

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

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



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

Contribution à l'étude des bactéries zoonotiques
à transmission vectorielle chez les chiens et les chats errants
et leurs ectoparasites par des méthodes moléculaires
dans la région d'Alger

Présentée par : M^{me} Amina BESSAS épouse BOUZIDI

Soutenue publiquement le : 04/07/2017

Les membres du jury :

M ^{me} TEMIM S.	Professeur	Présidente	ENSV-Alger
M ^r BITAM I.	Maître de Conférences A	Directeur de thèse	ESSAIA - Alger
M ^{me} AIT-LOUDHIA K.	Professeur	Co-directrice	ENSV - Alger
M ^r HAMRIOUI B.	Professeur	Examineur	CHU- Mustapha Bacha - Alger
M ^{me} ZIANE H.	Maître de Conférences A	Examinatrice	CHU- Mustapha Bacha - Alger
M ^{me} MILLA A.	Maître de Conférences A	Examinatrice	ENSV - Alger

Année universitaire : 2016/2017

Au nom de Dieu Clément et Miséricordieux

Je dédis cet humble travail ;

À mon cher Mari,

pour sa présence constante à mes côtés, son écoute et ses encouragements permanents et surtout sa patience.

À mes parents,

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

À mon frère, mes sœurs et mes beaux frères, pour leur affection et cette unité familiale formidable, Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères sentiments.

Remerciements

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

Je tiens à remercier mon Directeur de thèse, Mr BITAM, qui m'a aidé à percer mon chemin dans le savoir, en témoignage de son dynamisme et de son implication dans la recherche, j'exprime par ces quelques mots ma profonde reconnaissance.

Remerciement particulier au Pr PAROLA, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a encadré, j'espère avoir été à la hauteur de son attente. Qu'il voit dans cet aboutissement le témoignage de ma grande gratitude.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements :

À ma co-promotrice, Mme AIT-LOUDHIA, pour son soutien moral, ses encouragements et ses précieux conseils.

À Madame TEMIM, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse, Hommages respectueux.

À Monsieur HAMRIOUI, qui a eu la bienveillance d'accepter de faire partie de mon jury. C'est avec intérêt que j'attends vos avis.

À Madame MILLA et madame ZIANE, qui m'ont fait l'honneur d'accepter l'évaluation et la critique de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Didier RAOULT pour m'avoir accepté et accueilli chaleureusement au sein de l'unité des Rickettsies à Marseille. Egalement un grand merci à l'université de Laghouat pour les allocations de stage.

J'exprime mes vifs remerciements à Docteur Leulmi Hamza pour son aide précieuse dans la partie pratique et surtout sa disponibilité.

Je remercie infiniment Madame Zénia, pour sa contribution dans l'analyse statistique de mes résultats, sans oublier Madame Aissi pour sa participation dans cette recherche et surtout sa générosité.

Ma profonde gratitude s'adresse aussi à l'ensemble du personnel de l'HURBAL et spécialement à Mme Saidi et Mme Zerouk, pour avoir mis à ma disposition les chiens et les chats de la fourrière canine d'Alger.

Enfin, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Résumé

Contribution à l'étude des bactéries zoonotiques à transmission vectorielle chez les chiens et les chats errants et leurs ectoparasites par des méthodes moléculaires dans la région d'Alger

Généralités : Au cours des dernières années, les maladies vectorielles canines et félines ont émergé montrant une large répartition géographique et sont devenues un problème de santé mondial. Cependant, peu d'informations sont actuellement disponibles sur la prévalence de ces maladies chez les animaux de compagnie en Algérie. Le but de ce travail était de détecter et de caractériser les pathogènes transmis par des vecteurs chez les chiens et les chats errants et leurs ectoparasites en provenance d'Alger.

Méthodes: La présence de *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis*, *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. et *Borrelia* spp. a été évaluée par la PCR quantitative en temps réel dans des échantillons de rates, de tiques et de puces des chiens et des chats de la fourrière canine d'Alger durant la période de 2010 à 2013. Les bactéries ont été ensuite identifiées par la qPCR spécifique ou la PCR standard suivie par le séquençage.

Résultats: 18/117 (15,38%) chiens testés étaient positifs à au moins un agent, incluant un seul animal co-infecté par deux agents. *C. burnetii* et *B. henselae* ont été identifiées séparément chez 1 (0,85%) chien. L'ADN de *E. canis* a été détecté dans 17 (14,52%) chiens. A partir de 107 chats prélevés, 2 (1,87%) étaient positifs. Un (0,93%) chat était positive à *C. burnetii* et un autre (0,93%) à *B. henselae*.

L'ADN de *R. massiliae*, *R. conorii* et *E. canis* a été détecté dans les tiques *Rhipicephalus sanguineus*. Les puces du chat *Ctenocephalides felis* étaient infectées par *R. felis*, *B. henselae* et *B. clarridgeiae*. Alors que *Xenopsylla cheopis* collectées sur des chiens ont été trouvées hébergeant *B. vinsonii subsp. berkhoffii*.

Conclusions: À notre connaissance, c'est la première identification de *C. burnetii* chez les animaux en Algérie. C'est également la première évidence moléculaire de *B. henselae* et *B. vinsonii subsp. berkhoffii* chez les puces et de *E. canis* chez les tiques. La présente étude met l'accent sur la valeur de la surveillance des pathogènes zoonotiques à transmission vectorielle dans notre pays.

Mots-clés: Chien, chat, tique, puce, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis*, *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp., qPCR, Alger, Algérie.

Abstract

Contribution to the study of vector-borne zoonotic bacteria in stray dogs and cats and their ectoparasites by molecular methods in the region of Algiers

Background: In recent years, canine and feline vector-borne diseases have emerged showing a wide geographic distribution and have become a world health concern. However, only limited information is currently available on the prevalence of these diseases in companion animals in Algeria. The aim of the present work was to detect and characterize vector borne pathogens in stray dogs and cats and their ectoparasites from Algiers.

Methods: The presence of *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis*, *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. was evaluated by quantitative real-time PCR in spleen samples, ticks and fleas of dogs and cats from animal shelters of Algiers during the period from 2010 to 2013. Bacteria were then identified by specific qPCR or regular PCR followed by sequencing.

Results: 18/117 (15.38 %) tested dogs were positive to at least one agent, including only one animal co-infected with two agents. *C. burnetii* and *B. henselae* were identified in 1 (0.85 %) dog individually. DNA of *E. canis* was detected in 17 (14.52 %) dogs. Out of the 107 cats sampled, 2 (1.87%) were positive. One (0.93%) cat was positive to *C. burnetii* and another (0.93%) to *B. henselae*.

DNA of *R. massiliae*, *R. conorii* and *E. canis* was detected in *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Cat fleas *Ctenocephalides felis* were infected with *R. felis*, *B. henselae* and *B. clarridgeiae*. While *Xenopsylla cheopis* collected from dogs were found harboring *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*.

Conclusions: To our knowledge, this is the first identification of *C. burnetii* in animals in Algeria. This is also the first molecular evidence of *B. henselae* and *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* in fleas and *E. canis* in ticks. The current study focuses on the value of surveillance for vector borne zoonotic pathogens in our country.

Keywords: Dog, cat, tick, flea, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis*, *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp., qPCR, Algiers, Algeria.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale..... 1

Chapitre 1: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1ère PARTIE : Les vecteurs arthropodes

I. IXODIDAE (LES TIQUES)	3
I.1. Généralités.....	3
I.2. Position systématique.....	3
I.3. Anatomie.....	4
I.4. Cycle de vie.....	5
I.5. Rôle pathogène des tiques.....	6
II. SIPHONAPTERES (LES PUCES)	7
II.1. Généralités.....	7
II.2. Position systématique.....	7
II.3. Anatomie.....	7
II.4. Cycle de vie.....	9
II.5. Rôle pathogène des puces.....	9
III. PHTHIRAPTERES (LES POUX)	10
III.1. Généralités.....	10
III.2. Position systématique.....	10
III.3. Anatomie.....	10
III.3.1. Morphologie des mallophages.....	10
III.3.2. Morphologie des anoploures.....	11
III.4. Cycle de vie.....	12
III.5. Rôle pathogène des poux.....	12

2ème PARTIE : Les maladies bactériennes à transmission vectorielle

I. LES RICKETTSIOSES.....	14
I.1. Généralités.....	14
I.2. Etude de l'agent causal.....	14
I.2.1. Taxonomie.....	14
I.2.2. Bactériologie.....	16
I.3. Épidémiologie.....	16
I.3.1. Agents pathogènes.....	16
I.3.2. Réservoirs.....	17
I.3.2.1. Infection par <i>Rickettsia conorii</i> et <i>Rickettsia rickettsii</i>	17
I.3.2.2. Infection par <i>Rickettsia felis</i>	18
I.3.2.3. Infection par <i>Rickettsia typhi</i>	18
I.3.3. Mode de contamination.....	19
I.4. Étude clinique.....	19
I.5. La maladie chez l'homme.....	20

I.6. Diagnostic.....	20
I.7. Prophylaxie.....	21
II. LES BARTONELLOSES.....	22
II.1. Généralités.....	22
II.2. Étude de l'agent causal.....	22
II.2.1. Taxonomie.....	22
II.2.2. Bactériologie.....	23
II.3. Épidémiologie.....	23
II.3.1. Réservoirs.....	23
II.3.1.1. Réservoir félin.....	23
II.3.1.2. Réservoir canin.....	24
II.3.2. Vecteurs.....	24
II.3.3. Mode de transmission.....	25
II.4. Étude clinique.....	26
II.5. La maladie chez l'homme.....	26
II.6. Diagnostic.....	26
II.7. Prophylaxie.....	27
III. LA FIEVRE Q.....	28
III.1. Généralités.....	28
III.2. Étude de l'agent causal.....	28
III.2.1. Taxonomie.....	28
III.2.2. Bactériologie.....	28
III.3. Épidémiologie.....	29
III.3.1. Réservoirs.....	29
III.3.2. Vecteurs.....	30
III.3.3. Source et mode de transmission.....	30
III.4. Étude clinique.....	31
III.5. La maladie chez l'homme.....	31
III.6. Diagnostic.....	31
III.7. Prophylaxie.....	32
III.8. Conclusion.....	32
IV. L'EHRlichiose Monocytaire Canine.....	33
IV.1. Généralités.....	33
IV.2. Étude de l'agent causal.....	33
IV.2.1. Taxonomie.....	33
IV.2.2. Bactériologie.....	34
IV.3. Épidémiologie.....	34
IV.3.1. Réservoirs.....	34
IV.3.2. Vecteurs.....	35
IV.3.3. Mode de transmission.....	35
IV.4. Étude clinique.....	35
IV.5. La maladie chez l'homme.....	36
IV.6. Diagnostic.....	36
IV.7. Prophylaxie.....	37
V. LA BORRELIOSE DE LYME.....	37
V.1. Généralités.....	37
V.2. Étude de l'agent causal.....	37
V.2.1. Taxonomie.....	37
V.2.2. Bactériologie.....	38
V.3. Épidémiologie.....	38
V.3.1. Réservoirs.....	38

V.3.2. Vecteurs.....	40
V.3.3. Mode de transmission.....	40
V.4. Étude clinique.....	40
V.5. La maladie chez l'homme.....	41
V.6. Diagnostic.....	41
V.7. Prophylaxie.....	42

CHAPITRE 2 : MATERIELS & METHODES

I. SITE D'ETUDE.....	43
II. COLLECTE DE PRELEVEMENTS.....	43
II.1. Evaluation éthique et scientifique.....	44
II.2. Présentation de la fourrière canine.....	44
II.3. Types et techniques de prélèvement.....	45
II.4. Conservation des échantillons.....	45
III. IDENTIFICATION DES ECTOPARASITES.....	45
III.1. Base d'identification des tiques.....	46
III.2. Base d'identification des puces.....	46
III.3. Base d'identification des poux.....	47
IV. ANALYSES MOLECULAIRES.....	48
IV.1. Extraction d'ADN.....	48
IV.2. PCR en temps réel (qPCR)	49
IV.2.1. Préparation du mix.....	49
IV.2.2. Ajout des ADNs au mix.....	50
IV.2.3. Systèmes et contrôles positifs utilisés lors de la qPCR.....	50
IV.2.4. Programmation et lancement de la qPCR.....	53
IV.3. PCR standard.....	54
IV.3.1. Préparation du mix.....	54
IV.3.2. Ajout des ADNs aux mix.....	56
IV.3.3. Programmation et lancement de la PCR standard.....	56
IV.3.4. Électrophorèse.....	57
IV.4. Séquençage de l'ADN.....	59
IV.4.1. Protocole.....	59
IV.4.2. Traitement et analyse des données.....	63
V. ANALYSES STATISTIQUES.....	64

CHAPITRE 3 : RESULTATS

I. DESCRIPTION DE LA POPULATION ANIMALE ETUDIEE.....	65
I.1. Répartition des animaux en fonction du sexe.....	65
I.2. Répartition des animaux en fonction de l'âge.....	65
I.3. Répartition des animaux en fonction de la race.....	66
I.4. Répartition des animaux en fonction du statut clinique.....	67
I.5. Répartition des animaux en fonction de l'infestation par les ectoparasites.....	67
II. RESULTATS DE L'IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE DES ECTOPARASITES.....	68
III. RÉSULTATS DES ANALYSES DE LABORATOIRE.....	72
III.1. Echantillons analysés.....	72
III.2. Détection moléculaire des bactéries pathogènes.....	72
III.2.1. Les résultats obtenus chez les chiens.....	73
III.2.2. Les résultats obtenus chez les chats.....	73

III.2.3. Les résultats obtenus chez les arthropodes.....	75
IV. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS OBTENUS.....	79
IV.1. Etude de l'effet de quelques paramètres sur le taux de positivité.....	79
IV.1.1. Chez l'espèce canine.....	79
IV.1.1.1. Répartition des maladies vectorielles en fonction du sexe.....	79
IV.1.1.2. Répartition des maladies vectorielles en fonction de l'âge.....	80
IV.1.1.3. Répartition des maladies vectorielles en fonction de la race.....	80
IV.1.1.4. Répartition des maladies vectorielles en fonction du statut clinique.....	81
IV.1.1.5. Répartition des maladies vectorielles en fonction de l'infestation par les arthropodes.....	82
IV.1.2. Chez l'espèce féline.....	83
IV.2. Etude de la relation entre l'infection chez les animaux et leurs arthropodes.....	83
IV.2.1. Chez l'espèce canine.....	83
IV.2.2. Chez l'espèce féline.....	84
<u>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</u>	86
Conclusion et perspectives.....	93
Références bibliographiques.....	94
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1	: Les principaux ectoparasites infestant les chiens et les chats.....	13
Tableau 2	: Les espèces de <i>Bartonella</i> détectées dans les puces collectées en Algérie.....	25
Tableau 3	: Produits du mix de qPCR.....	50
Tableau 4	: Amorces et sondes utilisées pour l'identification des pathogènes lors de la qPCR...	52
Tableau 5	: Produits du mix de PCR standard.....	55
Tableau 6	: Volumes des produits du mix en utilisant le master mix.....	55
Tableau 7	: Programme du Thermocycleur.....	57
Tableau 8	: Produits du mix de séquence.....	60
Tableau 9	: Programme du Thermocycleur.....	61
Tableau 10	: Comparaison entre les effectifs des différents parasites externes récoltés chez les chiens et les chats de la wilaya d'Alger.....	69
Tableau 11	: Effectifs des arthropodes hématophages destinés aux analyses moléculaires chez les chiens et les chats.....	72
Tableau 12	: Récapitulatif des résultats de détection moléculaire des pathogènes dans les arthropodes des chiens et des chats.....	78
Tableau 13	: Récapitulatif des infections à transmission vectorielle chez les chiens selon le sexe.....	79
Tableau 14	: Récapitulatif des infections à transmission vectorielle chez les chiens selon l'âge...	80
Tableau 15	: Récapitulatif des infections à transmission vectorielle chez les chiens selon la race.	81
Tableau 16	: Récapitulatif des infections à transmission vectorielle chez les chiens selon le statut clinique.....	81
Tableau 17	: Récapitulatif des infections à transmission vectorielle chez les chiens selon l'infestation par les arthropodes.....	82
Tableau 18	: Comparaison des résultats de la détection moléculaire des agents pathogènes à transmission vectorielle entre les chiens et leurs arthropodes.....	84
Tableau 19	: Comparaison des résultats de la détection moléculaire des agents pathogènes à transmission vectorielle entre les chats et leurs arthropodes.....	85

Liste des figures

Figure 1	: Schéma général de l'anatomie des Ixodidae ou tiques dures.....	5
Figure 2	: Morphologie externe d'une puce femelle « <i>Ctenocephalides felis</i> ».....	8
Figure 3	: Morphologie des poux: A : Pou broyeur du boeuf, <i>Bovicola bovis</i> ; B : Pou suceur du chien, <i>Linognathus setosus</i>	11
Figure 4	: Correspondance entre la classification phénotypique et la classification génétique des rickettsies.....	15
Figure 5	: Arbre phylogénétique de la famille des Anaplasmataceae basée sur l'alignement des séquences de gène ARN ribosomique 16S.....	33
Figure 6	: Arbre phylogénétique des espèces du complexe de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato (<i>s.l.</i>).....	37
Figure 7	: Structure du spirochète <i>Borrelia burgdorferi</i>	38
Figure 8	: Représentation géographique de la région d'ALGER.....	43
Figure 9	: Equipement de l'identification morphologique des arthropodes.....	48
Figure 10	: Extracteur automatique EZ1.....	49
Figure 11	: Équipement de qPCR utilisé à l'URMITE.....	54
Figure 12	: Équipement de la PCR standard.....	56
Figure 13	: Imageur moléculaire pour la lecture du gel d'électrophorèse.....	59
Figure 14	: Equipement du séquençage.....	63
Figure 15	: Répartition de la population étudiée en fonction du sexe.....	65
Figure 16	: Répartition de la population étudiée en fonction de l'âge.....	66
Figure 17	: Répartition de la population étudiée en fonction de la race.....	66
Figure 18	: Répartition de la population étudiée en fonction du statut clinique.....	67
Figure 19	: Répartition de la population étudiée en fonction de la présence ou l'absence d'ectoparasites.....	68
Figure 20	: Répartition des différentes espèces d'arthropodes chez la population canine.....	70
Figure 21	: Répartition des différentes espèces d'arthropodes chez la population féline.....	70
Figure 22	: Tique mâle de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (face dorsale et ventrale) observée au Gr. 100x sous stéréomicroscope.....	71
Figure 23	: Pucelles femelles de <i>Ctenocephalides felis</i> (à gauche) et de <i>Ctenocephalides canis</i> (à droite) observées au Gr. 100x sous stéréomicroscope.....	71

Figure 24 : Puce mâle (à gauche) et puce femelle (à droite) de <i>Xenopsylla cheopis</i> observées au Gr. 100x sous stéréomicroscope.....	71
Figure 25 : Poux de chien <i>Trichodectes canis</i> (à gauche) et poux de chat <i>Felicola subrostratus</i> (à droite) observés au Gr. 100x sous stéréomicroscope.....	71
Figure 26 : Les courbes d'amplification du gène IS1111 de <i>C. burnetii</i> chez les chiens et les chats par qPCR.....	74
Figure 27 : Les courbes d'amplification du gène Pap31 de <i>B. henselae</i> chez les chiens et les chats par qPCR.....	74
Figure 28 : Les courbes d'amplification de <i>E. canis</i> (Ecaj_0701) chez les chiens par qPCR.....	74
Figure 29 : Les courbes d'amplification de <i>R. massiliae</i> (à gauche) et de <i>R. conorii</i> (à droite) dans les tiques par qPCR.....	75
Figure 30 : Les courbes d'amplification de <i>E. canis</i> dans les tiques par qPCR.....	76
Figure 31 : Les courbes d'amplification de <i>R. felis</i> dans les puces par qPCR.....	77
Figure 32 : Les courbes d'amplification de <i>B. henselae</i> dans les puces par qPCR.....	77
Figure 33 : Répartition des maladies vectorielles en fonction du sexe.....	79
Figure 34 : Répartition des maladies vectorielles en fonction de l'âge.....	80
Figure 35 : Répartition des maladies vectorielles en fonction de la race.....	81
Figure 36 : Répartition des maladies vectorielles en fonction du statut clinique.....	82
Figure 37 : Répartition des maladies vectorielles en fonction de l'infestation parasitaire.....	83
Figure 38 : Représentation de la relation de la présence ou l'absence de l'infection entre les chiens infestés et leurs arthropodes vecteurs.....	84
Figure 39 : Représentation de la relation de la présence ou l'absence de l'infection entre les chats infestés et leurs arthropodes vecteurs.....	85

Les figures (9-14) et les figures (22-32) sont originales 2015.

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

B. : *Bartonella*

BET : Bromure d’Ethidium

Br. burgdorferi s.l. : *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Br. burgdorferi s.s. : *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

C. burnetii : *Coxiella burnetii*

C° : degré Celsius

CSD: Cat Scratch Disease (Maladie des griffes du chat)

Ct. : *Ctenocephalides*

dATP: désoxy-Adénine Tri-Phosphate

dCTP: désoxy-Cytosine Tri-Phosphate

dGTP: désoxy-Guanine Tri-phosphate

dNTP : 2’-désoxyribose Nucléoside TriPhosphate

dTTP: désoxy-Thymine Tri-Phosphate

EDS : Eau distillée ultra pure exempte de ADNase et ARNase

EDTA : Ethylène-Diamine-TétraAcétate

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FBM : Fièvre Boutonneuse Méditerranéenne

g : gramme

H.URB.AL : Hygiène Urbaine d’Alger (Fourrière canine de Boumati, El-Harrach)

IFI : ImmunoFluorescence Indirecte

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

mM: une unité de concentration en chimie, égale à 1 mmol/L

pB: paires de Base

PCR : Polymerase Chain Reaction

qPCR: Real-time PCR

R. : *Rickettsia*

Rh. : *Rhipicephalus*

T+: Témoin positif

TBE : Tris Borique acide EDTA

Tm: Température de Melting

tr / min : tour par minute

URMITE : Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes

X. cheopis : *Xenopsylla cheopis*

µg : microgramme ; **µl** : microlitre ; **µm**: micromètre

% : pourcentage

INTRODUCTION

Les maladies à transmission vectorielle sont de plus en plus reconnues comme cause importante de morbidité et de mortalité chez les humains et les animaux domestiques dans le monde (Dantas-Torres et Otranto, 2014 ; Wei et *al.*, 2014). Les animaux de compagnie tels que les chiens et les chats, sont des réservoirs potentiels et / ou des sentinelles de différents agents pathogènes vectorisés (Claerebout et *al.*, 2013). Ils sont exposés à plusieurs espèces d'arthropodes qui sont incriminés dans les cycles de transmission de nombreuses bactéries (Kamani et *al.*, 2013 ; Maia et *al.*, 2014).

Coxiella burnetii, responsable de la fièvre Q, est un agent pathogène zoonotique répandu dans le monde entier (Mares-Guia et *al.*, 2014). Récemment, de nombreux auteurs mettent en évidence le rôle des carnivores dans l'épidémiologie de la fièvre Q et indiquent que le contact avec les chiens et les chats infectés représente un facteur de risque de contracter la maladie (Cairns et *al.*, 2007 ; de Rooij et *al.*, 2012 ; Hornok et *al.*, 2013 ; Mares-Guia et *al.*, 2014). En Algérie, l'infection par *C. burnetii* chez l'homme a été très peu rapportée (Angelakis et *al.*, 2014). Toutefois aucune donnée publiée concernant la prévalence de *C. burnetii* existe chez les animaux.

