 29;93(3):261-73.

Mernaugh G, Ihler GM. Deformation factor: an extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* that deforms erythrocyte membranes. Infect Immun 1992;60: 937-943.

Mikolajczyk MG, O'Reilly KL. Clinical disease in kittens inoculated with a pathogenic strain of *Bartonella henselae*. Am J Vet Res 2000;61: 375-379.

Minnick MF. Identification of outer membrane proteins of *Bartonella bacilliformis*. Infect Immun 1994;62: 2644-2648.

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.

Mitchell SJ, Minnick MF. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infect Immun* 1995;63: 1552-1562.

Monteil M, Durand B, Bouchouicha R, Petit E, Chomel B, Arvand M, Boulouis HJ, Haddad N. Development of discriminatory multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Bartonella henselae*. *Microbiology* 2007;153: 1141-1148.

Morissette E, Massung RF, Foley JE, Alleman AR, Foley P, Barbet AF. Diversity of *Anaplasma phagocytophilum* strains, USA. *Emerg Infect Dis* 2009;15: 928-931.

Muller NF, Kaiser PO, Linke D, Schwarz H, Riess T, Schafer A, Eble JA, Kempf VA. Trimeric autotransporter adhesin-dependent adherence of *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Yersinia enterocolitica* to matrix components and endothelial cells under static and dynamic flow conditions. *Infect Immun* 2011;79: 2544-2553.

Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurti TJ, Nelson RD, Goodman JL. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet Microbiol* 2004;101: 53-64.

Musso T, Badolato R, Ravarino D, Stornello S, Panzanelli P, Merlino C, Savoia D, Cavallo R, Ponzi AN, Zucca M. Interaction of *Bartonella henselae* with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response. *Infect Immun* 2001;69: 5974-5980.

Nasirudeen, A.M., Thong, M.L. (1999) Prevalence of *Bartonella henselae* immunoglobulin G antibodies in Singaporean cats. *Pediatr.Infect. Dis. J.* 18: 276-278.

Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol* 2010;26: 205-212.

Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol* 1995;33: 1797-1803.

Nutter FB, Dubey JP, Levine JF, Breitschwerdt EB, Ford RB, Stoskopf MK. Seroprevalences of antibodies against *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* and fecal shedding of *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp, and *Toxocara cati* in feral and pet domestic cats. *J Am Vet Med Assoc* 2004;225: 1394-1398.

O'Reilly KL, Bauer RW, Freeland RL, Foil LD, Hughes KJ, Rohde KR, Roy AF, Stout RW, Triche PC. Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of *Bartonella henselae* (LSU16). *Infect Immun* 1999;67: 3066-3072.

Ogden NH, Casey AN, French NP, Woldehiwet Z. A review of studies on the transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from sheep: implications for the force of infection in endemic cycles. *Exp Appl Acarol* 2002;28: 195-202.

Ohashi N, Zhi N, Lin Q, Rikihisa Y. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. *Infect Immun* 2002;70: 2128-2138.

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.

Olsen B, Jaenson TG, Bergstrom S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol* 1995;61: 3082-3087.

Olsen B, Jaenson TG, Noppa L, Bunikis J, Bergstrom S. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature* 1993;362: 340-342.

Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J* 1993;7: 113-123.

Pappalardo BL, Brown T, Gebhardt D, Sontakke S, Breitschwerdt EB. Cyclic CD8⁺ lymphopenia in dogs experimentally infected with *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;75: 43-57.

Pappalardo BL, Brown TT, Tompkins M, Breitschwerdt EB. Immunopathology of *Bartonella vinsonii* (berkhoffii) in experimentally infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;83: 125-147.

Pappalardo BL, Correa MT, York CC, Peat CY, Breitschwerdt EB. Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs. *Am J Vet Res* 1997;58: 467-471.

Park J, Kim KJ, Grab DJ, Dumler JS. *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein-2 (Msp2) forms multimeric complexes in the bacterial membrane. *FEMS Microbiol Lett* 2003;227: 243-247.