Ehrlichia canis est une bactérie appartenant à la famille des Anaplasmataceae qui provoque l'ehrlichiose monocyttaire canine (Wei et *al.*, 2014). La maladie a été d'abord décrite chez les chiens malades de l'Algérie, en 1935 (Donatien et Lestoquard, 1935). Nouvellement deux études indiquent la présence moléculaire de *E. canis* chez les chiens dans ce pays (Dahmani et *al.*, 2015 ; Azzag et *al.*, 2015). Des recherches récentes démontrent que les chats peuvent aussi être des hôtes efficaces de *E. canis* (De Oliveira et *al.*, 2009 ; Braga et *al.*, 2014). La recherche de ce pathogène n'a pas été étudiée chez les tiques vectrices en Algérie.

Les bartonelles sont des organismes infectieux émergents qui ont été récemment documentés dans un large éventail de mammifères domestiques et sauvages. En Algérie, une prévalence élevée d'endocardite infectieuse est causée par *Bartonella quintana* chez l'homme (Benslimani et *al.*, 2005). Auparavant, différentes espèces de *Bartonella* ont été détectées dans les puces (Bitam et *al.*, 2012). Peu d'enquêtes sur la diversité de *Bartonella* spp. chez les réservoirs animaux en provenance de l'Algérie ont été menées. À ce jour, cinq espèces de *Bartonella* (*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. rochalimae* et *B. henselae*) ont été détectées infectant les chiens (Kernif et *al.*, 2010 ; Azzag et *al.*, 2015) et une seule espèce (*B. henselae*) a été décrite chez les chats (Azzag et *al.*, 2012). En outre, *Bartonella* spp. a été retrouvée chez les hérissons et les rongeurs (Bitam et *al.*, 2009a).

Les rickettsioses sont parmi les maladies vectorielles les plus anciennement connues. Des cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne ont été de plus en plus signalés en Algérie (Parola et *al.*, 2013). Au cours des dix dernières années, en particulier en utilisant l'approche entomologique, différentes espèces de *Rickettsia* ont été mieux étudiées dans les tiques et les puces de l'Algérie (Bitam et *al.*, 2009b ; Bitam, 2012). Les chiens sont considérés en tant que sentinelles et réservoirs de *R. conorii* (Levinet *al.*, 2012). Les chats peuvent également être impliqués dans la transmission des rickettsies du groupe boutonneux et de *R. typhi* (Nogueras et *al.*, 2013 ; Segura et *al.*, 2014). Le rôle des animaux domestiques dans l'épidémiologie de rickettsies est encore inconnu dans notre pays.

Borrelia burgdorferi sensu lato est un groupe de plusieurs espèces de spirochètes, dont certaines provoquent la maladie de Lyme en particulier chez les humains et les chiens (Skotarczak, 2014). Les chats ont été rapportés d'être vulnérables à l'infection par cet agent (Krupka et Straubinger, 2010). En Algérie, des cas de borréliose humaine ont été signalés (Alem et Hadji, 1999 ; FotsoFotso et *al.*, 2015). Récemment, une séropositivité élevée de *Borrelia burgdorferi* s.l. a été notée chez les chiens de la wilaya d'Alger (Azzag et *al.*, 2015). De plus, *Borrelia garinii* a été détectée dans les tiques *Ixodes ricinus* dans notre pays (Benredjem et *al.*, 2014).

Les informations sur les agents responsables de maladies vectorielles circulants en Algérie demeurent limitées. Pour cela, la présente étude est menée en vue d'évaluer la présence de bactéries (*C. burnetii*, *E. canis*, *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. et *Borrelia* spp.) d'importance vétérinaire et zoonotique chez les chiens et les chats errants ainsi que leurs ectoparasites dans la wilaya d'Alger à l'aide de tests moléculaires spécifiques et rapides.

Ce travail a pour objectifs de :

- Rechercher les bactéries zoonotiques vectorisées chez les hôtes animaux et les arthropodes hématophages associés.
- Indiquer l'intérêt des prélèvements spléniques dans le diagnostic de certains pathogènes.
- Identifier les genres et les espèces des insectes et acariens parasitant les chiens et les chats.
- Montrer la sensibilité de la technique de PCR en temps réelle (qPCR) dans la détection et la caractérisation des microorganismes intracellulaires de culture difficile.
- Déterminer les espèces ou les souches bactériennes par le séquençage moléculaire.
- Et enfin éclaircir l'épidémiologie de ces infections en Algérie.

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1^{ère} PARTIE

Les vecteurs arthropodes

I. IXODIDAE (LES TIQUES)

I.1. Généralités

Les tiques sont des arthropodes hématophages parasitant la quasi-totalité des vertébrés à travers le monde et pouvant piquer l'homme occasionnellement. Il ya 2 principales familles de tiques: les Ixodidae ou « tiques dures », ainsi nommés du fait de la présence d'une plaque dorsale dure, et constituant la famille la plus importante en nombre et en pathologie humaine et vétérinaire ; les Argasidae ou « tiques molles », qui présentent un tégument mou dépourvu de zones sclérifiées. Les tiques ont 3 stades évolutifs: larve, nymphe puis adulte, mâle et femelle. Les Ixodidae présentent notamment des caractéristiques favorables au rôle de vecteur de microorganismes. Leur repas sanguin sur l'hôte, où elles sont fermement attachées, est relativement long. Chaque stade prend un seul repas, qui selon l'espèce peut avoir lieu sur une large variété de vertébrés qui peuvent occuper des habitats très variés. Dans les régions à climat tempéré, l'activité des tiques est maximale entre le printemps et l'automne (Walker et *al.*, 2003 ; Estrada-Peña et *al.*, 2004).

Les tiques ont été impliquées dans la transmission de maladies infectieuses à l'homme et aux animaux. Actuellement de plus en plus de nouveaux agents à transmission vectorielles sont découverts. Cela est probablement dû à l'intérêt des cliniciens et des chercheurs pour ces maladies émergentes, et surtout à l'apparition de nouvelles techniques de diagnostic notamment la biologie moléculaire.

I.2. Position systématique

Selon la classification de Moulinier (2002), les tiques sont considérées comme un ordre à part entière dont la dénomination est Ixodida. L'ordre des Ixodida se divise en deux familles et une micro-famille:

- La famille des Ixodidae ou tiques dures (environ 700 espèces).
- La famille des Argasidae ou tiques molles (environ 180 espèces).
- Une 3ème micro-famille, les Nuttalliellidae (une seule espèce), décrite en Afrique du Sud et ne présente aucun intérêt médical.

La famille des Ixodidae est divisée en cinq sous familles:

- La sous famille des Ixodinae (250 espèces) : un seul genre « *Ixodes* ».
- La sous famille des Amblyomminae (130 espèces) : plusieurs genres, dont un seul genre *Amblyomma* intervient dans la pathologie humaine et animale.
- La sous famille des Haemaphysalinae (200 espèces) : un seul genre « *Haemaphysalis* ».
- La sous famille des Hyalomminae (50 espèces) : un seul genre « *Hyalomma* ».
- La sous famille des Rhipicephalinae (150 espèces) : huit genres dont deux présentent un intérêt médical « *Dermacentor* et *Rhipicephalus* ».

A titre d'exemple, La tique *Rhipicephalus sanguineus* est une espèce cosmopolite, elle se trouve particulièrement dans le Littoral méditerranéen. Elle affecte principalement les chiens. Les chats sont parfois infestés, du fait des contacts étroits avec les canidés et de la fréquentation des mêmes lieux domestiques. Cette tique joue un rôle important dans le cycle de transmission de plusieurs bactéries (Socolovschi et *al.*, 2012a) (Tableau 1).

I.3. Anatomie

Les tiques sont des acariens de grande taille (2-30 mm). Les adultes et les nymphes ont 4 paires de pattes, tandis que les larves en ont 3. Elles n'ont pas d'antennes et, contrairement aux insectes, le corps des tiques n'est pas divisé en tête, thorax et abdomen. La partie antérieure du corps, le capitulum, porte les pièces buccales qui comprennent des organes sensoriels (les pédipalpes), des organes coupants (les chélicères) et un organe immobile médian (l'hypostome) présentant de nombreuses dents qui ancrent les tiques dans la peau de leur hôte animal. La partie postérieure du corps (idiosome) porte les pattes et présente l'anus. Les Ixodidae sont caractérisées par la présence d'une plaque (le scutum) sur la face dorsale de leur corps et seul le reste du corps est extensible pendant le repas sanguin (Fig. 1). Chez les femelles et les formes immatures, le scutum couvre seulement la partie antérieure du corps, tandis qu'il occupe la totalité chez les mâles. Ainsi, la différenciation du sexe est aisée. Les tiques ont un appareil circulatoire et tous les organes sont irrigués par un liquide appelé l'hémolymphe (Rodhain et Perez, 1985 ; Moulinier, 2002).

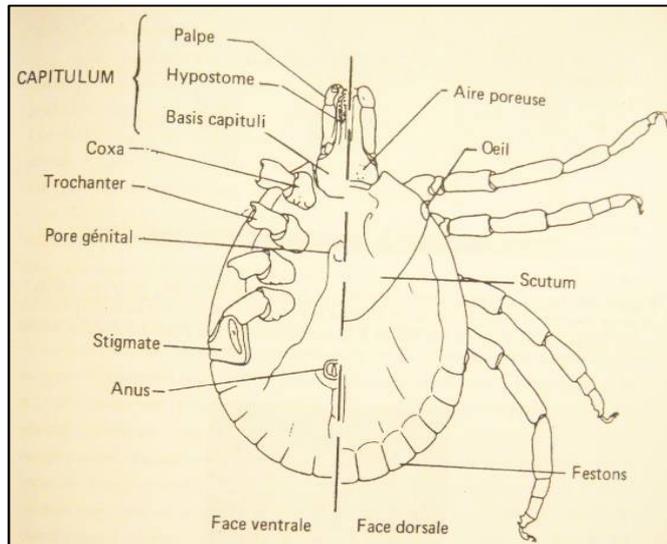


Figure 1: Schéma général de l'anatomie des Ixodidae ou tiques dures (Rothain et Perez, 1985).

I.4. Cycle de vie

Les Ixodidae ont typiquement un cycle de vie triphasique : chaque stade actif (larve, nymphe et adulte) recherche un hôte vertébré différent, le pique, s'y attache et prend un repas sanguin unique qui dure plusieurs jours (3 à 12 j selon le stade et l'espèce) (Pérez-Eid., 2007).

L'œuf éclot après une embryogénèse de 20 à 50 jours. La larve recherche un hôte pour prendre son repas de sang ou entre en diapause, un état caractérisé par un métabolisme réduit et un développement ralenti (période pendant laquelle la tique est plus résistante à des conditions climatiques défavorables), pour ne reprendre son cycle de vie que dans des conditions plus favorables (après l'hiver essentiellement). Après un repas de plusieurs jours, elle se détache et tombe au sol pour y effectuer dans un microenvironnement protégé sa métamorphose en nymphe qui peut durer de 2 à 8 semaines selon les espèces. La nymphe a le même comportement. Sa métamorphose en adulte est en général plus longue, jusqu'à 20 à 25 semaines dans les conditions les plus défavorables. Le repas de l'adulte est plus important en volume et plus long que celui des stades précédents et seule la femelle prend un vrai repas de sang, nécessaires à assurer la ponte. En général, les males ne se nourrissent pas ou ne prennent qu'une petite quantité de sang chez certaines espèces de tiques. L'accouplement s'effectue le plus souvent sur l'hôte et la femelle termine son repas après la fécondation. La femelle gorgée tombe au sol pour pondre les œufs (Pérez-Eid., 2007).

I.5. Rôle pathogène des tiques

a. Rôle direct

Le rôle pathogène direct des tiques est dû aux effets de l'action mécanique des chélicères et de la pénétration de l'hypostome dans le tégument de l'hôte au moment de la morsure. L'action irritative des tiques est causée par divers principes actifs de la salive injectée au cours du gorgement. La plaie qui en résulte peut se compliquer en granulome ou en nodule. Les sécrétions salivaires, contenant des molécules à activité anticoagulante, antigénique et immuno-inflammatoire, sont responsables d'hypersensibilité, de prurit et d'une action toxique locale ou générale (Pérez-Eid., 2007).

b. Rôle indirect

Les tiques sont des hématophages à haut pouvoir vectoriel : des agents pathogènes peuvent être acquis durant les divers stades du cycle de vie, puis transmis de manière trans-ovarienne (de la femelle à sa progéniture) et trans-stadiale (entre les différents stades). Une transmission d'une infection non systémique entre les tiques voisines est possible, par le co-repas ("cofeeding"). C'est-à-dire, si une tique infectée pique l'hôte, une deuxième tique, non infectée, vient piquer ce même hôte à proximité de la première. Cette deuxième tique peut s'infecter (Bitam et *al.*, 2006).

Les maladies bactériennes transmises à l'homme par les tiques sont des zoonoses, la bactérie étant maintenue dans des cycles naturels impliquant des tiques et des mammifères domestiques et / ou sauvages qui peuvent jouer le rôle des réservoirs. Les tiques peuvent occasionnellement piquer l'homme et lui transmettre une infection. Pour chaque maladie bactérienne, il peut exister une ou plusieurs espèces de tiques vectrices (et / ou réservoirs) et un ou plusieurs réservoirs animaux. L'infectivité des réservoirs mammifères, le taux d'infection des tiques et la densité d'hôtes sont les grandes variables qui déterminent l'épidémiologie des zoonoses vectorielles (Claerebout et *al.*, 2013).

II. SIPHONAPTERES (LES PUCES)

II.1. Généralités

Les puces sont des insectes sauteurs sans ailes et à pièce buccale de type piqueur-suceur avec 95% des espèces parasites obligatoires des mammifères alors que le reste s'attaque aux oiseaux. Ce sont des insectes à métamorphose complète (Holométaboles) hautement hématophage et pouvant causer une anémie (Whitaker, 2007).

II.2. Position systématique

Les puces appartiennent au Phylum des Arthropoda, la classe des Insectes et l'ordre des Siphonaptera. Cet ordre comprend environ 2574 espèces et sous-espèces et plus de 230 genres regroupés dans 17 familles. Selon les auteurs deux familles représentent une importance vétérinaire et médicale (la famille des Pulicidae et la famille des Ceratophyllidae) (Bitam *et al.*, 2010).

La famille des Ceratophyllidae est représentée par 500 espèces réparties entre 80 qui affectent les oiseaux et le reste parasite les rongeurs.

- La famille des Pulicidae est la plus répandue à travers le monde et affecte surtout les mammifères (Tableau 1).

II.3. Anatomie

Les puces sont de petits insectes bruns ou presque noirs, dépourvus d'ailes et protégés par une cuticule externe très dure constituée essentiellement de chitine et de polysaccharides aminés. Le corps est recouvert de poils épineux hérissés vers l'arrière ainsi que des épines courtes et robustes. Ce dernier est aplati latéralement. Les puces mesurent le plus souvent moins de 5 mm de long (de 2 à 3 mm pour la majorité des espèces), exceptionnellement jusqu'à 9 mm. Les femelles sont généralement plus grosses que les mâles (Beaucournu et Launay, 1990 ; Whitaker, 2007).

Leur corps est divisé en trois parties : une tête, un thorax et un abdomen (Fig. 2) :

a. Tête ou capsule céphalique

La tête est globalement arrondie ou sub-rectangulaire en fonction des espèces, directement accolée au thorax. Les puces ont une tête de petite taille comprenant une partie antérieure et une partie postérieure séparées par une suture. De chaque côté de la tête, il existe une fossette

antennaire où se loge des antennes courtes. Les yeux ou ocelles sont situés sur la face latérale, ils sont réduits ou absents (Franc, 1994 ; Bitam et *al.*, 2010). L'appareil buccal est très développé. Chez certaines espèces, il ya la présence dans la partie inférieure de la tête (zone génale), une rangée de fortes épines à pointe dirigée vers l'arrière appelée : « peigne » ou « cténidie ». Le nombre et la dimension des épines sont des caractéristiques d'espèces (Moulinier, 2002).

b. Thorax

Dorsalement il comprend trois anneaux distincts: prothorax, mésothorax et métathorax.

Ils portent tous un stigmate et une paire de pattes. Leurs pattes III sont très développées, de ce fait elles sont adaptées au saut. Le prothorax porte parfois un peigne (Villeneuve, 2003).

c. Abdomen

Formé de 10 à 11 segments abdominaux, il est divisé dorsalement en tergites, et ventralement en sternites (Franc, 1994 ; Bitam et *al.*, 2010). La forme générale de l'abdomen permet de distinguer les deux sexes. Chez les femelles les faces dorsales et ventrales sont convexes alors que chez les mâles la face dorsale est presque plate et la face ventrale est très incurvée. Dans les deux sexes, Le dixième segment abdominal porte ventralement l'anus et dorsalement un organe sensoriel (sensilium ou plaque pygidiale) (Franc, 1994).

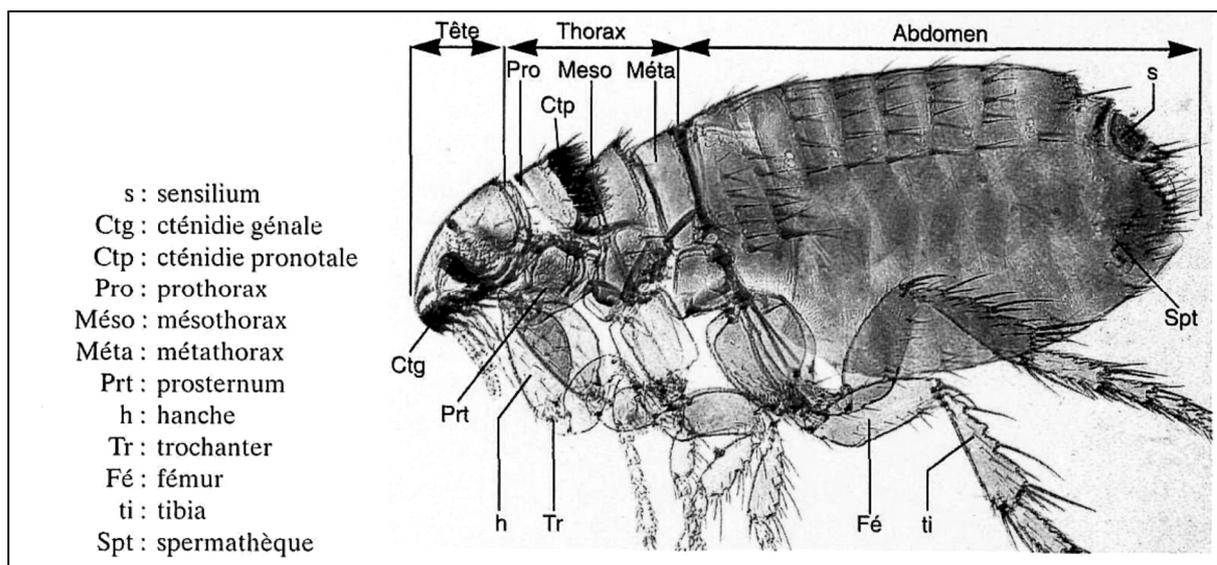


Figure 2: Morphologie externe d'une puce femelle « *Ctenocephalides felis* » (Franc, 1994).

II.4. Cycle de vie

Les puces complètent le cycle de l'œuf à l'adulte en passant par différents stades larvaires et un stade nymphal (Bitam et *al.*, 2010). La durée du cycle biologique dépend de l'espèce en cause, de la température, de l'humidité et de l'accès à la nourriture. Si toutes les conditions favorables sont réunies, une puce parvient au stade adulte en deux à trois semaines. Dans le cas contraire, son développement peut prendre plusieurs mois (Moulinier, 2002).

Après le repas sanguin et l'accouplement, les puces femelles pondent par série de 2 à 6 œufs. Le nombre d'œufs est variable selon les espèces. Les œufs des puces sont de petite taille, de couleur blanche, de forme ovoïde, à peine visibles à l'œil nu. Ils sont généralement déposés et non fixés sur la fourrure de l'hôte. Ils se trouvent spécialement abondants dans la litière et les nids. Ces œufs éclosent et donnent des larves blanches minuscules, allongées, de forme cylindrique et pourvues de poils. Les larves vivent dans les fentes poussiéreuses des planchers, dans les tapis ou dans la litière des animaux et se nourrissent des particules de poussière et d'autres débris. L'évolution des trois stades larvaires dure environ 15 jours. Lorsque la larve atteint sa maturité, elle forme un cocon dans lequel se transforme en nymphe ou pupa. Ce stade est immobile et ne s'alimente pas, et dure 1 à 2 semaines en moyenne. La nymphe se métamorphose par la suite en adulte, qui devient hémaphophage pour les deux sexes. Chez beaucoup d'espèces, la puce adulte est complètement formée dans le cocon et peut y rester très longtemps inerte surtout lorsque les conditions sont défavorables (en particulier lors du froid) (Beaucournu et Launay, 1990 ; Franc, 1994 ; Hunter et *al.*, 2006).

II.5. Rôle pathogène des puces

a. Rôle direct

Les manifestations cliniques dépendent de la réaction immunologique de l'animal parasité et de la fréquence, la durée et le taux d'infestation par les puces. Les piqûres de puces sont à l'origine d'une spoliation sanguine non négligeable et d'une irritation qui peut être particulièrement marquée chez les sujets sensibles (Whitaker, 2007).

La dermite allergisante aux piqûres de puces (D.A.P.P) est très connue chez le chien et le chat (Franc, 1994).

a. Rôle indirect

L'importance des puces en santé humaine et animale est surtout liée à leur capacité de transmission d'agents de maladies infectieuses, la peste est la plus connue et la plus redoutée. Les puces sont également associées à d'autres maladies plus ou moins graves comme les rickettsioses et les bartonelloses (Leulmi et *al.*, 2014).

III. PHTHIRAPTERES (LES POUX)

III.1. Généralités

Les poux sont des insectes aptères (dépourvus d'ailes), aplatis dorsoventralement, qui vivent sur la peau de leurs hôtes. Mesurant entre 1,5 et 5 mm de longueur. Leurs œufs, appelés lentes, ressemblent à des grains de poussière granuleuse adhérant aux poils. Les poux se divisent en espèces piqueuses (Anoploures) et espèces broyeuses (Mallophages). Les premières se nourrissent de sang, qu'elles prélèvent en perçant la peau au moyen de leurs pièces buccales, tandis que les secondes consomment diverses particules externes des poils, de la laine et des plumes. Les poux piqueurs ne parasitent que les mammifères, tandis que les poux broyeurs se trouvent sur les mammifères et les oiseaux. Sous les climats tempérés, la pédiculose ou phtiriase survient souvent pendant la saison hivernale, cela est favorisée par la proximité des animaux enfermés et l'épaisseur de leurs pelages (Houhamdi et *al.*, 2005 ; Hunter et *al.*, 2006).

III.2. Position systématique

Les poux appartiennent au phylum des Arthropodes, à la classe des Insectes et à l'ordre des Phthiraptera. Ce dernier comprend deux sous-ordres: Anoploures et Mallophages. Plus de 5000 espèces de poux existent mais la plupart sont méconnues sur le plan d'importance médicale et vétérinaire (Hunter et *al.*, 2006). Les espèces qui parasitent fréquemment les animaux de compagnie sont citées dans le tableau 1.

III.3. Anatomie

III.3.1. Morphologie des mallophages

La tête est plus large que le thorax, elle porte des antennes de trois à cinq articles. Les yeux ou ocelles ne sont pas toujours bien visibles. Les mandibules crochues sont presque toujours dentées à leurs extrémités permettant à l'insecte de s'accrocher à un poil ou un fragment de plume. En arrière des mandibules, se trouvent les mâchoires pourvues de palpes.

Le thorax est constitué de deux parties distinctes: prothorax et méso- métathorax fusionnés. Les pattes sont terminées par une ou deux griffes qui permettent à l'insecte de s'agripper. L'abdomen est formé de neuf segments nus ou pourvus chacun d'une à trois rangées de soies. Les stigmates latéraux sont portés par les segments deux à huit (Fig. 3). Les mâles sont plus petits que les femelles. Ils ont un dernier segment arrondi et non divisé et présentent en région médiane un appareil copulateur digitiforme de coloration sombre (Hunter *et al.*, 2006).

III.3.2. Morphologie des anoploures

La tête allongée et étroite porte latéralement deux antennes bien visibles. Les yeux sont présents uniquement chez les espèces parasites de l'homme (famille des *Pediculidae*). Le thorax est constitué de trois segments plus ou moins fusionnés. Il porte trois paires de pattes courtes. L'abdomen est constitué de neuf segments pourvus chacun d'une ou de plusieurs rangées de soies, les segments trois à huit portent chacune une paire de stigmates (Fig. 3). Le dimorphisme sexuel est discret chez les femelles, le dernier segment est échancré et l'avant-dernier porte une paire de gonopodes latéraux et une plaque génitale médiane sclérifiée. Chez le mâle, le dernier segment n'est pas échancré et le pénis est proéminent en zone médiane (Franc, 1994 ; Hunter *et al.*, 2006).

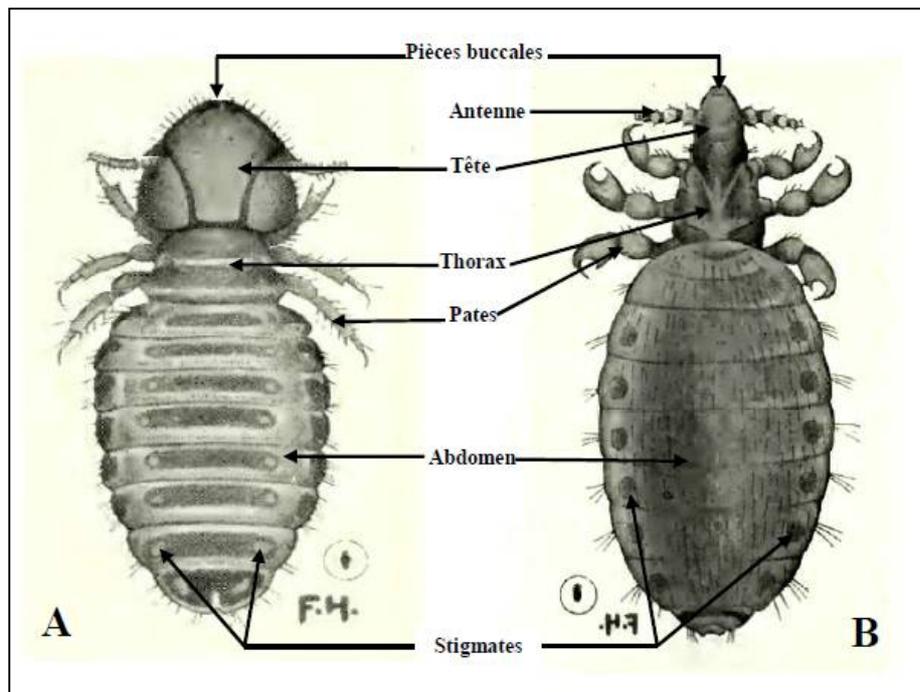


Figure 3: Morphologie des poux: **A** : Pou broyeur du boeuf, *Bovicola bovis* ; **B** : Pou suceur du chien, *Linognathus setosus* (Manning et Graham, 1997).

III.4. Cycle de vie

Les poux passent toute leur vie et toute leur métamorphose sur l'animal qui leur sert d'hôte. Les œufs, blancs ou jaunâtres dans la plupart des espèces, sont de forme ovale, recouverts d'une capsule à l'extrémité supérieure et sont collés à la base des poils ou des plumes. Ils éclosent au bout de 5 à 10 jours chez les mallophages et de 10 à 15 jours chez les anoploures. Les nymphes nouvellement éclos ressemblent aux adultes, mais ils sont plus petits. Ces derniers subissent trois mues puis se développent en insecte adultes en l'espace d'environ 3 semaines. Dans la plupart des espèces, l'accouplement ne se produit que 8 jours ou plus après que les insectes atteignent leur taille mature. Les adultes vivent environ un mois et la femelle peut pondre autour de 300 œufs. Les poux sont des parasites qui ne peuvent survivre plus d'un jour à l'écart d'un hôte. Ils passent d'un hôte à un autre par contact direct (Hunter et *al.*, 2006).

III.5. Rôle pathogène des poux

a. Rôle direct

Chaque espèce de poux occupe préférentiellement certaines zones particulières du corps de leurs hôtes. Les infestations peu importantes sont généralement bien tolérées et passent inaperçues. Les infestations importantes, toutefois, peuvent concerner toute la surface du corps et occasionner un stress et des démangeaisons considérables. Les animaux se frottent, se grattent et se lèchent constamment, abimant leur peau et leur pelage. L'infestation massive d'un animal par des poux piqueurs peut occasionner des pertes de sang significatives et entraîner des anémies et des états de faiblesse (Houhamdi et *al.*, 2005).

b. Rôle indirect

Les poux piqueurs sont aussi impliqués dans la transmission d'agents pathogènes à l'origine de maladies plus ou moins graves, pour l'animal et pour l'homme (Houhamdi et *al.*, 2005 ; Reeves et *al.*, 2006).

Tableau 1: Les principaux ectoparasites infestant les chiens et les chats
(Estrada-Peña et al., 2004 ; Dantas-Torres et al., 2014).

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genres / espèces	Chiens	Chats
Arthropoda	Arachnida	Ixodida	Ixodidae	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Rhipicephalus</i> (<i>Rh. sanguineus</i> est la plus fréquente) ➤ <i>Ixodes</i> ➤ <i>Dermacentor</i> ➤ <i>Hyalomma</i> ➤ <i>Haemaphysalis</i> 	Présentes	Présentes mais rarement
	Insecta	Siphonaptera	Pulicidae	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Ctenocephalides canis</i> ➤ <i>Ctenocephalides felis</i> ➤ <i>Pulex irritans</i> ➤ <i>Xenopsylla cheopis</i> 	Présentes	Présentes
		Phthiraptera	Trichodectidae	➤ <i>Trichodectes canis</i>	Présente	Absente
				➤ <i>Felicola subrostratus</i>	Absente	Présente
			Linognathidae	➤ <i>Linognathus setosus</i>	Présente	Absente
			Boopidae	➤ <i>Heterodoxus spiniger</i>	Présente	Absente

2^{ème} PARTIE

Les maladies bactériennes à transmission vectorielle

I. LES RICKETTSIOSES

I.1. Généralités

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

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

I.2. Etude de l'agent causal

I.2.1. Taxonomie

La taxonomie de ces bactéries reposait sur quelques critères phénotypiques et sur le sérotypage. L'utilisation d'outils moléculaires a permis de mettre en place une nouvelle taxonomie des rickettsies basée sur les liens phylogéniques entre ces bactéries et l'ensemble du monde bactérien (Raoult et Brouqui, 1998). Certaines entités ont été renommées ou reclassées, c'est pourquoi il nous semble important de connaître l'ancienne et la nouvelle classification (Fig. 4).

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

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

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

Ainsi, *Coxiella burnetii*, seule bactérie du genre *Coxiella*, a été exclue de l'ordre des *Rickettsiales* car les séquences du gène 16S ARNr se trouvent être proches de celles des membres du sous-groupe gamma des protéobactéries, alors que les bactéries du genre

Rickettsia appartiennent au sous-groupe alpha-1. D'autre part, le genre *Rochalimaea* a été récemment intégré au genre *Bartonella* de la famille des *Bartonellaceae* et le genre unifié a été exclu de l'ordre des *Rickettsiales* car ses membres étaient intégrés dans le sous-groupe alpha-2 des protéobactéries. Actuellement, la tribu des *Rickettsiae* ne comprend que les genres *Rickettsia* et *Orientia* (Raoult et Brouqui, 1998).

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

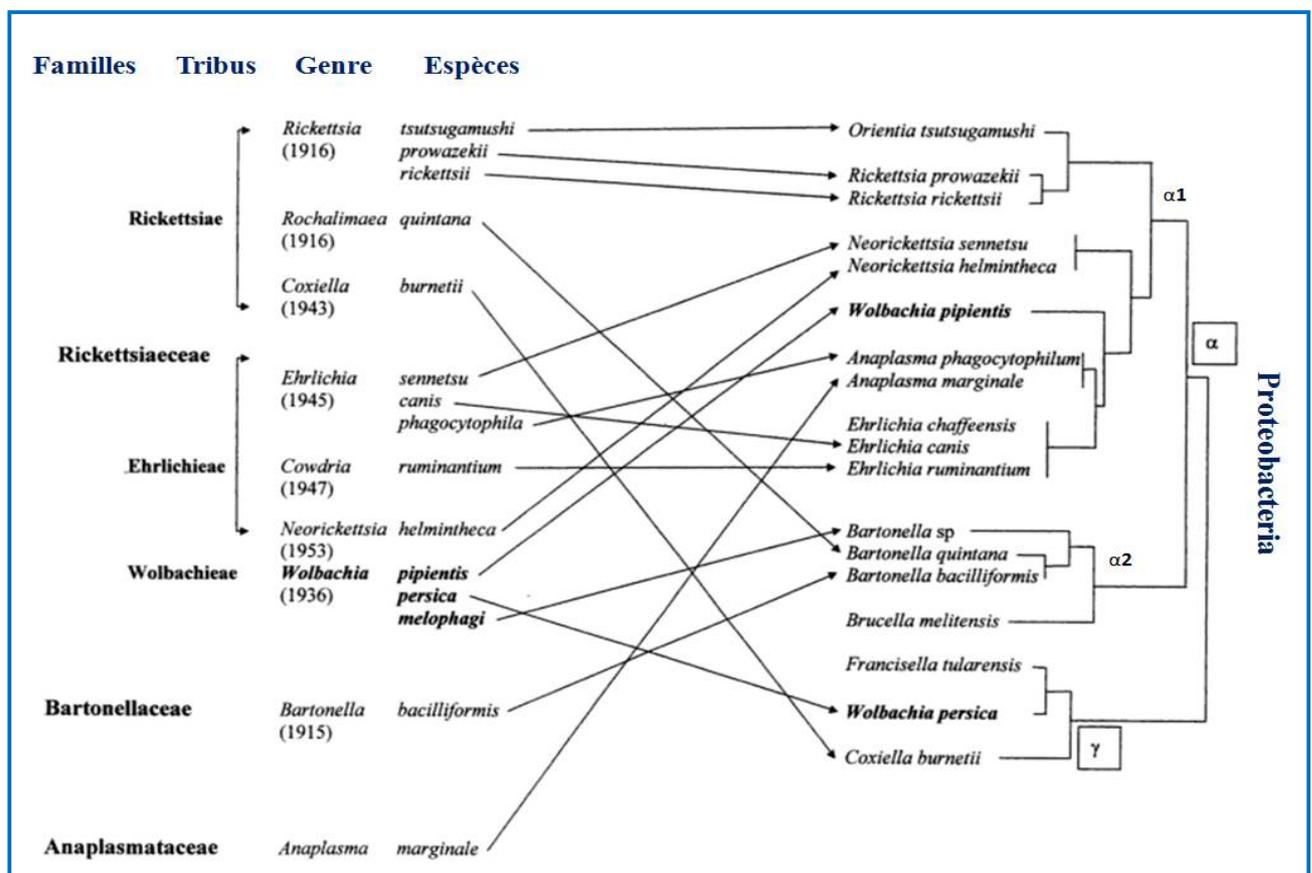


Figure 4: Correspondance entre la classification phénotypique et la classification génétique des rickettsies (Brenner et al., 2005).

Actuellement, les bactéries du genre *Rickettsia* sont classées en deux génogroupes (**génogroupe typhus** et **génogroupe boutonneux**) (Annexe 1), d'après les caractéristiques génétiques du gène codant pour la protéine de surface rOmpA. Quelques rickettsioses ne peuvent pas être classées dans ces deux génogroupes, parce qu'elles sont dues à des bactéries génétiquement

différentes et que ces maladies sont cliniquement et épidémiologiquement distinctes des autres (Davoust et *al.*, 2010).

I.2.2. Bactériologie

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

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

I.3. Épidémiologie

I.3.1. Agents pathogènes

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

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

Il est probable que de nombreuses pathologies humaines inexplicées résultent en fait de rickettsioses encore méconnues (Bitam et *al.*, 2009a).

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

I.3.2. Réservoirs

Les rickettsies sont associées principalement aux tiques, ou aux arthropodes appartenant à la classe des insectes comme les poux et les puces. Ces hôtes peuvent être réservoirs, vecteurs et/ou amplificateurs de la bactérie (Parola et Raoult, 2006; Renvoisé et Raoult, 2009). Néanmoins, la circulation des rickettsies dans l'environnement est souvent hypothétique. Pour répondre à la question: les animaux vertébrés sont-ils réservoirs de rickettsies ?, nous présenterons l'état des connaissances à ce sujet concernant les animaux domestiques (chien et chat), infection par infection.

I.3.2.1. Infection par *Rickettsia conorii* et *Rickettsia rickettsii*

Le rôle vecteur de la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus* a été démontré par l'inoculation d'un broyat de tiques à l'homme. La transmission transovarienne ayant été prouvée, *Rh. sanguineus* a été longtemps considérée comme le réservoir de *R. conorii* (Davoust et al., 2010). L'ADN de cette bactérie a été détecté à partir de *Rh. sanguineus*, récoltées sur des chiens en Algérie (Kernif, 2007).

D'autre part la tique brune du chien a une répartition mondiale mais l'infection à *R. conorii* n'est observée que dans quelques régions de l'ancien monde. Ces faits suggèrent que les vertébrés pourraient avoir un rôle dominant dans la persistance de l'agent dans un écosystème donné (Davoust et al., 2010).

Le chien porteur de *Rh. sanguineus* infectés peut amener le vecteur dans l'environnement de son propriétaire. Il arrive aussi qu'il introduise l'infection d'un endroit à l'autre, lorsqu'il voyage en portant des tiques (Senneville et al., 1991). Il joue alors un rôle épidémiologique de propagateur de l'infection (Alexandre et al., 2011).

Du point de vue épidémiologique, le chien n'est pas considéré comme réservoir car il ne développe pas une rickettsémie suffisante pour assurer la transmission de ces bactéries. Cependant, deux études expérimentales ont prouvé que les chiens sont capables d'acquérir et de transmettre *R. conorii* et *R. rickettsii* aux *Rh. Sanguineus* non infectées (Levin et al., 2011 ; Piranda et al., 2011).

Le chien pourrait être considéré comme un réservoir intermittent, forcément secondaire. Par contre, il est une bonne sentinelle de l'infection (Alexandre et al., 2011). Des enquêtes de séroprévalence attestent de taux élevés (15 à 85%) de *R. conorii* (Bacellar et al., 1995 ;

Torina et Caracappa, 2006; Harrus et *al.*, 2007 ; Ortuño et *al.*, 2009) et de *R. rickettsii* chez cette espèce animale (Pinter et *al.* 2008 ; Mcquiston et *al.*, 2011 ; Pacheco et *al.*, 2011).

Des investigations ont montré que les sérums de chats, au Zimbabwe et à l'Afrique du Sud, contiennent des anticorps réagissant contre *Rickettsia conorii* (34% et 19% respectivement) (Matthewman et *al.*, 1997) et 17,2% des chats étaient séropositifs pour *Rickettsia rickettsii* aux États-Unis (Case et *al.*, 2006). Ces résultats montrent que les chats peuvent devenir des indicateurs de la présence de ces organismes.

I.3.2.2. Infection par *Rickettsia felis*

Les chats errants sont davantage infestés par des puces qui sont le plus souvent infectées par *R. felis* (Reif et Macaluso, 2009). La séroprévalence de l'infection à *R. felis* chez cette espèce animale varie de 4 à 73 % (Case et *al.*, 2006 ; Labruna et *al.*, 2007 ; Bayliss et *al.*, 2009 ; Reif et Macaluso, 2009 ; Davoust et *al.*, 2010). Une étude expérimentale a mis en évidence l'ADN de *R. felis*, de façon transitoire, dans le sang des chats (Wedincamp et Foil, 2000). Chez les chiens, une étude réalisée en Australie, a détecté l'ADN de *R. felis* dans 9 % des cas (Hii et *al.*, 2011) et une autre recherche en Espagne a décelé une séropositivité élevée vis-à-vis cette bactérie (Nogueras et *al.*, 2009). Ces données confirment l'importance des carnivores domestiques en tant que hôtes intervenant dans la circulation de *Rickettsia felis* dans une zone urbaine.

La transmission transovarienne de *R. felis* chez la puce du chat (*Ctenocephalides felis*) a été démontrée par la présence de la bactérie dans des œufs n'ayant pas encore pris leur premier repas sanguin (Azad et *al.*, 1997). *Ct. felis* peut donc être considérée comme le principal vecteur et réservoir de *R. felis* (Reif et Macaluso, 2009 ; Hawley et *al.*, 2007). Mais la chute du taux d'infection de génération en génération, chez des puces élevées en laboratoire sans contact avec des animaux vertébrés, peut suggérer l'existence d'un réservoir vertébré dans le cycle naturel de l'infection (Davoust et *al.*, 2010). En Algérie, *R. felis* a été détectée par PCR dans les puces *Ct. canis* provenant de rongeurs et dans les puces d'hérissons (Bitam et *al.*, 2006a)..

I.3.2.3. Infection par *Rickettsia typhi*

La puce du rat (*Xenopsylla cheopsis*), vecteur principal, ne meurt pas de l'infection et pourrait transmettre la rickettsie à une faible partie de sa descendance, par voie transovarienne (Raoult et Parola, 2007). *Rickettsia typhi* est maintenue aussi par les rats (Parola et Raoult, 2006).

En Algérie, *R. typhi* a été détectée par PCR dans les puces *X. cheopis* recueillies auprès de rongeurs (Bitam et al., 2009a).

Les tests sérologiques chez des animaux sélectionnés en étroite association avec des cas humains de typhus murin à Los Angeles, ont révélé une forte prévalence de séropositivité à *R. typhi* chez les chats domestiques (Sorvillo et al., 1993). Plus récemment, en Espagne, les résultats des tests d'immunofluorescence indirecte ont indiqué que les chiens portaient aussi des anticorps contre *R. typhi* (Nogueras et al., 2009).

I.3.3. Mode de contamination

La transmission indirecte, lors de morsure, par des tiques infectées, est primordiale. Les rickettsies sont inoculées par voie cutanée à partir de la salive de l'arthropode durant le repas sanguin (Raoult et Parola, 2007). De plus, l'hémolymphe et les fèces des tiques étant très riches en germes, le propriétaire peut s'infecter via les muqueuses ou les abrasions cutanées, en arrachant l'acarien fixé sur son animal (Bitan, 2002).

La transmission de *R. typhi* et *R. felis* chez l'homme, a lieu à l'occasion du prurit provoqué par les défécations des puces infectées et il s'ensuit ainsi une auto-inoculation à la faveur de lésions de grattage. Ces rickettsies peuvent d'autre part rester infectantes des années dans les poussières de déjections de puces et entraîner des contaminations par aérosols (Raoult et Roux, 1997). Une transmission par voie muqueuse est également possible (Raoult et Parola, 2007; Renvoisé et Raoult, 2009). La découverte récente de *R. felis* dans les glandes salivaires de *Ct. felis* suggère mais ne prouve pas une transmission par la salive lors des piqûres de puces (Parola et Raoult, 2006).

I.4. Étude clinique

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

Les symptômes de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses chez les chiens malades consiste en une fièvre, anorexie, léthargie, adénopathie, troubles respiratoires et digestifs, polyarthrite, manifestations cutanées et divers signes neurologiques. Des thromboses ou des hémorragies dans les organes vitaux (cœur, cerveau, rein) entraînent souvent la mort (Mikszewski et Vite, 2005). L'animal peut cependant guérir spontanément (Bitan, 2002).

Les chiens infectés par *Rickettsia conorii* sont souvent asymptomatiques (Bitan, 2002).

Il y a peu de documentation sur la maladie clinique associée aux rickettsioses chez le chat (Case et al., 2006 ; Bayliss et al., 2009).

I.5. La maladie chez l'homme

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

Les cas d'infection à *R. typhi* et *R. felis* ont été également diagnostiqués chez des patients présentant des signes non spécifiques tels que la fièvre d'origine inconnue (Mouffok et al., 2008 ; Bitam et al., 2009a). Les cliniciens doivent être conscients de la présence du typhus murin et la fièvre boutonneuse à puce dans notre pays.

I.6. Diagnostic

La bactériémie chez les animaux réservoirs, est mise en évidence soit par culture (difficile pour les rickettsies), soit par la détection de l'ADN (Davoust et al., 2010). La séropositivité est un critère indirect d'une infection chronique. Un taux de séoprévalence élevé et stable dans une population animale est en faveur du rôle de réservoir potentiel de ces animaux (Pacheco et al., 2011). Actuellement, le test sérologique de référence est l'immunofluorescence indirecte (IFI). Les techniques d'adsorption croisée associées au western blot sont aussi utilisées. Cependant, bien qu'efficace dans le diagnostic d'espèce, ces techniques consomment beaucoup d'antigènes et sont longues, coûteuses et disponibles que dans des laboratoires de référence (Raoult et Parola, 2007).

Les outils de biologie moléculaire sont sensibles, spécifiques et rapides. Ils contribuent en grande part au diagnostic car ils peuvent donner un résultat positif avant la séroconversion et permettent d'identifier de nouvelles rickettsies (Kidd et al., 2008 ; Solano- Gallego et al., 2008).

Lors de PCR, les gènes les plus étudiés des rickettsies sont ceux codant pour le 16S ARNr, la citrate synthase (gltA), les protéines de la membrane externe (ompA, ompB), et une protéine intracytoplasmique (gène D) (Raoult et Brouqui, 1998 ; Hawley et *al.*, 2007 ; Renvoisé et Raoult, 2009). A l'unité des rickettsies en France, les chercheurs ont développé des systèmes spécifiques (amorces et sondes) afin de réaliser un criblage rapide des bactéries du genre *Rickettsia* dans les échantillons à tester grâce à la PCR quantitative (qPCR) (Leulmi et *al.*, 2016).

I.7. Prophylaxie

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

Deux mesures de lutte doivent être établies :

a. Éliminer les arthropodes vecteurs

Application régulière de traitements insecticides et acaricides dans l'environnement (la végétation), sur les animaux domestiques et dans les habitations infectées. Ces traitements sont à base de : organophosphorés, organochlorés, pyréthrines et pyréthrinoïdes (Nozais et *al.*, 1996).