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

Pitulle C, Strehse C, Brown JW, Breitschwerdt EB. Investigation of the phylogenetic relationships within the genus *Bartonella* based on comparative sequence analysis of the *rnpB* gene, 16S rDNA and 23S rDNA. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52: 2075-2080.

Podsiadly E, Sokolowska E, Tylewska-Wierzbanska S. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* infections in Poland in 1998-2001. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990: 407-408.

Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *J Clin Microbiol* 2005;43: 796-801.

Pons I, Sanfeliu I, Quesada M, Anton E, Sampere M, Font B, Pla J, Segura F. Prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Catalonia, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72: 453-457.

Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J Med Microbiol* 1998;47: 235-251.

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.

Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C, Litschi B, Parvis A, Lutz H. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1997;35: 2307-2309.

Pusterla N, Huder JB, Leutenegger CM, Braun U, Madigan JE, Lutz H. Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 1999;37: 1329-1331.

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

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

Rand PW, Lacombe EH, Elias SP, Cahill BK, Lubelczyk CB, Smith RP Jr. 2011. Multitarget test for emerging Lyme disease and anaplasmosis in a serosurvey of dogs, Maine, USA. *Emerg Infect Dis.* May;17(5):899-902.

Ravnik U, Tozon N, Smrdel KS, Zupanc TA. Anaplasmosis in dogs: the relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. *Vet Microbiol* 2011;149: 172-176.

Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, 3rd, Rodriguez-Barradas MC, Jones DC, Carr JH. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 1992;30: 265-274.

Reis C, Cote M, Le Rhun D, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, Bonnet SI. Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5: e1186.

Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 1990;323: 1573-1580.

Resto-Ruiz SI, Schmiederer M, Sweger D, Newton C, Klein TW, Friedman H, Anderson BE. Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* 2002;70: 4564-4570.

Revel AT, Talaat AM, Norgard MV. DNA microarray analysis of differential gene expression in

Borrelia burgdorferi, the Lyme disease spirochete. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99: 1562-1567.

Rhomberg TA, Truttmann MC, Guye P, Ellner Y, Dehio C. A translocated protein of *Bartonella henselae* interferes with endocytic uptake of individual bacteria and triggers uptake of large bacterial aggregates via the invasome. *Cell Microbiol* 2009;11: 927-945.

Riess T, Andersson SG, Lupas A, Schaller M, Schafer A, Kyme P, Martin J, Walzlein JH, Eehalt U, Lindroos H, Schirle M, Nordheim A, Autenrieth IB, Kempf VA. *Bartonella* adhesin A mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* 2004;200: 1267-1278.

Riess T, Raddatz G, Linke D, Schafer A, Kempf VA. Analysis of *Bartonella* adhesin A expression reveals differences between various *B. henselae* strains. *Infect Immun* 2007;75: 35-43.

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

Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Microbiol Rev* 2011;24: 469-489.

Rikihisa Y, Lin M. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* type IV secretion and Ank proteins. *Curr Opin Microbiol* 2010;13: 59-66.

Rodriguez-Barradas MC, Hamill RJ, Houston ED, Georgiou PR, Clarridge JE, Regnery RL, Koehler JE. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J Clin Microbiol* 1995;33: 1089-1093.

Rolain JM, Foucault C, Brouqui P, Raoult D. Erythroblast cells as a target for *Bartonella quintana* in homeless people. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990: 485-487.

Rolain JM, Fournier PE, Raoult D, Bonerandi JJ. First isolation and detection by immunofluorescence assay of *Bartonella koehlerae* in erythrocytes from a French cat. *J Clin Microbiol* 2003;41: 4001-4002.