Chez l'homme, la prévention repose sur l'application de répulsives directement sur la peau ou le port de vêtements couvrants et imprégnés d'insecticide lors de séjours dans les forêts (Rodhain et Perez, 1985).

b. Limiter les réservoirs potentiels

L'élimination des hôtes animaux, qu'ils soient sauvages ou domestiques est très difficile à mettre en œuvre :

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

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

II. LES BARTONELLOSES

II.1. Généralités

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

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

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

II.2. Étude de l'agent causal

II.2.1. Taxonomie

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

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

La famille des *Bartonellaceae* a été également retirée de l'ordre des Rickettsiales. Les études taxonomiques récentes placent le genre *Bartonella* dans la subdivision alpha-2 des *Proteobacteria*. Ce genre est phylogénétiquement plus proche des genres *Brucella* et *Agrobacterium* que du genre *Rickettsia* (Edouard et Raoult, 2009 ; Saisongkorh et *al.*, 2009). Actuellement, le genre *Bartonella* contient plus de 40 espèces, 31 sont des espèces reconnues (Mullins et *al.*, 2017).

II.2.2. Bactériologie

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

Les bartonelles sont des bactéries aérobies, catalase et oxydase négatives. Les autres caractères biochimiques ont peu d'intérêt car ils ne permettent pas la différenciation entre diverses espèces de *Bartonella*. Ces bactéries sont intracellulaires facultatifs qui infectent les cellules endothéliales et les globules rouges et sont capables de stimuler l'angiogenèse (Boulouis et *al.*, 2008). Les bacilles peuvent être mis en évidence soit par la coloration de Warthin-Starry effectuée sur des coupes histologiques ou par la coloration de Gimenez lorsqu'une croissance bactérienne est détectée lors de la culture (Edouard et Raoult, 2009).

II.3. Épidémiologie

II.3.1. Réservoirs

Les animaux représentent un réservoir important des *Bartonella*, mais l'homme est l'unique réservoir pour deux d'entre elles (*B. quintana* et *B. bacilliformis*). Les animaux de compagnie servent de réservoirs pour plusieurs espèces de *Bartonella* zoonotiques, et peuvent aussi servir de sentinelles pour ces bactéries, hébergées par les animaux sauvages (Guptill, 2010 ; Tsai et *al.*, 2010). Des études réalisées en Algérie ont pu détecter différentes espèces de *Bartonella* chez les rongeurs, les hérissons et les chauves-souris (Bitam et *al.*, 2009b ; Leulmi et *al.*, 2016).

II.3.1.1. Réservoir félin

Le chat a longtemps été considéré comme un hôte réservoir de *Bartonella* n'exprimant pas de symptômes (Boulouis et *al.*, 2007 ; Staggemeier et *al.*, 2010).

Des preuves directes et indirectes (sérologiques) indiquent que cette espèce est un réservoir principal de *Bartonella henselae*, l'agent principal de la maladie des griffes du chat (CSD), *Bartonella clarridgeiae*, qui a été suspectée dans quelques cas de CSD et *Bartonella koehlerae*, considérée comme cause d'endocardite chez l'homme et le chien (Chomel et *al.*, 2004 ; Breitschwerdt, 2008 ; Kamrani et *al.*, 2008 ; Ohad et *al.*, 2010 ; Chomel et Kasten, 2010 ; Staggemeier et *al.*, 2010).

En Algérie, une seule espèce a été identifiée chez les chats, à savoir *Bartonella henselae* (Azzag et al., 2012).

II.3.1.2. Réservoir canin

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

Nombreuses recherches ont montrés que les chiens domestiques sont infectés par un grand nombre d'espèces de *Bartonella*, telles que *Bartonella vinsonii berkhoffii* (Breitschwerdt et al., 1995 ; Michau et al., 2003 ; Diniz et al., 2007), *B. henselae* (Gillespie et al., 2003 ; Gundi et al., 2004), *B. clarridgeiae* (Chomel et al., 2001 ; Gillespie et al., 2003 ; Gundi et al., 2004), *Bartonella rochalimae* (Henn et al., 2009), *B. quintana* (Kelly et al., 2006), *B. koehlerae* (Ohad et al., 2010), *Bartonella washoensis* (Chomel et al., 2003b), *Bartonella bovis* (Duncan et al., 2007 ; Saisongkorh et al., 2009) et *Bartonella elizabethae* (Mexas et al., 2002).

En Algérie, cinq espèces de *Bartonella* ont été révélées chez les chiens : *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella elizabethae*, *B. rochalimae* et *B. henselae* (Kernif et al., 2010; Azzag et al., 2015). Il est possible que certaines infections humaines en Algérie, peuvent être causées par les agents de bartonelloses identifiés chez ces réservoirs animaux (Bitam et al., 2009b).

II.3.2. Vecteurs

Ces dernières années de plus en plus d'espèces de *Bartonella* ont été identifiées dans les vecteurs arthropodes (Mullins et al., 2017). Les ectoparasites impliqués dans la transmission de *Bartonella* sont les phlébotomes, les poux, les puces, les acariens, et les tiques (Saisongkorh et al., 2009 ; Tsai et al., 2010).

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

En Algérie, plusieurs espèces de *Bartonella* ont été détectées par des méthodes moléculaires (PCR), dans les puces (Tableau 2).

Tableau 2 : Les espèces de *Bartonella* détectées dans les puces collectées en Algérie (Bitam et al., 2010 ; Bitam et al., 2011 ; Leulmi et al., 2016).

Puces	Hôte animal	Espèces de <i>Bartonella</i>
<i>Xenopsylla cheopis</i>	Rongeurs (Rats)	<i>B. elizabethae</i> , <i>B. tribocorum</i> , <i>Bartonella sp.</i>
<i>Leptopsylla segnis</i>	Rongeurs (Souris)	<i>B. elizabethae</i>
<i>Archeopsylla erinacei</i>	Hérissons	<i>B. clarridgeiae</i> , <i>B. elizabethae</i>
<i>Nycteribiidae sp.</i>	Chauves-souris	<i>Bartonella tamiae</i>

En 2008, un nouveau génotype nommé «*Candidatus Bartonella eldjazairii*» a été détecté dans les puces des rats *Xenopsylla cheopis* par Bitam.

D'autres vecteurs potentiels, tels que les tiques ont été récemment identifiés comme porteurs d'ADN de *Bartonella* dans diverses régions du monde (Chomel et al., 2009 ; Guptill, 2010 ; Ereqat et al., 2016). Plusieurs espèces de *Bartonella* ont été trouvées dans des tiques inféodées aux chiens (Boulouis et al., 2005b), de ce fait l'exposition aux tiques est déterminée comme facteur de risque associé aux chiens séropositifs à *Bartonella* (Billeter et al., 2008 ; Ereqat et al., 2016).

Dans notre pays, l'espèce *Bartonella tamiae* a été détectée dans les tiques *Ixodes vespertilionis* de chauves-souris par Leulmi et al. (2016).

II.3.3. Mode de transmission

La transmission de *B. henselae* chez l'homme peut se faire par un vecteur arthropode ou encore par morsures ou griffures des animaux réservoirs. En effet, ces organismes ont été décelés à partir d'écouvillons de la gencive, de la muqueuse buccale et de la pulpe dentaire ainsi qu'à partir d'échantillons de griffes de chats et de chiens (Aboudharam et al., 2005 ; Duncan et al., 2007 ; Mcelroy et al., 2010).

La transmission de Bartonelles chez les animaux est assurée par les vecteurs hématophages (Boulouis et al., 2008). La bactériémie chronique qui est fréquente chez les chats infectés, facilite la transmission vectorielle (Breitschwerdt et Kordick, 2000). Ce ne sont pas directement les piqûres de puces qui sont infestantes mais leurs fèces. Il a été démontré que *B. henselae* peut

se multiplier dans le système digestif de la puce du chat et survivre plusieurs jours dans les déjections des puces infectées (Chomel et *al.*, 2009).

II.4. Étude clinique

Le Chat est un porteur sain de l'infection à *Bartonella* et les infections expérimentales vont plutôt dans ce sens. La reproduction d'une bactériémie s'accompagne rarement de symptômes (Boulouis et *al.*, 2008).

Les manifestations cliniques des bartonelloses sont bien décrites chez le Chien. Les endocardites sont les plus fréquemment notées (Breitschwerdt et *al.*, 1995). D'autres symptômes semblent plus rares. Il s'agit en premier lieu d'atteintes granulomateuses ayant des localisations variées, épistaxis, polyarthrites, splénomégalie, méningo-encéphalite, vascularite cutanée et uvéite (Breitschwerdt et *al.*, 2004 ; Goodman et Breitschwerdt, 2005 ; Henn et *al.*, 2005 ; Saunders et Monroe, 2006). Les manifestations dans cette espèce sont assez similaires au tableau clinique chez l'homme (Boulouis et *al.*, 2008). La maladie chez le chien peut aussi être chronique avec des signes cliniques non spécifiques (perte de poids, anorexie, asthénie), ou asymptomatique (Mexas et *al.*, 2002).

II.5. La maladie chez l'homme

En plus des trois pathogènes infectieux majeurs (*B. bacilliformis*, *B. henselae* et *B. quintana*), un nombre croissant de nouvelles espèces de *Bartonella spp.* sont impliquées dans des maladies humaines (Mullins et *al.*, 2017).

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

II.6. Diagnostic

La sérologie a peu d'intérêt chez les espèces réservoirs. une sérologie positive ne renseigne pas sur l'état bactériémique de l'animal (Boulouis et *al.*, 2008). De plus, elle est peu sensible et diverses réactions croisées ont été rapportées (La Scola et Raoult, 1996 ; Diniz et *al.*, 2007).

La culture des bartonelles est laborieuse. Ces bactéries sont capables de croître in vitro sur des milieux inertes dans la mesure où leurs besoins nutritifs, et en particulier la présence

d'hémine, sont assurés. La culture cellulaire en tubes bijoux semble plus rapide et plus sensible que les cultures en milieux axéniques. Elle est plutôt réalisée uniquement dans des laboratoires spécialisés (Edouard et Raoult, 2009).

La difficulté certaine de culture des bartonelles explique sans doute la description tardive de bon nombre de ses espèces et le rôle central de la biologie moléculaire dans leur découverte et dans le diagnostic actuel des infections (Boulouis et *al.*, 2008 ; Bai et *al.*, 2010).

La PCR est réalisée directement sur des tissus (biopsie ganglionnaire, valves cardiaques, biopsies cutanées, ou autres biopsies d'organes lors de bactériémie...), sur du sang ou bien sur des arthropodes ou indirectement à partir de la souche isolée (Boulouis et *al.*, 2008 ; Ohad et *al.*, 2010).

Les gènes ou portion de gènes fréquemment utilisés pour une amplification spécifique de *Bartonella spp.* sont nombreux : ARN ribosomique 16s, *gltA* (citrate synthase), ITS (intergenic spacer region), *ribC* (chaîne α de la riboflavine synthase), *rpoB* (sous-unité β de l'ARN polymérase), *Pap 31* (31-kDa major protein) et *FtsZ* (cell division protein) (Rolain et *al.*, 2003; Saisongkroh et *al.*, 2009 ; Edouard et Raoult, 2009) . Actuellement, le Centre National de référence des Rickettsioses (CNR) à Marseille réalise des PCR quantitatives en temps réel en utilisant des sondes spécifiques (KIDD et *al.*, 2008 ; Edouard et Raoult, 2009).

II.7. Prophylaxie

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

La lutte antivectorielle est la principale mesure de prophylaxie dans le contrôle de l'infection et de la contamination du réservoir animal (Boulouis et *al.*, 2005a ; Kamrani et *al.*, 2008 ; Chomel et Kasten, 2010).

III. LA FIEVRE Q

III.1. Généralités

La fièvre Q est reconnue comme une maladie émergente et un problème de santé publique (Raoult, 1988).

Actuellement, dans le monde, peu d'organismes concernés par la santé publique ou animale disposent de données sur la prévalence réelle de la fièvre Q. Les connaissances sont particulièrement restreintes en fièvre Q animale, probablement en raison de méthodes d'une fiabilité controversée pour son diagnostic, surtout de la complexité de l'épidémiologie animale, et de la multiplicité des voies de transmission possibles. Autant dire que la fièvre Q et son agent *Coxiella burnetii* conservent en grande partie de ce mystère qui a valu son nom à la maladie (Q comme « query » : bizarre) (Eldin et al., 2017).

III.2. Étude de l'agent causal

III.2.1. Taxonomie

L'agent de la fièvre Q partage de nombreuses propriétés physiologiques avec les rickettsies (intracellulaire strict, de petite taille, non cultivable sur milieu axénique, isolé à partir de tiques), ce qui explique son classement dans la famille des *Rickettsiaceae*, ordre des *Rickettsiales*. Au regard des études phylogénétiques basées sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S, cette classification a été revisitée. Sa classification actuelle est donc la suivante : *C. burnetii* faisant partie du genre *Coxiella* est placée dans le domaine des *Bacteria*, le phylum des *Proteobacteria*, la classe des *Gammaproteobacteria*, l'ordre des *Legionellales* et la famille des *Coxiellaceae* (Boarbi et al., 2016).

III.2.2. Bactériologie

Coxiella burnetii a été séparée du genre *Rickettsia* par PHILIPP en 1948 du fait de ses propriétés particulières (Raoult, 1988). C'est un germe unique possédant une forme sporulée et une variation de phase et il présente une virulence considérable (infectieux à l'unité). *C. burnetii* est une petite bactérie (0,2 à 2 µm), pléomorphe, dont la paroi est semblable à celle des bactéries Gram négatives (Raoult et Brouqui, 1998). C'est une bactérie intracellulaire stricte qui se multiplie dans les monocytes circulants et les macrophages tissulaires. Sa croissance dans le phagolysosome lui confère une résistance vis-à-vis le système immunitaire. Une autre caractéristique, majeure et abondamment étudiée, est la variation de phase du lipopolysaccharide

(LPS), nommé phase I et phase II de *C. burnetii*. La phase II est avirulente et incapable de survivre après inoculation à un animal. La phase I est, en revanche, la forme infectieuse retrouvée dans la nature (Raoult et Brouqui, 1998 ; Rousset et *al.*, 2001).

III.3. Épidémiologie

III.3.1. Réservoirs

Coxiella burnetii peut infecter de nombreux hôtes mammifères domestiques (bovins, ovins, caprins, chevaux, chameaux, lapins) et sauvages (cervidés, ours, renards, marsupiaux, rongeurs), les mammifères marins et les reptiles, mais également les oiseaux (Boarbi et *al.*, 2016). Par ailleurs, les animaux de compagnie semblent avoir une responsabilité particulière en tant que source de contamination et pourraient expliquer en partie les cas de fièvre Q en zone urbaine. En Nouvelle-Ecosse au Canada, la prévalence chez les chats était marquée (Marrie et *al.*, 1988 ; Langley et *al.*, 1988). D'après nombreux auteurs les chats sont considérés l'un des plus importants réservoirs de *C. burnetii* pour les humains (Marrie, 1990 ; Komiya et *al.*, 2003a ; Shapiro et *al.*, 2015). Ceci suggère que le comportement de ces animaux est directement lié à leur acquisition de *C. burnetii*. En effet, les chats acquièrent cette infection généralement en ingérant des souris infectées (Marrie, 1990).

Certaines enquêtes ont également montré le risque représenté par les chiens. Des anticorps spécifiques de *Coxiella* ont été trouvés chez les chiens provenant de France (9,8%), du Sénégal (11,6%), de la Côte d'Ivoire (8,3%) et de la Guyane (5,2%) (Boni et *al.*, 1989). Les auteurs ont remarqué que les chiens en contact avec les moutons étaient plus fréquemment séropositifs que ceux sans contact. Ces résultats ne sont pas surprenants, dans la mesure où les chiens ingèrent fréquemment des morceaux de placenta lors des mises bas des brebis (Boni et *al.*, 1989 ; Buhariwalla et *al.*, 1996). Les chiens vivant en milieu rural peuvent être infectés par *C. burnetii* et devraient être considérés comme des sources possibles d'infection pour les humains (Roest et *al.*, 2013 ; Shapiro et *al.*, 2016).

L'épidémiologie de *C. burnetii* chez l'animal est complexe. Il semble y avoir deux grands cycles infectieux qui se maintiennent de façon autonome: un cycle pour les animaux domestiques et un autre pour les animaux sauvages. La circulation de la bactérie parmi les nombreuses espèces sauvages apparaît responsable de sa pérennité dans la nature, alors que les animaux domestiques sont impliqués dans un cycle prioritairement à l'origine de la contamination

humaine. Les tiques seraient des vecteurs à l'intérieur de chacun des deux cycles (Rousset et *al.*, 2001).

III.3.2. Vecteurs

C. burnetii a été mise en évidence chez de nombreuses espèces d'arthropodes (tiques en particulier, mouches, puces et poux) (Lang, 1990).

La transmission par les tiques infectées a été souvent suspectée en raison des liens étroits de *C. burnetii* avec les rickettsies. Les larves de tiques peuvent non seulement s'infecter en ingérant du sang d'animaux infectés et héberger la bactérie pendant tout leur développement jusqu'au stade adulte, mais également transmettre *C. burnetii* à leur progéniture (Eklund et *al.*, 1947 ; Beaman et Hung, 1989). *C. burnetii* a été isolée dans environ 40 espèces de tiques, et la possible transmission à des humains a été rapportée (Anderson et *al.*, 2013).

Dans le sud de la France, *C. burnetii* a été détectée par qPCR dans des tiques prélevées sur des chiens, des chats et des humains (Socolovschi et *al.*, 2012c). L'importance des tiques comme vecteur entre les animaux est cependant rarement évaluée ; toutefois, elle semble plus significative pour la faune sauvage (Rousset et *al.*, 2001). Très récemment l'ADN de *C. burnetii* a été identifié dans les tiques de chauves souris en Algérie (Leulmi et *al.*, 2016).

Il ya peu d'investigations concernant la présence de *C. burnetii* dans d'autres ectoparasites comme les puces. Récemment ce pathogène a été décelé dans trois espèces de puces (*Xenopsylla cheopis*, *Ctenocephalides felis* et *Ct. canis*) collectés à partir de renards et de rongeurs au niveau de l'île de Chypre (Psaroulaki et *al.*, 2014). Le rôle des puces dans le maintien et la transmission de *C. burnetii* chez les vertébrés reste à déterminer.

III.3.3. Source et mode de transmission

L'élément important de la dissémination de *C. burnetii* est sa capacité de survivre plusieurs mois dans l'environnement extérieur. Les animaux porteurs excrètent généralement des *Coxiella* dans leurs excréments (féces et urine) et dans le lait. L'excrétion maximale de la bactérie a lieu dans les produits de parturition (Anderson et *al.*, 2013). *C. burnetii* se retrouve alors dans l'environnement extérieur sous une forme pseudosporulée très résistante, et responsable en grande partie de la dissémination de la bactérie. Chez l'animal comme chez l'homme, le mode de contamination le plus fréquent est l'inhalation d'aérosols contaminés. Les carnivores peuvent

aussi se contaminer par l'échage des produits de parturition ou par ingestion d'aliments souillés ou d'animaux infectés (Rousset *et al.*, 2001 ; Mares-Guia *et al.*, 2014).

III.4. Etude clinique

Coxiella burnetii est très ubiquitaire et rencontrée dans le monde entier. A la différence de la maladie humaine, reconnue comme très polymorphe, peu de manifestations cliniques sont associées à la fièvre Q animale. En effet, la fièvre Q animale a été recherchée principalement en tant que cause d'avortements et de mortinatalités chez les ovins et les caprins, et pouvant conduire à des problèmes d'infertilité chez les bovins. Or, il faut garder à l'esprit que les formes inapparentes sont très fréquentes, d'où une réelle sous-estimation de l'importance de la prévalence de la fièvre Q chez les animaux (Anderson *et al.*, 2013 ; Boarbi *et al.*, 2016).

III.5. La maladie chez l'homme

La fièvre Q est une zoonose mondialement répartie dont les particularités cliniques chez l'homme sont curieuses du fait de la possibilité d'observer des formes aiguës (fièvre isolée, hépatite, pneumonie) ou chroniques (endocardite) (Anderson *et al.*, 2013 ; Mares-Guia *et al.*, 2014).

En Algérie, peu de cas humains ont été signalés, dont un à Alger en 2005, où deux patients étaient séropositifs à *C. burnetii* (un était confirmé positif par PCR nichée) (Benslimani *et al.*, 2005). En 2012, lors d'une investigation faite à Oran, 268 échantillons de sang à partir de patients fébriles ont été testés par qPCR, les résultats ont montré qu'un seul patient était infecté par *C. burnetii* (Angelakis *et al.*, 2014).

III.6. Diagnostic

Le diagnostic des formes cliniques repose sur les techniques sérologiques (Elisa, immunofluorescence indirecte et fixation du complément) ou sur l'isolement du germe par culture cellulaire (Raoult, 1988).

La détection moléculaire par amplification génique (PCR) est la technique de choix car elle permet d'envisager aujourd'hui des recherches épidémiologiques de façon plus abordable (Rousset *et al.*, 2001).

Les séquences les plus communément utilisées pour la détection de l'ADN de *C. burnetii* par PCR standard sont des séquences plasmatiques (QpH1 ou QpRS) ou des gènes présents

sur le chromosome comme les gènes codant l'isocitrate-deshydrogenase (*icd*), la protéine de membrane externe (*comI*) et la superoxyde dismutase (*sod*) (Boarbi et al., 2016). Actuellement le Centre national de référence (CNR) des Rickettsies réalise l'amplification génique des séquences *IS1111* et *IS30a* par une technique de PCR quantitative en temps réel à l'aide de sondes d'hydrolyse. Ces séquences sont présentes en grand nombre et offrent une forte sensibilité (Socolovschi et al., 2010).

III.7. Prophylaxie

La lutte contre la coxiellose animale se heurte à la complexité de l'épidémiologie : une multiplicité de réservoirs et vecteurs, une infection le plus souvent inapparente, une grande résistance de la bactérie sous forme desséchée et sa dissémination sous forme d'aérosols infectieux. Dans ce contexte, une prophylaxie d'éradication semble difficilement envisageable. En revanche, une prophylaxie axée sur un outil vaccinal et sur des mesures sanitaires peut être instaurée. Cependant, si le vaccin contribue à une diminution de l'incidence clinique, il ne permet pas de limiter suffisamment le portage et l'excrétion bactérienne (Rousset et al., 2001).

Une hygiène stricte peut être recommandée pour limiter la contamination humaine et l'extension de l'infection dans le troupeau en :

- Plaçant les animaux infectés en box isolés lors des mises bas,
- Détruisant les placentas,
- Traitant les femelles gestantes aux tétracyclines.

Des précautions doivent être également prises lors de la prise en charge des chattes ou des chiennes parturientes et le contact avec les sécrétions lors de la mise bas doit être évité (Cairns et al., 2007 ; Roest et al., 2013).

Ainsi, l'ensemble des mesures de prophylaxie médicale et sanitaire devrait permettre d'éradiquer, ou tout au moins maîtriser, la fièvre Q animale afin de réduire le plus possible l'incidence de cette zoonose préoccupante (Raoult et Brouqui, 1998).

Afin de protéger la santé publique dans notre pays, les recherches vétérinaires doivent s'orienter vers une meilleure connaissance de l'épidémiologie de *C. burnetii* et la mise en place d'actions de lutte contre la fièvre Q animale.