Rolain JM, Vayssier-Taussat M, Gimenez G, Robert C, Fournier PE, Raoult D. Genome sequence of

- Bartonella birtlesii*, a bacterium isolated from small rodents of the genus *Apodemus*. *J Bacteriol* 2012;194: 4779.
- Rosa PA, Tilly K, Stewart PE. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nat Rev Microbiol* 2005;3: 129-143.
- Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, Raoult D. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. *J Clin Microbiol* 2000;38: 1698-1700.
- Saenz HL, Engel P, Stoeckli MC, Lanz C, Raddatz G, Vayssier-Taussat M, Birtles R, Schuster SC, Dehio C. Genomic analysis of *Bartonella* identifies type IV secretion systems as host adaptability factors. *Nat Genet* 2007;39: 1469-1476.
- Sander A, Buhler C, Pelz K, von Cramm E, Brecht W. Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *J Clin Microbiol* 1997;35: 584-587.
- Sander A, Zagrosek A, Brecht W, Schiltz E, Piemont Y, Lanz C, Dehio C. Characterization of *Bartonella clarridgeiae* flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with lymphadenopathy. *J Clin Microbiol* 2000;38: 2943-2948.
- Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg Infect Dis* 2003;9: 329-332.
- Scaife H, Woldehiwet Z, Hart CA, Edwards SW. *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. *Infect Immun* 2003;71: 1995-2001.
- Schuijt TJ, Hovius JW, van Burgel ND, Ramamoorthi N, Fikrig E, van Dam AP. The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infect Immun* 2008;76: 2888-2894.
- Schulein R, Seubert A, Gille C, Lanz C, Hansmann Y, Piemont Y, Dehio C. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen

Bartonella. J Exp Med 2001;193: 1077-1086.

Schulte B, Linke D, Klumpp S, Schaller M, Riess T, Autenrieth IB, Kempf VA. Bartonella quintana variably expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence. Infect Immun 2006;74: 5003-5013.

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.

Seubert A, Hiestand R, de la Cruz F, Dehio C. A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. Mol Microbiol 2003;49: 1253-1266.

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

Silaghi C, Kohn B, Chirek A, Thiel C, Nolte I, Liebisch G, Pfister K. Relationship of molecular and clinical findings on Anaplasma phagocytophilum involved in natural infections of dogs. J Clin Microbiol 2011;49: 4413-4414.

Silaghi C, Liebisch G, Pfister K. Genetic variants of Anaplasma phagocytophilum from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. Parasit Vectors 2011;4: 161.

Simpson WJ, Burgdorfer W, Schrumph ME, Karstens RH, Schwan TG. Antibody to a 39-kilodalton Borrelia burgdorferi antigen (P39) as a marker for infection in experimentally and naturally inoculated animals. J Clin Microbiol 1991;29: 236-243.

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.

Skotarczak B, Wodecka B. Identification of Borrelia burgdorferi genospecies inducing Lyme disease in dogs from Western Poland. Acta Vet Hung 2005;53: 13-21.

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.

Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med 2001;345: 115-125.

Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. Arthritis Rheum 1977;20: 7-17.

Stoenner HG, Dodd T, Larsen C. Antigenic variation of Borrelia hermsii. J Exp Med 1982;156: 1297-1311.

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.

Straubinger RK, Straubinger AF, Harter L, Jacobson RH, Chang YF, Summers BA, Erb HN, Appel MJ. Borrelia burgdorferi migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. Infect Immun 1997;65: 1273-1285.

Struelens M, Denis O. Methicillin resistant Staphylococcus aureus: toward a coordinated response to a continuing challenge. Euro Surveill 2000;5: 25-26.

Sukumaran B, Mastrorunzio JE, Narasimhan S, Fankhauser S, Uchil PD, Levy R, Graham M, Colpitts TM, Lesser CF, Fikrig E. Anaplasma phagocytophilum AptA modulates Erk1/2 signalling. Cell Microbiol 2011;13: 47-61.

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.

Tarello W. Microscopic and clinical evidence for Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum infection in Italian cats. Vet Rec 2005;156: 772-774.

Telford SR, 3rd, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93: 6209-6214.

Torina, A., Vicente, J., Alongi, A., Scimeca, S., Turla', R., Nicosia, S., Di Marco, V., Caracappa, S., de la Fuente, J., 2007. Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003–2005. *Zoonoses Public Health* 54, 8–15.