IV. L'EHRLICHIOSE MONOCYTAIRE CANINE

IV.1. Généralités

L'ehrlichiose canine est une maladie infectieuse causée par une bactérie intramonocytaire, *Ehrlichia canis*. Cette dernière a été décrite pour la première fois en 1935 par Donatien et Lestoquard en Algérie qui la nommèrent *Rickettsia canis* (Donatien et Lestoquard, 1935). C'est une maladie systémique transmise par la tique brune *Rhipicephalus sanguineus* (l'unique vecteur actuellement connu). L'infection a une distribution mondiale. Elle est rencontrée en Afrique, en Europe, aux Etats-Unis, en Asie du Sud et en Inde (Jouret, 2001).

IV.2. Étude de l'agent causal

IV.2.1. Taxonomie

L'agent étiologique de l'Ehrlichiose monocyttaire canine appartenait initialement à l'Ordre des Rickettsiales, Famille des *Rickettsiaceae*, Tribu des *Ehrlichieae*, genre *Ehrlichia*.

L'application des outils de phylogénie moléculaire au monde des rickettsies a apporté une révision à la taxonomie. Ainsi, la tribu des *Ehrlichieae* n'appartient plus à la famille des *Rickettsiaceae*. Les *Ehrlichia* sont rapprochées des *Wolbachia* et des *Anaplasma*. Les Ehrlichieae font maintenant partie de l'ordre des Rickettsiales et de la famille des Anaplasmataceae (Fig. 5) (Allison et Little, 2013).

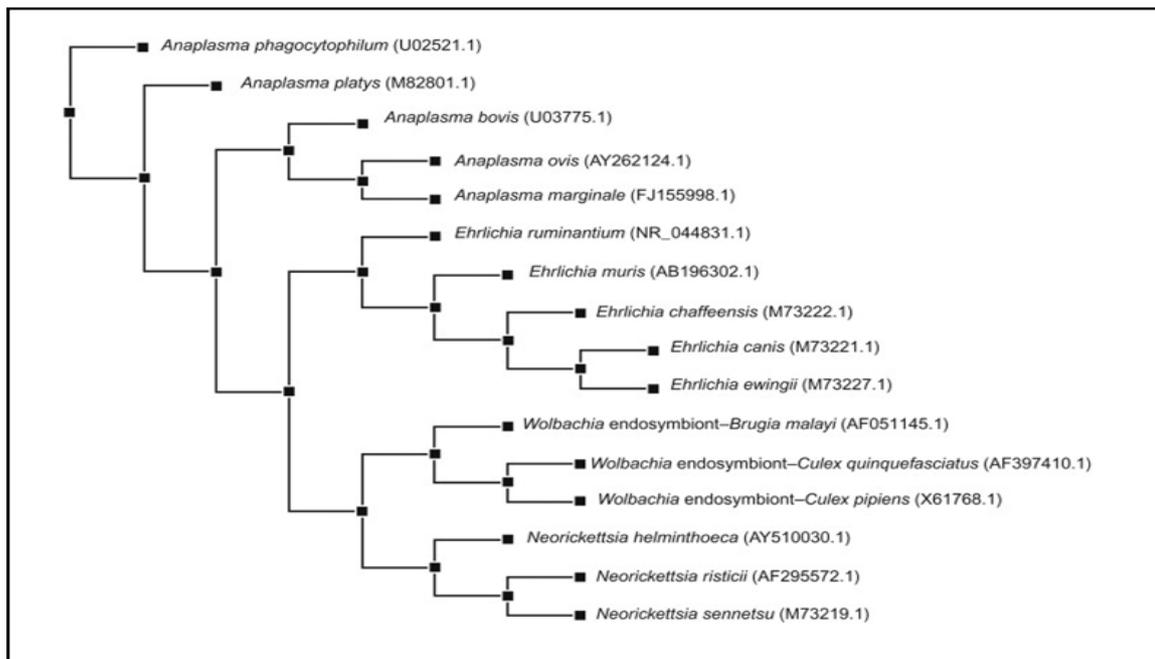


Figure 5: Arbre phylogénétique de la famille des Anaplasmataceae basée sur l'alignement des séquences de gène ARN ribosomique 16S (Severo et al., 2015).

IV.2.2. Bactériologie

Les *Ehrlichiae* sont des bactéries Gram négatif intracellulaires obligatoires, visibles en microscopie optique. Ce microorganisme immobile et de petite taille, infecte le cytoplasme des leucocytes (monocytes sanguins, macrophages tissulaires, cellules réticulo-endothéliales et histiocytes de différents organes) et des thrombocytes du chien et des autres canidés et se multiplie dans le phagosome (Parzy *et al.*, 1991). Cette bactérie ne prend pas la coloration de Gram, mais apparaît à la coloration de May-Grünwald-Giemsa comme une inclusion cellulaire basophile. Les *Ehrlichia* se présentent sous trois formes morphologiques successives : les corps élémentaires (0,5 µm), les corps initiaux (0,5-2,5 µm) et les morulas (4 µm) (Raoult et Brouqui, 1998 ; Jouret, 2001).

IV.3. Épidémiologie

IV.3.1. Réservoirs

Les espèces sensibles à *E. canis* sont les canidés domestiques et sauvages. De nombreuses investigations sérologiques et moléculaires de l'Ehrlichiose monocyttaire canine à travers le monde ont été réalisées chez les chiens (Harrus *et al.*, 2004 ; Lakshmanan *et al.*, 2007 ; Baneth *et al.*, 2009 ; Romero *et al.*, 2011 ; Tanikawa *et al.*, 2013 ; Maazi *et al.*, 2014). En Algérie, très récemment, deux études ont indiqué la présence moléculaire de *E. canis* dans 6,4% des chiens provenant de Tizi Ouzou et de Béjaïa (Dahmani *et al.*, 2015) et dans 4,7% chez la population canine de la wilaya d'Alger (Azzag *et al.*, 2015). La prévalence sérologique de *E. canis* a été également évaluée avec un taux de 30 % chez ces derniers (Azzag *et al.*, 2015). En effet les chiens représentent une excellente source de la bactérie particulièrement lors de la phase aiguë de la maladie (Saladin, 2007).

Le rôle pathogène d'*Ehrlichia canis* chez les chats a été proposé principalement sur la base des preuves sérologiques d'une infection naturelle (Ortuño *et al.*, 2005 ; Aguirre *et al.*, 2004). Cependant, les inclusions semblables à *Ehrlichia* ont été détectées dans les monocytes, les lymphocytes et les granulocytes de chats malades. De plus, les techniques moléculaires ont confirmé la présence d'*E. canis* chez les chats présentant des signes cliniques compatibles avec l'ehrlichiose en Amérique du Nord (Breitschwerdt *et al.*, 2002). Récemment plusieurs chercheurs ont rapporté la détection d'*E. canis* par PCR chez les chats (De Oliveira *et al.*, 2009 ; Braga Mdo *et al.*, 2012 ; Braga *et al.*, 2014 ; Maia *et al.*, 2014 ; Hegarty *et al.*, 2015).

Les résultats de ces travaux suggèrent que les chats peuvent être des hôtes d'*E. canis* et une source d'infection pour les autres animaux y compris l'homme.

IV.3.2. Vecteurs

Le rôle pathogène indirect de la tique est fondamental dans la transmission. Malgré l'absence de transmission transovarienne du microorganisme chez la tique vectrice « *Rh. sanguineus* », celle-ci constitue un éventuel réservoir plausible grâce à la transmission stranstadiale de la bactérie (d'une tique immature aux stades suivants) (Socolovschi et al., 2012a). En effet, les adultes à jeun peuvent survivre 158 à 568 jours, avec un pouvoir contaminant de 150 jours environ (Jouret, 2001). Le vecteur arthropode se contamine après un repas de sang sur un animal atteint dans les 2 à 3 premières semaines de l'infection, lorsque les monocytes parasités sont les plus nombreux dans le torrent circulatoire. Les Ehrlichieae se répliquent dans les tiques et sont ensuite transmises horizontalement par morsure via les sécrétions salivaires du vecteur jusqu'aux cellules sanguines de l'animal ou de l'Homme (Saladin, 2007).

IV.3.3. Mode de transmission

Le passage de l'infection d'un chien à un autre est directement tributaire de la présence du vecteur (Braga et al., 2014).

IV.4. Étude clinique

L'infection par *E. canis* est à l'origine d'un polymorphisme clinique important et d'une large variété d'anomalies biochimiques et hématologiques chez les chiens (Jouret, 2001).

Il existe deux formes : une forme aiguë caractérisée par des signes modérés, avec fièvre, perte de poids, anorexie et asthénie, accompagnés d'une polyadénomégalie ; et une forme chronique, avec un tableau hémorragique et des signes d'anémie, des oedèmes et un état de choc conduisant à la mort dans les cas graves. Certains chiens sont asymptomatiques, mais porteurs d'*E. canis* pendant plusieurs années. La quantité de bactéries dans le sang circulant est infime, les microorganismes étant quiescents dans les macrophages sont protégés de toute réaction de l'hôte. Toutefois cette source potentielle d'agents pathogènes n'est pas négligeable, car certains auteurs la soupçonnent dans la mesure où ces animaux infectés peuvent présenter des phases de rechute (Little, 2010).

IV.5. La maladie chez l'homme

La pathogénicité d'*E. canis* pour l'homme a longtemps été suspectée à cause de la réaction sérologique croisée obtenue en 1986 lors du premier cas humain d'ehrlichiose répertorié par Maeda et al. (1987) et lors de l'étude de Parzy et al. (1991). Cependant, grâce à l'isolement en 1991, de l'agent pathogène sur un malade, une étude moléculaire a pu être réalisée. Elle a conduit à mettre en évidence des différences génomiques entre la bactérie isolée et *E. canis* : la nouvelle bactérie fut nommée *Ehrlichia chaffeensis* (Dawson et al., 1991).

Récemment, une souche d'*Ehrlichia* présentant 99.9% d'homologie pour la séquence du gène codant pour l'ARNr16S avec *E. canis* a été découverte au Venezuela sur des patients humains atteints d'une ehrlichiose (Unver et al., 2001 ; Perez et al., 2006). Le chien pourrait alors servir de réservoir ou de sentinelle pour cette ehrlichiose, et les humains la contractent par les piqûres occasionnelles de tiques brunes (Unver et al., 2001).

IV.6. Diagnostic

Parmi les différentes méthodes sérologiques évoquées, l'IFI reste la méthode de référence. Toutefois, il est difficile d'évaluer précisément le statut de l'animal, puisque le titre en anticorps peut mettre des années à devenir négatif, notamment pour *E. canis*. De plus la possibilité d'avoir des réactions croisées avec les autres Ehrlichieae (Aguirre et al., 2004). L'isolement de la bactérie se fait en transférant des monocytes infectés par *E. canis* sur une culture cellulaire. La mise en culture est longue : il faut 14 à 34 jours pour voir apparaître les premiers microorganismes (Saladin, 2007). L'amplification génique reste la méthode de choix dans le diagnostic et l'évaluation des traitements des infections à *E. canis* (Harrus et al., 2004). La PCR et le séquençage permettent l'étude des polymorphismes de souches d'*E. canis* par l'étude du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (Jouret, 2001).

De nouveaux systèmes moléculaires ont été désignés pour la détection spécifique de *E. canis* grâce à la PCR en temps réel au niveau de l'unité des Rickettsies à Marseille. Ces systèmes sont basés sur les gènes codant pour une protéine apparentée à la glutarédoxine (*E can-0701 system*) et une protéine hypothétique (*E can-0503 system*) (Socolovschi et al., 2012a).

IV.7. Prophylaxie

La prophylaxie repose essentiellement sur le contrôle des infestations par les tiques. L'utilisation d'une chimiothérapie préventive à base de tétracyclines a également été proposée en cas de déplacements des chiens indemnes en zone d'enzootie (Little , 2010).

V. LA BORRELIOSE DE LYME

V.1. Généralités

La borreliose de Lyme est une maladie polysystémique causée par les bactéries du complexe d'espèces *Borrelia burgdorferi s.l.* Elle est transmise par les tiques à de nombreux hôtes vertébrés. C'est une maladie vectorielle à pouvoir zoonotique (Troude, 2014). Elle se produit principalement dans les régions de l'hémisphère Nord et touche les Etats Unis, le Sud du Canada, l'Europe, la Chine, la Corée et le Japon (Steere et *al.*, 2016).

V.2. Étude de l'agent causal

V.2.1. Taxonomie

L'agent de la borreliose de Lyme appartient à la famille des *Spirochetaceae*, au genre *Borrelia* et au complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Troude, 2014).

Actuellement, ce complexe comprend 18 espèces proposées et confirmées (Fig. 6). Ces espèces varient en fonction de leur répartition géographique, leur spécificité de l'hôte et leur capacité à provoquer des maladies chez l'homme (Margos et *al.*, 2011).

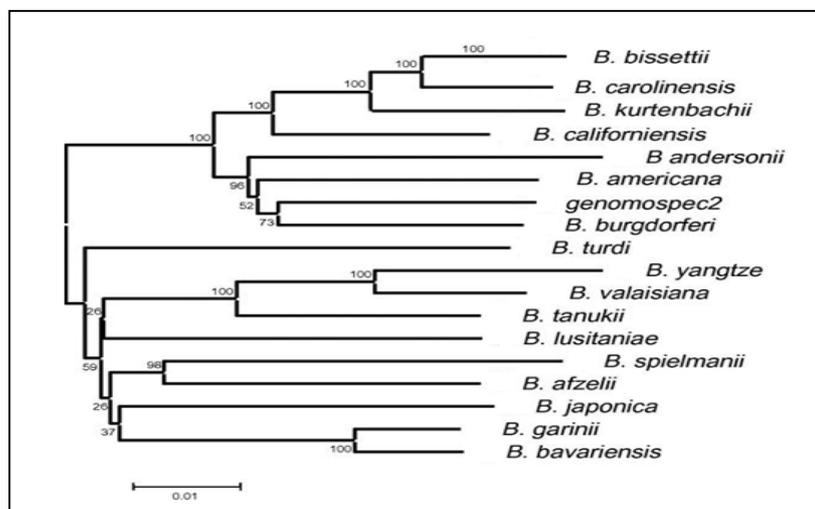


Figure 6: Arbre phylogénétique des espèces du complexe de *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*s.l.*) (Margos et *al.*, 2011).

V.2.2. Bactériologie

Les spirochètes du genre *Borrelia* sont des bactéries Gram négatif spiralées, mobiles et flexibles. Leurs spires, au nombre de cinq à dix, sont régulières et larges. Concernant la taille de ces bactéries, leur diamètre varie entre 0,2 μm et 0,5 μm et leur longueur oscille entre 8 et 30 μm selon l'espèce. D'un point de vue structural, le corps bactérien est constitué de quatre couches distinctes qui, classées dans l'ordre centripète, sont : la couche amorphe, l'enveloppe externe, l'espace périplasmique et le cylindre protoplasmique qui comprend le génome et la membrane cytoplasmique (Fig. 7). L'espace périplasmique héberge l'appareil locomoteur de la bactérie qui est constitué de sept à onze flagelles (Krupka et Straubinger, 2010 ; Troude, 2014).

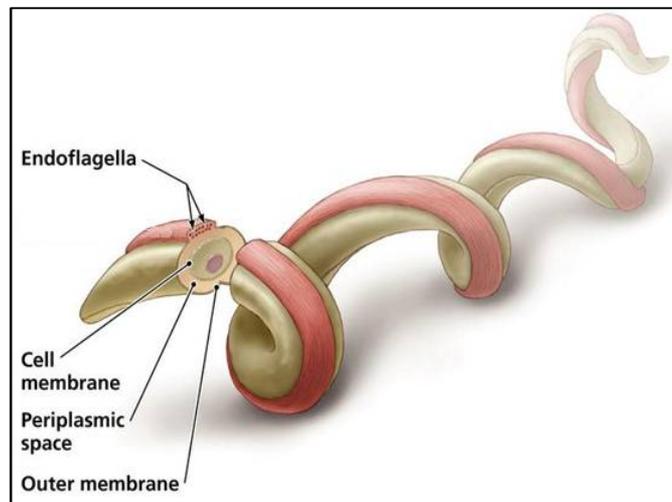


Figure 7: Structure du spirochète *Borrelia burgdorferi* (source internet 1)

V.3. Épidémiologie

V.3.1. Réservoirs

Les espèces réservoirs doivent être capables d'acquérir le spirochète à partir d'une tique infectée, de permettre à l'agent de se multiplier et/ou de se développer et de persister dans son corps et de transmettre l'agent à une autre tique lors de son repas sanguin. De nombreux mammifères sauvages peuvent jouer le rôle de réservoir de la bactérie, essentiellement les rongeurs car leur infection reste inapparente. Les lièvres et les hérissons sont aussi des réservoirs compétents pour de nombreux génotypes. Les oiseaux et les reptiles jouent également un rôle important puisqu'ils assurent le maintien de *Br. burgdorferi s.l.* en acquérant l'infection des nymphes et la transmettant ensuite aux larves (Mannelli et al., 2012). Les grands mammifères tels que les cervidés, les bovins, les renards et les sangliers ne sont pas considérés comme une source

efficace de borréliose, bien qu'ils servent d'hôtes pour un grand nombre de tiques et contribuent de manière significative à la dissémination de la population de vecteurs (Mannelli et al., 2012).

Savić et al. (2010) ont montré la persistance naturelle de *Br. burgdorferi s.l.* au sein de la population canine et leurs tiques en Serbie. De plus, Inokuma et al. (2013) ont pu diagnostiquer et confirmer l'infection par *Br. garinii* chez des chiens malades au Japon à l'aide de tests sérologiques et moléculaires.

Les techniques moléculaires n'ont pas été largement utilisées dans le diagnostic canin (Skotarczak, 2014). Cependant, plusieurs auteurs ont mis en évidence les anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* chez le chien avec des prévalences variables (Skotarczak et al., 2005 ; Berzina et Matisse, 2013 ; Nascimento et al., 2016 ; Bjurman et al., 2016). Le risque d'infection de ces animaux par *Borrelia burgdorferi* est corrélé à la prévalence des tiques infectées dans une région et à la probabilité d'être mordu par les tiques vectrices. En effet, la séropositivité chez les chiens est plus élevée dans les zones fortement endémiques où 60 à 80% des tiques peuvent héberger des spirochètes de *Borrelia* (Birchard et Sherding, 2006).

Ces animaux peuvent jouer un rôle dans l'épidémiologie de la borréliose de Lyme (Margos et al., 2011). La découverte des chiens séropositifs à *Borrelia burgdorferi s.l.* à Alger par Azzag et al. (2015) confirme que les souches de *Borrelia spp.* circulent au sein la population canine.

Bien que les chats soient également considérés comme hôte pour les tiques, la maladie de Lyme est peu documentée chez ces animaux. En effet Chao et al. (2014) ont pu détecter *Br. garinii* dans les tiques *Ixodes* parasitant les chats. De plus une étude expérimentale a montré que les chats développent l'infection à *Borrelia burgdorferi* après exposition à des tiques infectées (Lappin et al., 2015). Les anticorps anti-*Borrelia burgdorferi s.l.* ont été également détectés dans les sérums félines (Magnarelli et al., 2005 ; Pantchev et al., 2016). D'après Pantchev et al. (2016), La borréliose de Lyme doit être suspectée chez les chats présentant des signes cliniques compatibles.

V.3.2. Vecteurs

Les spirochètes sont très rarement transmis par voie transovarienne chez le vecteur, de sorte que les larves et les nymphes sont essentielles pour maintenir les *Borrelia*. Plus particulièrement, on retrouve davantage de larves sur les petits mammifères, les nymphes sur des mammifères de taille moyenne et les adultes plutôt sur des grands animaux de type ongulés (Margos et al., 2011). Par conséquent, ce sont les deux premières catégories d'animaux qui jouent un rôle de réservoirs de la borreliose de Lyme.

Selon les zones géographiques, il existe différentes espèces de tiques notamment *Ixodes ricinus* vecteurs compétents de *Borrelia burgdorferi s.l.* en Europe, *Ixodes scapularis* aux Etats-Unis et *Ixodes persulcatus* en Asie (Mannelli et al., 2012).

L'aire géographique de *Ixodes ricinus* et *Br. burgdorferi s.l.* est en extension grâce aux effets du changement climatique sur les populations hôtes et sur le développement, la survie et l'activité saisonnière des tiques (Mannelli et al., 2012).

En Afrique du Nord, *Borrelia* spp. ont été détectées chez les tiques *I. ricinus* en Tunisie et au Maroc. *Br. lusitaniae* était prédominante. Cependant, *Br. garinii* était également présente chez les *Ixodes* dans ces pays (Younsi et al., 2001; Sarih et al., 2003 ; Bouattour et al., 2004). Cette dernière a été récemment détectée en Algérie chez les tiques *I. ricinus* collectées dans la wilaya d'El Tarf en utilisant la PCR standard et le séquençage (Benredjem et al., 2014). Des investigations ultérieures sont nécessaires pour identifier le rôle des hôtes animaux dans les cycles de transmission de *Br. garinii* en Algérie.

V.3.3. Mode de transmission

La borreliose de Lyme est transmise par un arthropode hématophage du genre *Ixodes* appartenant à la famille des *Ixodidae* (Mannelli et al., 2012).

V.4. Étude clinique

Chez les animaux, la maladie cliniquement apparente se trouve principalement chez les chiens. Les chiens atteints de borreliose présentent dans 5% des cas des signes cliniques qui sont généralement non pathognomoniques tels que la léthargie, l'inappétence, la fièvre, les adénites et les boiteries (Krupka et Straubinger, 2010). Le rôle pathogène des espèces du groupe *Br. burgdorferi s.l.* est encore mal connu chez les carnivores domestiques. Il faut savoir que le chien héberge le plus souvent d'autres agents transmis par les tiques et des infections doubles

ou triples peuvent se produire et brouiller l'analyse du tableau clinique par des formes atypiques (Skotarczak, 2014). La plupart des chiens naturellement infectés sont asymptomatiques (Krupka et Straubinger, 2010).

Les chats infectés expérimentalement développent la polyarthrite, la méningite, la pneumopathie et la lymphadénopathie (Birchard et Sherding, 2006).

V.5. La maladie chez l'homme

Cette maladie est considérée comme zoonose émergente et potentiellement grave (Mannelli et al., 2012). Les génotypes qui infectent fréquemment l'homme sont : *Br. burgdorferi* sensu stricto (*s.s.*), *Br. afzelii*, et *Br. garinii*. Ces pathogènes provoquent un large éventail de manifestations cliniques allant de l'érythème cutané migrant à l'arthrite sévère ou à des manifestations neurologiques (Rudenko et al., 2011 ; Steere et al., 2016). L'espèce la plus souvent neurotrope est *Br. garinii*, elle a été impliquée dans les cas de méningite et de l'encéphalomyélite (Margos et al., 2011). Dans notre pays, 21 cas de maladie de Lyme ont été signalés à Alger entre 1996 et 1999. Cependant, ces cas ont été diagnostiqués seulement par détection des anticorps sériques contre *Br. burgdorferi s.l.* par ELISA sans confirmation par Western blot (Alem et Hadji, 1999). Très récemment, 257 patients fébriles ont été testés pour *Borrelia* par des méthodes moléculaires à Oran. Une séquence indicative d'un nouveau *Borrelia* sp. nommé « *Candidatus Borrelia algerica* » a été détecté dans un seul échantillon de sang. D'autres études peuvent aider à prédire son importance épidémiologique (FotsoFotso et al., 2015).

V.6. Diagnostic

Les analyses sérologiques consistent en la mise en évidence de la réponse de l'organisme à l'infection. Ils reposent sur une technique ELISA, une immunofluorescence indirecte et le test d'immuno-empreinte (le western-blot). Ces tests fournissent un diagnostic présomptif. L'identification des spirochètes par culture et l'examen microscopique à fond noir nécessitent du temps. De plus, cette méthode a montré peu de spécificité et de sensibilité dans le diagnostic de la maladie de Lyme chez le chien (Birchard et Sherding, 2006).

La PCR et le séquençage d'ADN demeure un outil indispensable pour l'identification et la différenciation des espèces ou souches de *Borrelia* lors d'enquêtes épidémiologiques (Margos et al., 2011). Une recherche très intéressante a étudié la corrélation des signes cliniques avec la présence d'ADN de *Borrelia burgdorferi s.l.* et leurs anticorps dans le sang des chiens. Skotarczak et al. (2005) ont indiqué qu'il existe une corrélation positive entre les symptômes de borreliose et la présence d'ADN de *Br. Burgdorferi* et ont conclu que la PCR peut contribuer à améliorer dans une large mesure le diagnostic de la maladie de Lyme canine.

Lors de PCR, les gènes ciblés sont le plus souvent : le gène *rrs* codant pour la petite sous unité ribosomale (ARNr 16S) et le gène *fla* codant pour la flagelline (Skotarczak et al., 2005 ; Benredjem et al., 2014).

V.7. Prophylaxie

La prophylaxie repose tout d'abord par une lutte contre le vecteur « *Ixodes* ». Pour ce faire, une observation minutieuse de l'animal est recommandée après chaque exposition potentielle. Un étiquage efficace doit être effectué le plus rapidement possible lors de la présence d'une tique. Des traitements préventifs de type acaricides peuvent être également mis en place pour éviter ou limiter l'infestation par les tiques (Steere et al., 2016). La vaccination est possible mais elle est très controversée dans le sens où 95% des chiens ne manifestent pas la maladie (Troude, 2014).

CHAPITRE 2

MATERIELS & METHODES

L'objectif de ce travail est de rechercher et de détecter, par des techniques moléculaires, la présence des bactéries pathogènes zoonotiques vectorisées chez les chiens et les chats errants ainsi que leurs ectoparasites provenant de la wilaya d'Alger.

I. SITE D'ETUDE

L'étude a été menée dans la région d'Alger, la capitale de l'Algérie et la ville la plus peuplée. Située au nord-centre du pays. Elle est constituée de 13 Daïras et de 57 communes. Le territoire de la wilaya (36 46'34" Nord, 3 03'36" Est) s'étend sur une superficie de 1190 Km². Le relief se caractérise par trois zones longitudinales: Le Sahel, le Littoral et la Mitidja. Alger est limitée par la mer Méditerranée au Nord, la Wilaya de Blida au Sud, la Wilaya de Tipaza à l'Ouest et la Wilaya de Boumerdes à l'Est. Cette région se caractérise par un climat méditerranéen tempéré. Elle est connue par ses longs étés chauds et secs. Les hivers sont doux et humides. Les pluies sont abondantes et peuvent être diluviennes (Source internet 2).



Figure 8: Représentation géographique de la région d'ALGER (Google map., 2016).

II. COLLECTE DE PRELEVEMENTS

La collecte de prélèvements a été effectuée durant une période s'étalant du mois d'Octobre 2010 au mois de Septembre 2013 au niveau de la fourrière canine de la wilaya d'Alger. Pour faciliter le travail de terrain, des collaborations ont été établies avec les médecins vétérinaires et leurs assistants travaillant au niveau de la fourrière canine.

II.1. Evaluation éthique et scientifique

Tous les animaux introduits dans cette étude ont été capturés dans le contexte du programme national pour la lutte contre la rage. L'évaluation des risques a été soumise et approuvée par le comité national d'éthique et la décision de l'hygiène urbaine de la ville d'Alger (HURBAL). HURBAL est une institution affiliée au Ministère de l'Intérieur, au Gouvernement local et au Ministère algérien de l'agriculture, du développement rural et de la pêche. En septembre 2010, l'HURBAL nous a procuré l'autorisation pour recueillir des échantillons.

II.2. Présentation de la fourrière canine

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

Au niveau de cet établissement, des médecins vétérinaires sont responsables de veiller à la bonne santé des animaux capturés, et de prendre soin des animaux malades, en leur donnant les traitements requis. Leurs assistants sont formés sur les méthodes à utiliser pour attraper soigneusement les animaux errants. Une fois capturés, les chiens et les chats sont logés dans des cages régulièrement nettoyés et désinfectés. Ils sont nourris et inspectés quotidiennement. Après expiration du délai légal de la garde (7 jours, afin de permettre aux propriétaires de réclamer leurs animaux de compagnie), Ils sont euthanasiés.

La fourrière a pour rôles de :

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

Les champs d'action de la fourrière canine :

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

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

II.3. Types et techniques de prélèvement

L'essai a concerné la population canine et féline de la région d'Alger. Un total de 117 chiens et de 107 chats a été prélevé. Une fiche de renseignement a été établie pour chaque animal, sur laquelle sont notés, notamment l'espèce, la race, le sexe et l'âge de l'animal ainsi que la présence ou l'absence d'insectes ou d'acariens (Annexe 2).

Nous avons prélevé les rates et les parasites externes (tiques, puces et poux) attachés à leurs hôtes.

L'échantillonnage a été mené au niveau de la fourrière canine dans un local dédié et équipé pour les activités vétérinaires. Les animaux choisis de façon aléatoire ont fait l'objet d'un examen général, ensuite une autopsie a été effectuée immédiatement après l'euthanasie de ces derniers. Des fragments de rate ont été prélevés de manière aseptique à l'aide de scalpels adaptés puis introduits directement dans des tubes stériles.

La collecte d'ectoparasites a été également pratiquée en ciblant des zones bien précises sur le corps de l'animal (zones de prédilection : la tête, le cou et la croupe). La technique consiste à examiner visuellement en écartant le pelage des chiens et des chats et de prélever de façon mécanique les acariens en utilisant des pinces émoussées ou bien par le brossage pour les insectes. Il faut noter qu'aucune substance chimique n'a été appliquée sur ces parasites.

II.4. Conservation des échantillons

Les matériaux biologiques collectés étaient codifiés et conservés dans l'éthanol 70 %. Ces derniers ont été acheminés par la suite à l'unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE) à Marseille, en vue de les analyser.

III. IDENTIFICATION DES ECTOPARASITES

L'identification des ectoparasites au niveau du genre et espèce était réalisée à l'aide d'un stéréomicroscope (ZEISS Axio Zoom V16, Thornwood, USA), en se basant sur des critères morphologiques et des clés taxonomiques normalisées.

Au laboratoire de l'entomologie, la manipulation de ces ectoparasites était effectuée dans une boîte de pétri à l'aide d'une pince fine. Pendant l'observation, le corps de l'arthropode est humidifié avec de l'alcool à 70° pour éviter sa dessiccation et enlever les débris qui l'entoure.

III.1. Base d'identification des tiques

L'affiliation au genre puis à l'espèce a été procédée grâce à des clés dichotomiques de Estrada-Peña *et al.* (2004) et de Walker *et al.* (2003).

L'identification du genre repose sur l'observation de certains caractères morphologiques du corps de la tique :

- Le rostre : Longueur et forme.
- Les yeux : Présence ou absence.
- Le sillon anal : Présence ou absence et position par rapport à l'anus.
- Les festons : Présence ou absence sur le bord postérieur de l'idiosome; aspect du feston médian.
- Coxa1 : Bifide ou non.
- Les plaques ventrales des mâles : Présence, nombre et forme.
- Le port génital des femelles : Aspect externe.

La détermination des espèces est basée sur certains détails morphologiques plus poussés à savoir:

- La coloration des pattes et la présence de marbrures.
- La ponctuation du scutum.
- La forme des stigmates et des yeux.
- La forme du gonopore pour la femelle et des plaques adanales pour le mâle.
- Les caractères des sillons.
- La forme des festons.

III.2. Base d'identification des puces

La reconnaissance du genre et de l'espèce est faite selon les clés d'identification de Whitaker (2007) et de Beaucournu et Launay (1990) en se basant sur plusieurs caractères, les plus importants sont:

- La forme de la tête.
- La présence ou l'absence de cténidies génales et pronotales; le nombre et le caractère des épines.
- La présence, le nombre et l'aspect des soies oculaires et frontales ou des soies sur les autres parties du corps de la puce (sternite, tarse...).
- La présence ou l'absence de baguette verticale sur le mésothorax.
- La forme de spermathèque.

- Le nombre d'encoches sur le tibia des pattes postérieures.

L'identification des puces est rendue plus facile grâce à la technique d'éclaircissement et cela en suivant le protocole de l'insectarium à l'URMITE qui nous a permis par la suite de monter des lames de références, les étapes sont les suivantes :

- Laver la puce avec de l'eau distillée.
- Plonger l'insecte dans un bain de l'hydroxyde de potassium (KOH) à 20% pour l'éclaircissement, pendant 24h à 48h à température ambiante.
- Rincer abondamment avec de l'eau distillée pendant 30 à 40 min.
- Mettre la puce dans une solution d'acide Acétique (CH_3COOH) à 5% pendant 15 à 30 min pour stopper la réaction de macération.
- Le spécimen doit être déshydraté à l'aide de concentrations croissantes d'éthanol (30%, 50% et 90%, à 10-15 minutes d'intervalle) afin de prévenir les distorsions. Ensuite la puce est immergée dans l'éthanol absolu pendant au moins 24 heures.
- En fin pour le montage, fixer la puce sur la lame et ajouter une goutte de liquide d'inclusion rapide (Le baume de Canada) et couvrir d'une lamelle.

N.B : La puce doit être positionnée comme suit: la tête tournée vers la droite et les pattes vers le haut de la lame.

Bien que le spécimen puisse être observé dès la fin du montage, il est recommandé d'attendre que celui-ci soit complètement sec et solidifié. Juste après le montage, un poids est posé sur la lamelle pour toute une nuit afin que le montage se consolide suffisamment. Ensuite, le séchage est accéléré par le passage au four à 50-55°C. La chaleur va aussi favoriser l'élimination d'éventuelles bulles d'air emprisonnées sous la lamelle.

III.3. Base d'identification des poux

La spécificité d'hôte nous a facilité l'identification au premier plan, puis nous avons confirmé l'espèce selon les clés morphologiques de Dantas-Torres et Otranto (2014) en se basant sur les caractères suivants :

- La taille générale et la couleur de l'insecte.
- La forme de la tête ; la taille de la tête par rapport à l'abdomen.
- La visibilité ou non des antennes ainsi que le nombre des articles.
- La présence ou l'absence des striations (bandes brunes) sur l'abdomen.
- La présence de griffes sur les tarse.

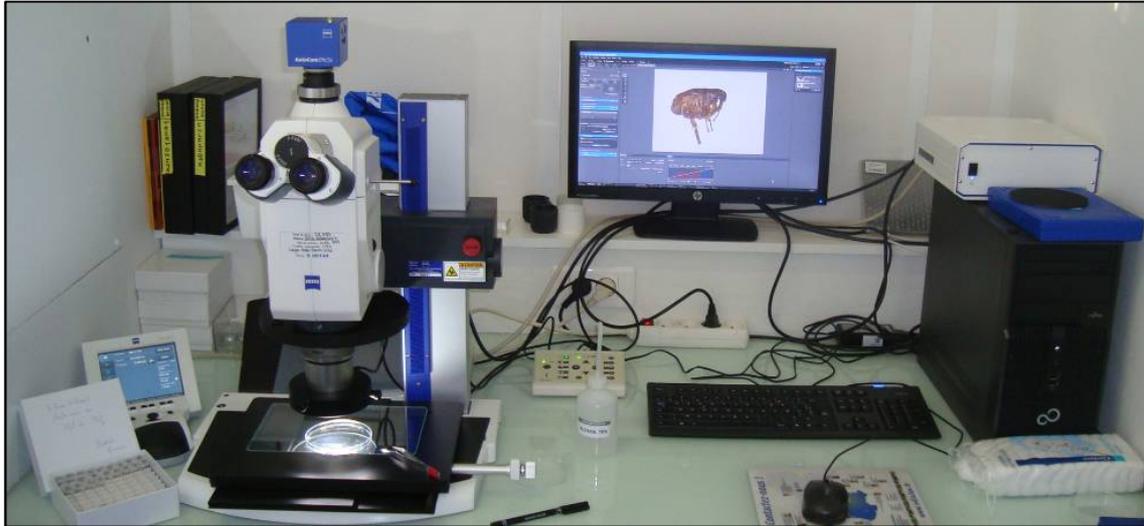


Figure 9: Equipement de l'identification morphologique des arthropodes.

IV. ANALYSES MOLECULAIRES

IV.1. Extraction d'ADN

Avant l'extraction d'ADN, les tiques et les puces ont été sélectionnées en fonction d'une bonne représentation des espèces d'arthropodes et d'hôtes animaux parasités car le nombre total était important. Concernant les rates, tous les échantillons recueillis ont été analysés.

Les ectoparasites et les rates conservés dans l'éthanol ont été rincés deux fois pendant 5 minutes dans l'eau distillée puis séchés sur un papier filtre stérile. Toute la manipulation a été menée dans une hotte de biosécurité à flux laminaire. Les spécimens ont été incisés à l'aide d'un scalpel et écrasés individuellement dans des tubes stériles. Les échantillons ont été par la suite immergés dans 180 μ L de tampon G2 (30 mM de Tris-Cl; 30 mM d'EDTA, 5% de Tween 20; 0,5% de Triton X-100; 800 mM GuHCl) et 20 μ l de protéinase K (activité = 600 mAU / ml de solution ou 40 mAU / mg de protéine), puis ils ont été incubés pendant toute la nuit à 56 °C. Après cette étape de pré-lyse, un total de 100 μ L de l'ADN a été extrait à partir de la moitié de chaque ectoparasite et d'un petit fragment de chaque rate à l'aide du kit QIAamp Tissue (Qiagen, Hilden, Allemagne). Ce kit contient des réactifs qui permettent la purification d'ADN à partir des tissus en utilisant un robot automatique EZ1 (QIAGEN-BioRobot® EZ1, Tokyo, Japon). Les étapes de l'extraction d'ADN ont été suivies selon les instructions du fabricant.



Figure 10: Extracteur automatique EZ1.

L'ADN génomique a été stocké à -20 °C dans des conditions stériles jusqu'à son utilisation dans les plaques de PCR. La partie restante de chaque spécimen a été maintenue à -80 °C en vue d'un contrôle supplémentaire et confirmation des résultats.

Le contrôle de la qualité d'extraction d'ADN a été réalisé à l'aide du spectrophotomètre / Nanodrope (Thermo Scientific, Pennsylvania, USA) lié à un microordinateur. Ce dernier permet la quantification des acides nucléiques sous forme de spectre.

IV.2. PCR en temps réel (qPCR)

Après l'extraction, tous les échantillons d'ADN ont fait l'objet d'une amplification par qPCR.

IV.2.1. Préparation du mix

Cette opération doit être faite sous des conditions aseptiques dans une pièce isolée et sous une hotte à UV pour éviter la contamination du mix, avec le port de gants stériles. Les réactifs du mix doivent être maintenus sous froid dans une boîte contenant de la glace.

Nous avons préparé le mix avec l'addition de Master mix contenant la Taq polymérase, des primers et de la sonde (kit de qPCR Takyon, Qiagen, Hilden, Allemagne) (Leulmi et *al.*, 2016) dans des plaques PCR à 96 puits (Tableau 3).

Tableau 3: Produits du mix de qPCR.

Produits	Concentration	Volume pour un seul échantillon
Master mix	1 X	10 µl
Primer 1	20 µM	0,5 µl
Primer 2	20 µM	0,5 µl
Sonde	2,5 µM	0,5 µl
Eau distillée stérile (exempte de ADNase / ARNase)	----	3,5 µl
Total du mix	----	15 µl

Les systèmes de qPCR (amorces et sondes) spécifiques de genres ou espèces des bactéries ciblées dans notre recherche sont présentés dans le tableau 4.

IV.2.2. Ajout des ADNs au mix

Dans une autre salle, les ADN de nos prélèvements ont été ajoutés au mix en raison de 5 µL d'ADN à partir de chaque échantillon.

Les contrôles négatifs utilisés dans toutes les réactions de qPCR étaient soit de l'eau distillée stérile, soit de l'ADN extrait à partir de tiques non infectées provenant de l'élevage pratiquée dans le laboratoire de l'URMITE. Le mix seul peut être aussi considéré en tant que témoin négatif. L'addition des témoins positifs a été effectuée dans un box à part. Un total de 20 µL du mélange réactionnel est contenu dans chaque puits de la plaque PCR.

IV.2.3. Systèmes et contrôles positifs utilisés lors de la qPCR

a. Détection de *Rickettsia* spp

En utilisant la qPCR, les échantillons d'ADN ont été testés pour toutes les rickettsies du groupe boutonneux en ciblant une séquence partielle du gène Citrate synthase (*gltA*) (Socolovschi et al., 2010). Le témoin positif consistait en ADN extrait à partir d'une souche diluée de *R. montanensis*.

Les qPCR spécifiques de *R. massiliae*, *R. conorii* et *R. felis* ont été réalisées sur les échantillons positifs au genre *Rickettsia* comme décrit antérieurement (Bechah et al., 2011 ; Socolovschi et al., 2012c ; Leulmi et al., 2014). Nous avons également testé le groupe typhus en utilisant

des amorces et une sonde spécifiques de *R. typhi* (Tableau 4). Des témoins positifs pour chaque essai comportaient de l'ADN extrait des souches diluées de *R. massilae*, *R. conorii*, *R. felis* et *R. typhi* cultivées dans le laboratoire de recherche à Marseille.

b. Détection de *Bartonella*

La détection moléculaire des bactéries du genre *Bartonella* était basée sur l'amplification de la région intergénique d'ARNr 16S-23S (le gène ITS) comme indiqué précédemment (Socolovschi et al., 2012b). L'ADN extrait de *B. elizabethae* a servi de témoin positif pour la détection des bartonelles.

Les échantillons positifs ont été ensuite analysés par une seconde qPCR spécifique à *B. henselae* ciblant le gène Pap31 (Angelakis et al., 2009). Le contrôle positif consistait en l'ADN extrait d'une dilution de souche cultivée de *B. henselae*.

NB: Les spécimens positifs au genre *Bartonella* et négatifs à l'espèce de *B. henselae* ont été par la suite confirmés par une PCR standard suivie d'un séquençage d'ADN en vue d'identifier les autres espèces de *Bartonella*.

c. Détection de *Coxiella burnetii*

Tous les échantillons ont été également analysés pour la recherche de l'ADN de *C. burnetii* en utilisant le système IS30a (Mediannikov et al., 2010). Les échantillons positifs ont été ensuite confirmés par un autre système de qPCR ciblant le IS1111, comme mentionné précédemment (Mediannikov et al., 2010).

Dans chaque essai, l'ADN extrait de *C. burnetii* a été utilisé en tant que contrôle positif.

d. Détection de *Ehrlichia canis*

Les ADN des rates et d'ectoparasites ont été amplifiés en utilisant deux systèmes de qPCR ciblant les gènes Ecaj 0701 et Ecaj 0503 pour la détection de *E. canis* comme décrit par Socolovschi et al. (2012a).

Le témoin positif utilisé était l'ADN extrait de la souche *E. canis* cultivée dans le laboratoire.

e. Détection de *Borrelia* spp

Tous les spécimens ont été testés en utilisant une qPCR spécifique du genre *Borrelia* ciblant un fragment du gène 16S d'ARNr tel que décrit par Parola et al. (2011).

Nous avons utilisé l'ADN extrait de *Br. burgdorferi* comme témoin positif.

Tableau 4: Amorces et sondes utilisées pour l'identification des pathogènes lors de la qPCR.

Bactéries	Gènes ciblés	Primers et sondes	Séquences
<i>Ehrlichia canis</i>	Ecaj_0503 Hypothetical protein (Socolovschi et al., 2012a)	Ehrcan_0503_F Ehrcan_0503_R Ehrcan_0503_P	5'-CAGCAAATTCCAATCTGCACTTC-3' 5'-GAGCTTCCAATTGATGGGTCTG-3' 6-FAM-TGTTATCTAATGCAAAAATCCCCGGCA-TAMRA
	Ecaj_0701 Glutaredoxin-related protein (Socolovschi et al., 2012a)	Ehrcan_0701_F Ehrcan_0701_R Ehrcan_0701_P	5'-TGAGGCCATTAAAGAATTCACAA-3' 5'-TGAAGCTCTCCACTGTGGTACATTT-3' 6-FAM-AGGTGAGTTTATTGGGTGCGACA-TAMRA
<i>Coxiella burnetii</i>	IS30A spacers (Socolovschi et al., 2012b)	Coxbur_IS30A_F Coxbur_IS30A_R Coxbur_IS30A_P	5'-CGCTGACCTACAGAAATATGTCC-3' 5'-GGGGTAAGTAAATAATACCTTCTGG-3' 6-FAM-CATGAAGCGATTTATCAATACGTGTATGC-TAMRA
	IS1111 gene (Socolovschi et al., 2012b)	Coxbur_IS1111_F Coxbur_IS1111_R Coxbur_IS1111_P	5'-CAAGAAACGTATCGCTGTGGC-3' 5'-CACAGAGCCACCGTATGAATC-3' 6-FAM-CCGAGTTCGAAACAATGAGGGCTG-TAMRA
<i>Bartonella</i> spp	ITS 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer (Socolovschi et al., 2012c)	Barto_ITS2_F Barto_ITS2_R Barto_ITS2_P	5'-GGGGCCGTAGCTCAGCTG-3' 5'-TGAATATATCTTCTCTTCACAATTTTC-3' 6-FAM-CGATCCCGTCCGGCTCCACCA-TAMRA
<i>Bartonella henselae</i>	Pap31 Heme-binding protein	Bhens_PAP31_F Bhens_PAP31_R	5'-CTCATGAAGTAGCGCCAACA-3'

	(Angelakis et al., 2009)	Bhens_PAP31_P	5'-AATTCCCAACTTGACCACCA-3' 6-FAM-TGCGCCTGCTTTTTCTTGCACA-TAMRA
<i>Rickettsia</i> spp	<i>gltA</i> Citrate synthase gene (Socolovschi et al., 2012b)	RKND03_F RKND03_R RKND03_P	5'-GTGAATGAAAGATTACACTATTTAT-3' 5'-GTATCTTAGCAATCATTCTAATAGC-3' 6-FAM-CTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTC-TAMRA
<i>Rickettsia typhi</i>	Rpr_274 Hypothetical protein (Walter et al., 2012)	Rpr_274_F Rpr_274_R Rpr_274_P	5'-TGTCAGATTATAAAGACGATGCTCAGA-3' 5'-GCAGCTTGTACTCCTTTAATTTGTTC-3' 6-FAM-CCGCTACCGCAAATCCATCAGA-TAMRA
<i>Rickettsia massiliae</i>	Hypothetical protein (Socolovschi et al., 2012c)	R_Mass_F R_Mass_R R_Mass_P	5'-CCAACCTTTTGTGTTGTTGCAC-3' 5'-TTGGATCAGTGTGACGGACT-3' 6-FAM-CACGTGCTGCTTATACCAGCAAACA-TAMRA
<i>Rickettsia conorii</i>	Putative acetyltransferase (Bechah et al., 2011)	R_Con_F R_Con_R R_Con_P	5'-TTGGTAGGCAAGTAGCTAAGCAAA-3' 5'-GGAAGTATATGGGAATGCTTTGAA-3' 6-FAM-GCGGTTATTCCTGAAAATAAGCCGGCA-TAMRA
<i>Rickettsia felis</i>	Membrane phosphatase gene (Leulmi et al., 2014)	Rfel_phosp_MBF Rfel_phosp_MBR Rfel_phosp_MBP	5'-GCAACCATCGGTGAAATTGA-3' 5'-GCCACTGTGCTTCACAAACA-3' 6-FAM-CCGCTTCGTTATCCGTGGGACC-TAMRA
<i>Borrelia</i> spp	16S rRNA gene (Parola et al., 2011)	Bor_16S_3_F Bor_16S_3_R Bor_16S_3_P	5'-AGCCTTTAAAGCTTCGCTTGTAG-3' 5'-GCCTCCCGTAGGAGTCTGG-3' 6FAM-CCGGCCTGAGAGGGTGAACGG-TAMRA

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

IV.2.4. Programmation et lancement de la qPCR

La plaque PCR est d'abord recouverte avec un film adhésif puis mise dans un appareil de PCR quantitative en temps réel (qPCR CFX96™, Bio-Rad, California, USA). Ce dernier est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement.