Truttmann MC, Guye P, Dehio C. BID-F1 and BID-F2 domains of Bartonella henselae effector protein BepF trigger together with BepC the formation of invasome structures. *PLoS One* 2011;6: e25106.

Tsai YL, Chang CC, Chuang ST, Chomel BB. Bartonella species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011;34: 299-314.

Tsai YL, Chuang ST, Chang CC, Kass PH, Chomel BB. 2010. [Bartonella species in small mammals and their ectoparasites in Taiwan](#). *Am J Trop Med Hyg*. Oct;83(4):917-23.

Tsukahara M, Tsuneoka H, Iino H, Ohno K, Murano I. Bartonella henselae infection from a dog. *Lancet* 1998;352: 1682.

Ueno H, Hohdatsu T, Muramatsu Y, Koyama H, Morita C. Does coinfection of Bartonella henselae and FIV induce clinical disorders in cats? *Microbiol Immunol* 1996;40: 617-620.

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.

Vayssier-Taussat M, Le Rhun D, Deng HK, Biville F, Cescau S, Danchin A, Marignac G, Lenaour E, Boulouis HJ, Mavris M, Arnaud L, Yang H, Wang J, Quebatte M, Engel P, Saenz H, Dehio C. The Trw type IV secretion system of Bartonella mediates host-specific adhesion to erythrocytes. *PLoS Pathog* 2010;6: e1000946.

Vermi W, Facchetti F, Riboldi E, Heine H, Scutera S, Stornello S, Ravarino D, Cappello P, Giovarelli M, Badolato R, Zucca M, Gentili F, Chilosi M, Doglioni C, Ponzi AN, Sozzani S, Musso T. Role of dendritic cell-derived CXCL13 in the pathogenesis of Bartonella henselae B-rich granuloma. *Blood* 2006;107: 454-462.

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.

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.

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.

Walker DH, Dumler JS. Human monocytic and granulocytic ehrlichioses. Discovery and diagnosis of emerging tick-borne infections and the critical role of the pathologist. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121: 785-791.

Walker TS, Winkler HH. *Bartonella bacilliformis*: colonial types and erythrocyte adherence. *Infect Immun* 1981;31: 480-486.

Walls JJ, Greig B, Neitzel DF, Dumler JS. Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1997;35: 853-855.

Wang G, van Dam AP, Dankert J. Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1999;37: 3025-3028.

Welch DF. Family II. Bartonellaceae. New York: Springer, 2005.

Welch DF, Pickett DA, Slater LN, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J Clin Microbiol* 1992;30: 275-280.

Wirtgen M, Nahayo A, Linden A, Losson B, Garigliany M, Desmecht D. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Vet Rec* 2011;168: 195.

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 bacteria. *Vet Microbiol* 1996;48: 257-268.

Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987;51: 221-271.

Woldehiwet Z, Scott GR. Tick-borne fever: leucocyte migration inhibition. *Vet Microbiol* 1982;7: 437-445.

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.

Xia Z, Yu D, Mao J, Zhang Z, Yu J. 2012. The occurrence of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in China. *J Helminthol.* 2012 Jun;86(2):185-9. Epub 2011 May 11.

Yoshiie K, Kim HY, Mott J, Rikihisa Y. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. *Infect Immun* 2000;68: 1125-1133.

Zeaiter Z, Fournier PE, Ogata H, Raoult D. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing groEL sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52: 165-171.

Zeaiter Z, Liang Z, Raoult D. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial ftsZ gene sequences. *J Clin Microbiol* 2002;40: 3641-3647.

Zhang P, Chomel BB, Schau MK, Goo JS, Droz S, Kelminson KL, George SS, Lerche NW, Koehler JE. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 13630-13635.

Zimmermann R, Kempf VA, Schiltz E, Oberle K, Sander A. Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from *Bartonella henselae*. *J Bacteriol* 2003;185: 1739-1744.