Le programme de qPCR (protocole Takyon) était le suivant: les mélanges réactionnels ont été maintenus à 50 °C pendant 2 min, puis 95 °C pendant 3 min et ensuite mis à travers 39 cycles de 95 °C pendant 10 secondes et 60 °C pendant 1min. Les résultats sont considérés comme positifs lorsque le seuil de cycle (Ct) était inférieur à 36. Tous les résultats positifs sont confirmés soit par un deuxième système qPCR ou par la réaction de séquençage.

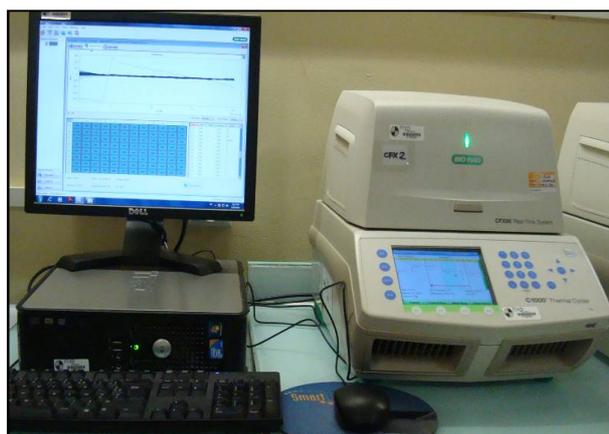


Figure 11: Équipement de qPCR utilisé à l'URMITE.

IV.3. PCR standard

IV.3.1. Préparation du mix

Le mix de PCR est constitué de: Tampon (Buffer), désoxynucléotides (dNTPs), MgCl₂, Taq Polymérase (HotStar Taq) (Qiagen, Hilden, Allemagne), eau distillée stérile et des amorces (un reverse et un forward) (Eurogentec, Seraing, Belgium). La quantité de chaque composant est indiquée dans le tableau 5.

Les amorces utilisées lors de la PCR classique sont spécifiques du gène *gltA* (Citratesynthase gene) des bactéries du genre *Bartonella*. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 334 pb comme a été décrit précédemment par Leulmi et *al.* (2014).

NB : Le mélange des dNTPS (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) doit être fait avant la préparation du mix (Annexe 3). La concentration de chaque dNTP est de 100 mM.

Tableau 5: Produits du mix de PCR standard.

Produits	Concentration	Volume pour un seul échantillon
Buffer (Tampon)	10x	2,5 µl
Solution de dNTPs		2,5 µl
MgCl ₂	2,5 mM	1 µl
Primer 1	10 µM	0,5 µl
Primer 2	10 µM	0,5 µl
Taq Polymérase	5 Unité/ µl	0,125 µl
Eau distillée stérile	----	13 µl
Total du mix	----	20 µl

Le mix peut être préparé facilement et rapidement à partir du Master mix (Qiagen, Hilden, Allemagne) qui contient les composants suivant : MgCl₂, dNTPs, Buffer, Taq Polymérase et l'eau distillée.

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

Tableau 6: Volumes des produits du mix en utilisant le master mix.

Produits	Concentration	Volume pour un seul échantillon
Master mix		12,5 µl
Primer 1	10 µM	0,5 µl
Primer 2	10 µM	0,5 µl
Eau distillée stérile (exempte de ADNase / ARNase)	----	6,5 µl
Total du mix	----	20 µl

Chaque constituant de ce mix est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés. Le témoin positif et le témoin négatif doivent être pris en compte dans les calculs. Tous les constituants sont mélangés dans un seul tube eppendorf pour garantir une distribution homogène de tous les réactifs de la PCR. Par la suite, 20µl de ce mélange est distribué dans chaque microtube de barrettes PCR (barrettes à 8) stériles préalablement numérotées.

IV.3.2. Ajout des ADNs aux mix

Ajouter les échantillons d'ADN issus de l'extraction ainsi que les Témoins dans les barrettes PCR contenant le mix en raison de 5µl. Donc le volume total dans chaque microtube sera de 25µl.

Le contrôle positif utilisé pour la recherche de *Bartonella* est l'ADN de *B. alsatica* extrait d'une souche et préalablement dilué à 10^{-6} . Les mélanges réactionnels sont introduits dans le thermocycleur (PCR system 2700, AB Applied biosystems, California, USA). Ce dernier doit être programmé selon l'espèce bactérienne.



Figure 12: Équipement de la PCR standard.

IV.3.3. Programmation et lancement de la PCR standard

Les échantillons subissent une amplification en chaîne par polymérase dans un appareil programmable appelé thermocycleur (Tableau 7).

Tableau 7 : Programme du Thermocycleur.

	Température	Temps (mn : minute)	Étapes
Premier cycle	95 °C	15 mn	Dénaturation initiale
39 cycles	95 °C	1 mn	Dénaturation
	T_m *	0.5 mn	Hybridation
	72 °C	1 mn	Élongation
Dernier cycle	72 °C	5 mn	Élongation finale
Conservation des échantillons	4 °C	+ ∞	Fin

*La température d'hybridation des amorces dépend de celle-ci, La T_m est de **51°C** pour les amorces du gène *gltA*.

IV.3.4. Électrophorèse

Cette étape est effectuée dans une salle destinée à l'électrophorèse.

a. Préparation du gel d'Agarose 1,5%

- Peser 1,5 g d'agarose, la mettre dans un Erlenmeyer de 500 ml de contenance,
- Ajouter ensuite 100 ml de **TBE 1X**.
- Faire chauffer dans un four à Micro-onde à 460 W, pendant 2 à 5 minutes jusqu'à ce que le liquide devient limpide.
- Laisser le gel se refroidir à température ambiante.

Le TBE est un tampon de migration utilisé en électrophorèse, il est préparé préalablement au laboratoire (Annexe 4).

b. Coulage des gels dans la cuve à électrophorèse horizontale

- Nettoyer la cuve avec son peigne à l'eau courante.
- Après refroidissement du gel, ajouter 4µl de **BET** avec précaution.

Le BET (bromure d'éthidium) est un produit très cancérigène (mutagène) et doit être manipulé avec une extrême prudence sous une hotte et avec des gans de protection chimique.

- Le coulage du gel dans la cuvette se fait après avoir positionner le peigne de façon à former des puits complets.
- Après polymérisation du gel au bout de 15 à 20 minutes à température ambiante, retirer soigneusement le peigne.
- Immerger le gel et son support dans la cuve de migration contenant au préalable du **TBE** 0,5X.

c. Dépôt des échantillons dans les puits du gel

- 1) Prendre un morceau de parafilm sur lequel est mis pour chaque échantillon à part : 7µl de produit de PCR et 3µl de tampon de charge 10 x (Bleu de Bromophénol) qui assure le maintien du dépôt en immersion dans le puit.
- 2) Mélanger à l'aide d'une micropipette l'échantillon et le tampon de charge puis mettre le mélange dans un micro-puit du gel.
- 3) Déposer de préférence dans le premier et le dernier puits 4µl du marqueur de poids moléculaire (PM) d'une concentration de 0.25µg/µl sans ajout de bleu de charge.
- 4) Un marqueur de PM est une solution de molécules d'ADN, il sert comme référence pour estimer le poids moléculaire des fragments d'ADN amplifiés, dont la taille est inconnue.
- 5) Les deux avant derniers puits du gel sont réservés pour le témoin positif et le témoin négatif.
- 6) Déposer les échantillons dans les autres puits.

d. Migration et visualisation de l'ADN

- 1) Fermer la cuve. Brancher les cordons de la cuve à l'alimentation de manière à ce que les dépôts soient côté cathode (-).
La molécule d'ADN est chargée négativement, ce qui lui permet de migrer vers l'anode (+) une fois le champ électrique est appliqué.
- 2) Appliquer une tension de 135 volts pendant environ 20 à 25 minutes de migration.
- 3) Débrancher le générateur de la cuve et récupérer le gel dans son support à l'abri de la lumière.
- 4) La révélation du profil électrophorétique a été réalisée à l'aide de l'imageur moléculaire (ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA).



Figure 13: Imageur moléculaire pour la lecture du gel d'électrophorèse.

En fonction de la taille des fragments d'ADN recherchés, les bandes visibles et leurs tailles sont repérées respectivement par rapport au témoin positif et au marqueur de PM.

NB: Il est important de conserver les ADN amplifiés à 4°C en vue de faire le séquençage des échantillons positifs.

IV.4. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Seuls les échantillons positifs au genre *Bartonella* et négatifs à *B. henselae* par qPCR ont fait l'objet d'un séquençage dans le but d'identifier les espèces bactériennes en cause.

IV.4.1. Protocole

Avant de commencer le séquençage proprement dit il faut d'abord réaliser une PCR standard car ce sont les échantillons d'ADN amplifiés (positifs) par PCR qui sont destinés à être séquencés.

1ère étape : Purification des produits de PCR

- Ajouter 50 µl d'eau distillée ultra pure exempte de ADNase et ARNase (EDS) aux produits de PCR à purifier.
- Déposer la totalité du mélange de chaque échantillon dans un puits à part sur une plaque d'ultrafiltration des fragments de PCR (plaque de 96 puits, Macherey-Nagel NucleoFast).
- Mettre la plaque en aspiration sur une pompe à vide (Millipore MultiScreen HTS Vacuum Manifold) pendant 10 minutes, nanomètre à 25.

- Récupérer la plaque, la sécher sur du papier filtre puis ajouter encore une fois 50 µl d'EDS à tous les spécimens.
- Mettre la plaque sur un agitateur de microplaques (Heidolph Titramax 100) pendant 10 minutes à une vitesse de 600 tr/mn.
- Récupérer la plaque et transférer pour chaque échantillon toute la quantité du produit de PCR purifié (50 µl) dans un tube préalablement identifié.

NB : Dans le cas de purification de nombreux produits de PCR, utiliser de préférence les barrettes de 8 microtubes.

2eme étape : Préparation du mix de séquence

Un mélange réactionnel prêt (BigDye Terminator version 1.1 Sequencing Kit, Californie, USA) est utilisé pour une amplification séparée des brins d'ADN. Pour cela deux mix ont été fait, un contient l'amorce sens (Forward) et l'autre contient l'amorce anti sens (Reverse).

Sous une hotte PCR, le milieu réactionnel a été préparé comme suit (Tableau 8) :

Tableau 8: Produits du mix de séquence.

Produits	Concentration	Volume pour un seul échantillon
BigDye		1 µl
Tampon de séquençage	5 X	1,5 µl
Amorce F ou R	10 µM	0,5 µl
Eau distillée stérile (exempte de ADNase / ARNase)	----	3 µl
Total du mix	----	6 µl

Chaque constituant de ce mix est multiplié par le nombre de produits de PCR purifiés. Tous les composants sont mélangés dans deux tubes un contient l'amorce F et l'autre l'amorce R. Par la suite, 6 µl de chaque tube est distribué séparément dans les microtubes de barrettes PCR stériles préalablement codifiées (deux couleurs différentes pour les deux types de mix).

Dans une autre salle, ajouter les produits de PCR purifiés en raison de 4 µl et ceci dans les deux types de barrettes PCR. Il est important de bien fermer les barrettes avant de les introduire dans le thermocycleur.

3eme étape : Programmation et lancement de la réaction de séquence

La seconde amplification des produits de PCR purifiés doit se faire selon ce programme:

Tableau 9: Programme du Thermocycleur.

	Température	Temps	Étapes
Premier cycle	96 °C	1 mn	Dénaturation initiale
25 cycles	96 °C	10 sec	Dénaturation
	50 °C	5 sec	Hybridation
	60 °C	3 mn	Élongation
Conservation des échantillons	4 °C	+ ∞	Fin

La température d'hybridation est constante quelle que soit l'amorce utilisée.

4ème étape : Préparation de la plaque de Sephadex

Cette étape a pour but de purifier par filtration sur gel sur colonne de Sephadex les produits de réaction de séquence afin d'améliorer la qualité du séquençage.

La résine Sephadex utilisée permet d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. La limite d'exclusion de la résine est d'environ 20 bases. La plaque MultiScreen HV est utilisée comme support inerte de la résine.

- Déposer la résine Sephadex (poudre blanche) dans chaque puits (45µl) du chargeur de colonne (plaque noire en aluminium à 96 puits, multiscreen column loader MACL).
- Retirer l'excès de résine avec la raclette.
- Placer la plaque de Sephadex MultiScreen HV (MAHVN, plaque de filtration à 96 puits) à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble.
- Taper sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque.
- Ajouter 300 µl d'eau ultra pure (EDS) dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à température ambiante.

Une fois que les mini-colonnes sont gonflées dans la plaque de Sephadex, cette dernière peut être directement utilisée ou bien stockée pour une longue durée à 4 °C entourée de parafilm.

NB : Cette opération doit être faite minimum trois heures à l'avance.

5^{ème} étape : Purification de la réaction de séquence

- Placer la plaque de Sephadex MultiScreen HV avec son couvercle sur une plaque « poubelle ».
- Centrifuger l'ensemble pendant 5 minutes à 13000 tr/mn (Centrifugeuse, Thermo Fisher Scientific, USA), veiller à l'équilibrage.
- Ajouter 10 µl d'eau extra pure (EDS) aux produits de séquence.
- Poser la plaque de Sephadex MultiScreen HV sur une plaque de polypropylène au format standard de 96 puits (MicroAmp Optical 96-Well reaction plate) qui doit être préalablement identifiée.

NB : Veiller à bien faire coïncider les A1 des deux plaques.

- Déposer délicatement les 20 µl de produits de séquence bien au centre des mini colonnes de la plaque MultiScreen HV, sans toucher les parois. Ne laisser aucune cupule vide sur un run de 16 échantillons, mettre de l'eau (EDS) dans la ou les cupules vides en raison de 20 µl.

NB : Une plaque à 96 puits contient 6 runs, et un run comporte 8 produits de séquence pour le forward et 8 autres pour le Reverse sur deux colonnes.

- Centrifuger l'ensemble des deux plaques avec couvercle pendant 5 minutes à 13000 tr/mn sans oublier de vérifier l'équilibrage.
- Récupérer la plaque MicroAmp contenant les produits de séquence filtrés qui sera destinée au séquençage, la fermer hermétiquement avec un couvercle spéciale (MicroAmp 96-Well Full Plate Cover) pour prévenir l'évaporation et la fixer sur un support (The standard plate adapter for the ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer).

6^{ème} étape : Lancement de l'opération du séquençage d'ADN

L'ensemble (plaque-adaptateur) est placé convenablement sur le séquenceur capillaire (Genetic Analyzer, ABI PRISM 3130 XL, Applied Biosystems, USA).

Le chargement de la plaque, la création d'un plan de plaque, la programmation et l'identification des runs sont réalisés selon le guide d'utilisation du séquenceur.

IV.4.2. Traitement et analyse des données

Un séquenceur de gènes sert à déterminer l'ordre des bases nucléiques d'un échantillon d'ADN et à le présenter, après traitement, sous forme d'une suite de lettres, appelée read ou lecture, représentant des nucléotides.

Toutes les séquences (reads) obtenues ont été récupérées puis assemblées et éditées en utilisant le logiciel Chromas Pro (version 1.7.7) (Technelysium Pty. Ltd., Australie). Par la suite, les séquences corrigées ont été analysées par le BLAST de NCBI (Basic Local Alignment Search Tool) (Source internet 3) et comparées avec les séquences disponibles sur la base de données de GenBank.



Figure 14 : Equipement du séquençage.

V. ANALYSES STATISTIQUES

Le calcul des proportions et prévalences ainsi que le traitement des résultats sous forme de tableaux et histogrammes ont été effectués à l'aide du logiciel EXCEL 2007.

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant des macros (www.anastats.fr), par l'application des tests suivant :

- Tests de χ^2 d'homogénéité, de conformité et d'indépendance.
- $K\chi^2$ de Yates avec correction de continuité.
- Test de Fisher exact et le test G.

L'intervalle de confiance (IC) à 95% a été également évalué (<http://www.mediametrie.fr>).

Les valeurs de « p » ont été calculées séparément pour chaque variable, la différence est considérée significative au risque d'erreur de 5 %.

CHAPITRE 3

RESULTATS

Cette enquête a pour objectif principal de déterminer le statut infectieux des populations canine et féline vis-à-vis des zoonoses bactériennes vectorielles dans la région d'Alger. Pour cela nous avons identifié grâce à la PCR en temps réelle les pathogènes chez les réservoirs animaux et leurs arthropodes.

I. DESCRIPTION DE LA POPULATION ANIMALE ETUDIEE

Au cours de l'étude, 117 chiens et 107 chats, provenant de la fourrière canine d'Alger, ont été échantillonnés.

I.1. Répartition des animaux en fonction du sexe

Sur les 117 chiens, 59 (50,42%) étaient des mâles et 58 (49,57%) étaient des femelles. Parmi les 107 chats, 58 (54,20%) étaient des mâles et 49 (45,79%) étaient des femelles.

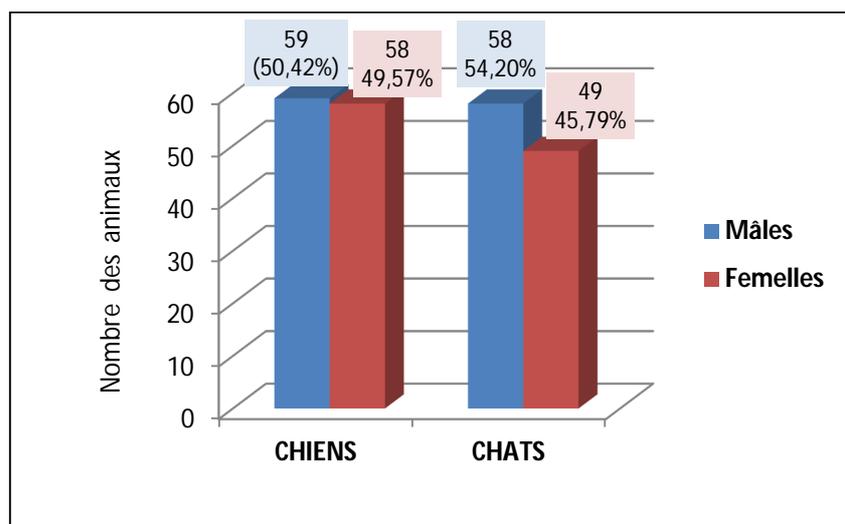


Figure 15: Répartition de la population étudiée en fonction du sexe.

La distribution des animaux que ce soit chiens ou chats par rapport à la variable « sexe » est homogène en appliquant le test de Khi-2 d'homogénéité ($p > 0,05$).

I.2. Répartition des animaux en fonction de l'âge

L'âge des chiens variait entre 2 mois et 11 ans, 56 (47,86%) sujets étaient des jeunes (≤ 1 an) et 61 (52,13%) étaient des adultes (> 1 an). La majorité de la population féline a été estimée âgée de moins de 3 ans en fonction de leur aspect physique et leur dentition. 23 (21,49%) chats avaient un âge inférieur à un an et 84 (78,50%) avaient un âge supérieur à un an.

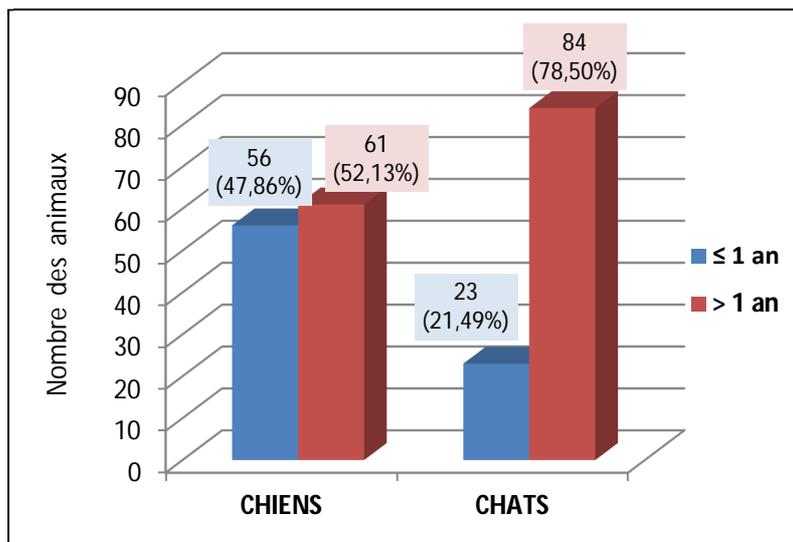


Figure 16: Répartition de la population étudiée en fonction de l'âge.

La distribution des chiens par rapport à la variable « âge » est homogène en appliquant le test de Khi-2 d'homogénéité ($p > 0,05$), par contre elle n'est pas homogène concernant la population féline ($p < 0,05$). Les chats âgés de moins d'une année étaient peu nombreux. Les petits chats peuvent mourir à cause des conditions défavorables du milieu extérieur ou bien adoptés par des propriétaires d'animaux.

I.3. Répartition des animaux en fonction de la race

La population canine était constituée principalement de chiens bâtards avec un nombre de 104 (88,88%) contre 13 (11,11%) pour les autres races (Annexe 5). Les chats ont été décrits pour la plupart appartenant à des races mixtes avec un nombre de 101 (94,39%), les autres races félines étaient seulement 6 avec un pourcentage de 5,60% (Annexe 5).

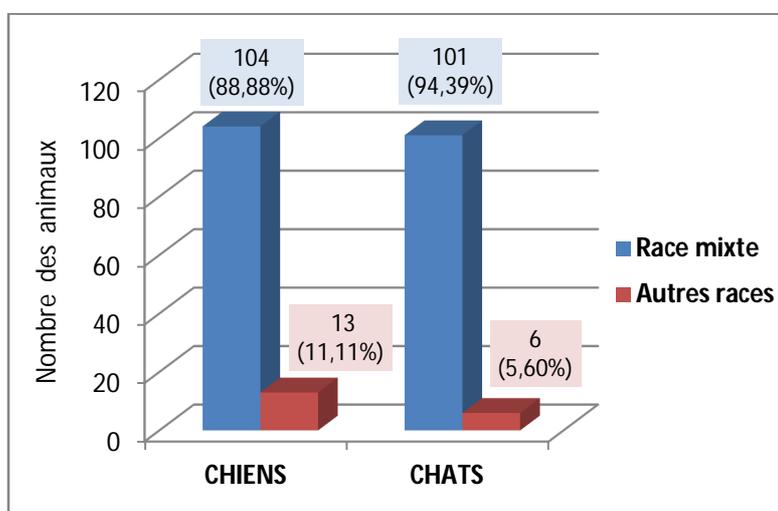


Figure 17: Répartition de la population étudiée en fonction de la race.

La distribution des animaux par rapport au critère « race » n'est pas homogène en appliquant le test de Khi-2 d'homogénéité ($p < 0,05$). Ces animaux sont errants et n'appartiennent pas à des races pures puisque ils proviennent de plusieurs croisements entre eux (hybrides), donc leur origine reste inconnue.

I.4. Répartition des animaux en fonction du statut clinique

Parmi ces animaux, 31 (26,49%) chiens et 8 (7,47%) chats étaient apparemment malades au moment du prélèvement présentant un des symptômes suivants : amaigrissement et abattement, dépilation, démangeaisons ou autres manifestations dermatologiques, pâleur des muqueuses, signes digestifs et respiratoire...ect. 86 chiens (73,50%) et 99 chats (92,52%) étaient en bon état général à l'examen clinique.

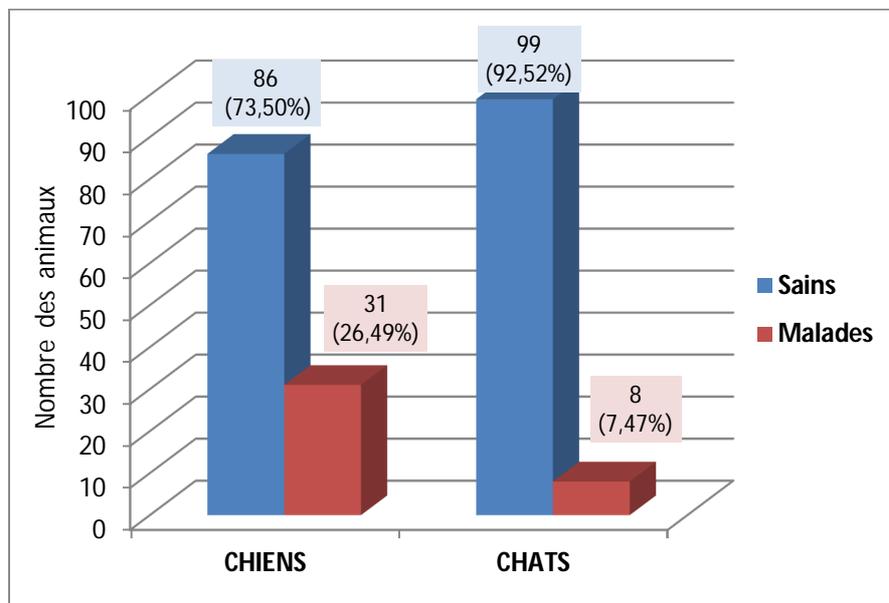


Figure 18: Répartition de la population étudiée en fonction du statut clinique.

La distribution des animaux par rapport au statut clinique n'est pas homogène ($p < 0,05$). La plupart de ces derniers étaient apparemment sains. Cela peut être lié à leur résistance dans le milieu extérieur.

I.5. Répartition des animaux en fonction de l'infestation par les ectoparasites

Un total de 72 (61,53% ; IC : 52,7 - 70,4%) chiens et 65 (60,74% ; IC : 51,5 - 70%) chats était infesté par au moins une espèce d'ectoparasites. Des infestations mixtes avec deux ou trois types de parasites externes ont été notées sur 61 chiens (52,13%) et 18 chats (16,82%) (Annexe 5).

45 (38,46% ; IC : 29,6 - 47,3%) chiens et 42 (39,25% ; IC: 30 - 48,5%) chats n'abritaient pas d'ectoparasites au moment du prélèvement.

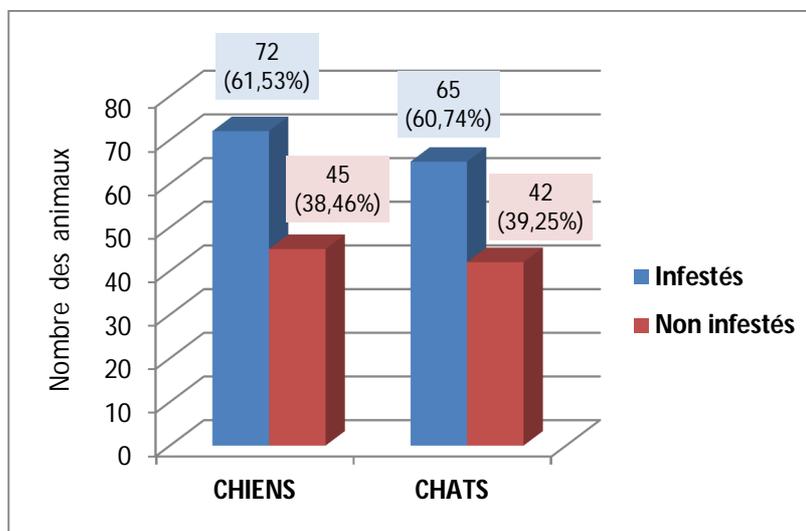


Figure 19: Répartition de la population étudiée en fonction de la présence ou l'absence d'ectoparasites.

La distribution des chiens et des chats par rapport au facteur « présence ou absence d'infestation parasitaire » n'est pas homogène en appliquant le test de Khi-2 d'homogénéité ($p < 0,05$). Ces animaux qui vivaient dans des zones urbaines et rurales, passaient la plupart de leur temps exclusivement à l'extérieur et ne recevaient aucun traitement ou prophylaxie médicale. Pour ce la, il ya un nombre important d'individus porteurs d'ectoparasites dans notre étude.

II. RESULTATS DE L'IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE DES ECTOPARASITES

Un total de 532 tiques a été récolté à partir de nos animaux. Tous ces acariens appartenaient au genre *Rhipicephalus* et à l'espèce *Rhipicephalus sanguineus*.

Concernant les insectes, 640 puces ont été recueillies. Deux genres et trois espèces ont été identifiés incluant 369 (57,7%) *Ctenocephalides felis* qui était la plus abondante, suivie de 149 (23,3%) *Xenopsylla cheopis* et 122 (19%) *Ctenocephalides canis*. Un autre insecte a été retrouvé à savoir les poux au nombre de 48, comprenant deux espèces *Felicola subrostratus* et *Trichodectes canis* (Tableau 10).

Chez l'espèce canine, 62,35% des arthropodes étaient des tiques, 36,57% étaient des puces et 1,08% étaient des poux. Chez l'espèce féline, les puces étaient prédominantes avec un taux de 86,79% suivies de poux et de tiques avec des pourcentages de 10,1% et de 3,11% respectivement (Fig. 20 et 21).

Le nombre des ectoparasites recueillis auprès de chaque chien variait de une à 21 tiques avec une valeur médiane de sept tiques et de une à 14 puces avec une valeur médiane de quatre puces. A propos des chats, le nombre des tiques variait de une à deux avec une valeur médiane de une tique par animal et de une à 17 puces avec une valeur médiane de cinq puces.

Tableau 10: Comparaison entre les effectifs des différents parasites externes récoltés chez les chiens et les chats de la wilaya d'Alger.

Type d'ectoparasites		Chez les chiens (Nbr,%, IC)	Chez les chats (Nbr,%, IC)	Total (100%)	P
Tiques <i>(Rhipicephalus sanguineus)</i>		520 (97,74%) [96,5 - 99%]	12 (2,25%) [1 - 3,5%]	532	Hautement significatif < 0,001
Puces	<i>Ctenocephalides felis</i>	42 (11,38%) [8,1 - 14,6%]	327 (88,61%) [85,4 - 91,9%]	369	< 0,05
	<i>Xenopsylla cheopis</i>	146 (97,98%) [95,7 - 100%]	3 (2,01%) [0 - 4,3%]	149	< 0,05
	<i>Ctenocephalides canis</i>	117 (95,90%) [92,4 - 99,4%]	5 (4,09%) [0,6 - 7,6%]	122	< 0,05
	Nombre total de puces	305 (47,65%) [43,8 - 51,5%]	335 (52,34%) [48,5 - 56,2%]	640	NS
Poux	<i>Trichodectes canis</i>	9 (100%)	-	9	-
	<i>Felicola subrostratus</i>	-	39 (100%)	39	-
	Nombre total de poux	9 (18,75%) [7,7 - 29,8%]	39 (81,25%) [70,2 - 92,3%]	48	< 0,05
Total des ectoparasites		834 (68,36%) [65,8 - 71%]	386 (31,64%) [29 - 34,2%]	1220	< 0,05

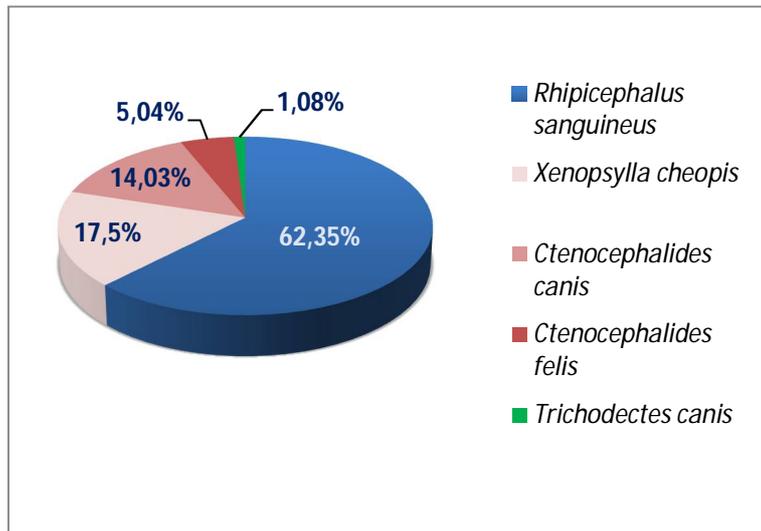


Figure 20: Répartition des différentes espèces d'arthropodes chez la population canine.

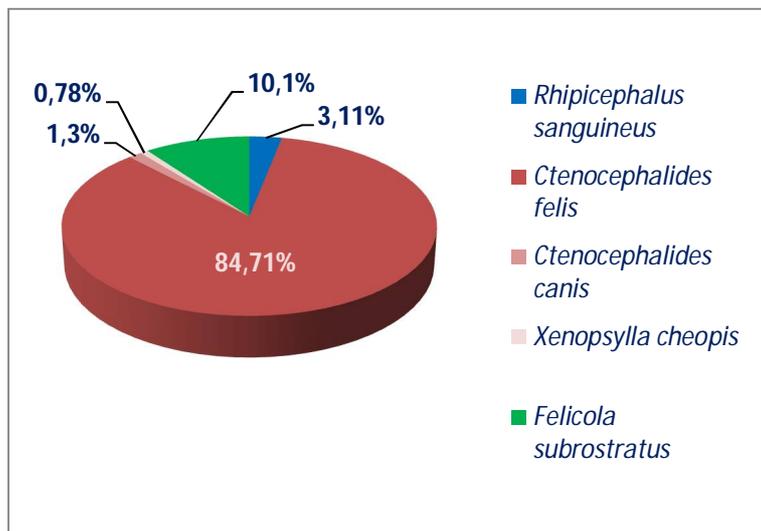


Figure 21: Répartition des différentes espèces d'arthropodes chez la population féline.



Figure 22: Tique mâle de *Rhipicephalus sanguineus* (face dorsale et ventrale) observée au Gr. 100x sous stéréomicroscope.



Figure 23: Puces femelles de *Ctenocephalides felis* (à gauche) et de *Ctenocephalides canis* (à droite) observées au Gr. 100x sous stéréomicroscope.



Figure 24: Puce mâle (à gauche) et puce femelle (à droite) de *Xenopsylla cheopis* observées au Gr. 100x sous stéréomicroscope.



Figure 25: Poux de chien *Trichodectes canis* (à gauche) et poux de chat *Felicola subrostratus* (à droite) observés au Gr. 100x sous stéréomicroscope.

III. RÉSULTATS DES ANALYSES DE LABORATOIRE

III.1. Echantillons analysés

Dans la présente étude, tous les prélèvements de rates collectés à partir de 117 chiens et de 107 chats ont été testés pour la recherche de pathogènes. A propos des ectoparasites, un échantillonnage ciblé a été réalisé. Sur les 72 chiens et les 65 chats infestés, nous avons prélevé pour chaque espèce de puces et de tiques des individus. Le nombre varie d'un animal à l'autre en fonction du taux d'infestation des animaux (Tableau 11). Concernant les poux, toutes les espèces identifiées étaient des mallophages qui ne jouent pas un rôle vectoriel des agents ciblés dans notre investigation. Donc ces insectes n'étaient pas destinés aux analyses moléculaires.

Tableau 11: Effectifs des arthropodes hématophages destinés aux analyses moléculaires chez les chiens et les chats.

Type d'ectoparasites analysés	Chez les chiens (Nbr/%)	Chez les chats (Nbr/%)	Total (Nbr/%)
Tiques <i>(Rhipicephalus sanguineus)</i>	103/520 (19,80%)	12/12 (100%)	115/532 (21,61%)
Puces	<i>Ctenocephalides felis</i>	87/327 (26,20%)	108/369 (29,27%)
	<i>Xenopsylla cheopis</i>	2/3 (66,66%)	64/149 (42,95%)
	<i>Ctenocephalides canis</i>	4/5 (80%)	53/122 (43,44%)
	Nombre total de puces	132/305 (43,27%)	93/335 (27,76%)
Total des ectoparasites analysés	235/825 (28,48%)	105/347 (30,26%)	340/1220 (27,87%)

III.2. Détection moléculaire des bactéries pathogènes

Tous les échantillons de rates ou d'ectoparasites sélectionnés pour les analyses ont fait l'objet d'une PCR en temps réel (qPCR). Les résultats positifs ont été par la suite confirmés et identifiés soit par des systèmes spécifiques de qPCR soit par le séquençage de l'ADN.

Les contrôles positifs ont produit les résultats prévus. Aucun signal n'a été obtenu à partir des témoins négatifs.

III.2.1. Les résultats obtenus chez les chiens

Au total 18 sur 117 (15,38% ; IC : 8,8 - 21,9%) chiens étaient positifs à au moins un agent pathogène zoonotique vectorisé. Trois bactéries ont été mises en évidence: *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae* et *Ehrlichia canis*.

- Détection de *C. burnetii* : L'ADN de *C. burnetii* a été détecté par la qPCR dans 1/117 (0,85%) échantillons de rates en utilisant des primers et sonde spécifiques de cette espèce ciblant le IS30a. Ce résultat a été validé avec un second système amplifiant le gène IS1111 de *C. burnetii* (Ct = 30) (Fig. 26).
- Détection de *B. henselae* : sur les 117 rates testées, un seul spécimen (0,85%) était positif au genre *Bartonella* par le système désigné pour l'amplification de la région intergénique d'ARNr 16S-23S. Ce résultat positif a été confirmé et identifié en tant que *B. henselae* par la qPCR en ciblant le gène Pap31 (Ct = 30) (Fig. 27). Le chien positif à *B. henselae* hébergeait des tiques et des puces (Annexe 6).
- Détection de *E. canis* : Cette bactérie était la plus fréquente chez les chiens, étant détectée dans 17/117 (14,52% ; IC : 8,1 - 20,9%) échantillons de rates par deux systèmes de qPCR amplifiant les gènes spécifiques de *E. canis* (Ecaj_0503 et Ecaj_0701) avec des Ct entre 22 et 32 (Fig. 28). 10/17 (58,82%) des chiens positifs étaient infestés de tiques et de puces et 3/17 (17,64%) étaient malades (Annexe 6).
- Les co-infections : sur les 18 chiens positifs, un seul animal (0,85%) était co-infecté par deux agents (*E. canis* et *C. burnetii*).

III.2.2. Les résultats obtenus chez les chats

Parmi les 107 chats testés, seulement deux (1,87% ; IC : 0 - 4,4%) se sont révélés atteints d'infections bactériennes. 1/107 (0,93%) chats était positif à *C. burnetii* (Ct = 25) et un autre (0,93%) à *B. henselae* (Ct = 28) en utilisant les systèmes spécifiques de qPCR.

NB: Pour la recherche moléculaire des rickettsies et des borrelies, tous les animaux de notre étude étaient négatifs à l'ADN de ces bactéries.

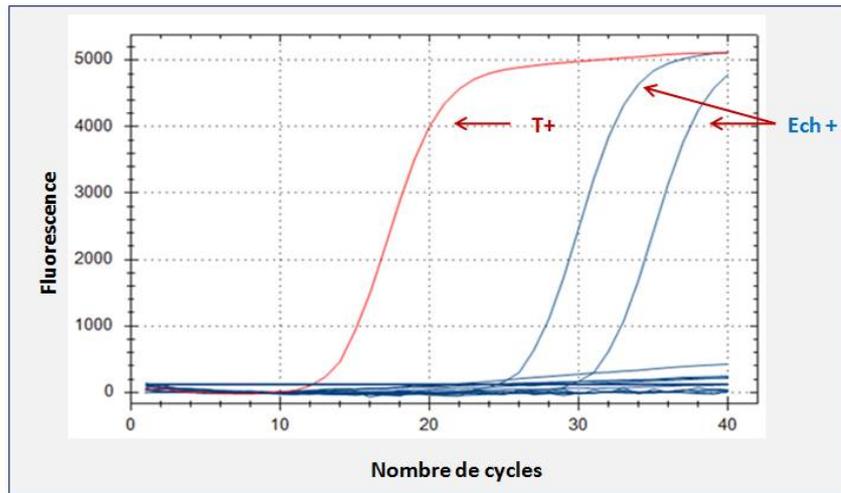


Figure 26: Les courbes d'amplification du gène IS1111 de *C. burnetii* chez les chiens et les chats par qPCR.

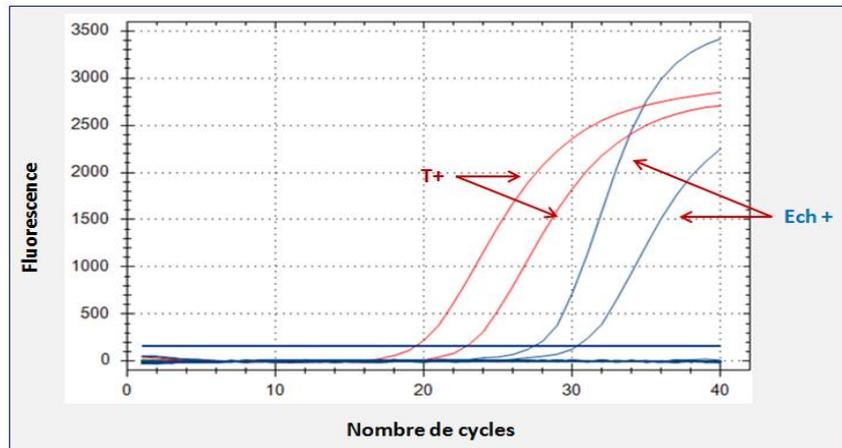


Figure 27: Les courbes d'amplification du gène Pap31 de *B. henselae* chez les chiens et les chats par qPCR.

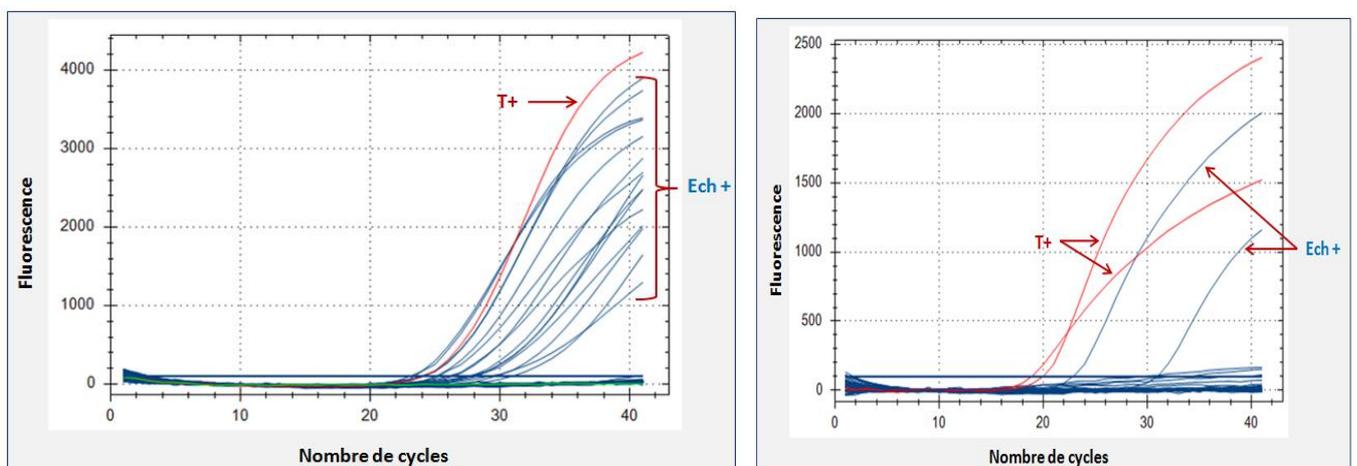


Figure 28: Les courbes d'amplification de *E. canis* (Ecaj_0701) chez les chiens par qPCR.

III.2.3. Les résultats obtenus chez les arthropodes

A. Les tiques

L'analyse par la PCR en temps réel a décelé 29 tiques positives aux *Rickettsia* spp. avec un taux de 25,21% (IC : 17,3 - 33,2%) en ciblant le système RKND03 de toutes les rickettsies du groupe boutonneux.

L'ADN de *R. massiliae* a été identifié, par une qPCR spécifique de cette bactérie, dans 28/115 (24,35% ; IC : 16,5 - 32,2%) tiques (Fig. 29). *R. massiliae* a été présente dans 27/103 (26,21% ; IC: 17,7 - 34,7%) tiques de chiens et dans 1/12 (8,33%) tiques de chats.

Sur les 115 tiques testées, une seule tique (0,87%) était positive à l'ADN de *R. conorii* par qPCR (Fig. 29). Cette dernière a été détectée dans 1/103 (0,97%) *Rhipicephalus sanguineus* collectées à partir de chiens.

Grace à la qPCR spécifique de *E. canis*, Cette bactérie a été décelée dans 8/115 (6,95% ; IC : 2,3 - 11,6%) tiques (Fig. 30). L'ADN de *E. canis* a été identifié dans 8/103 (7,77% ; IC : 2,6 - 12,9%) *Rhipicephalus sanguineus* recueillies auprès des chiens. Ces tiques positives ont été échantillonnées à partir de 4/10 (40%) chiens infestés de tiques et porteurs de *E. canis*.

4/115 (3,48%) tiques étaient co-infectées par deux agents à savoir *R. massiliae* et *E. canis*.

Toutes les tiques *Rhipicephalus sanguineus* étaient négatives à *Bartonella* spp., *C. burnetii* et *Borrelia* spp.

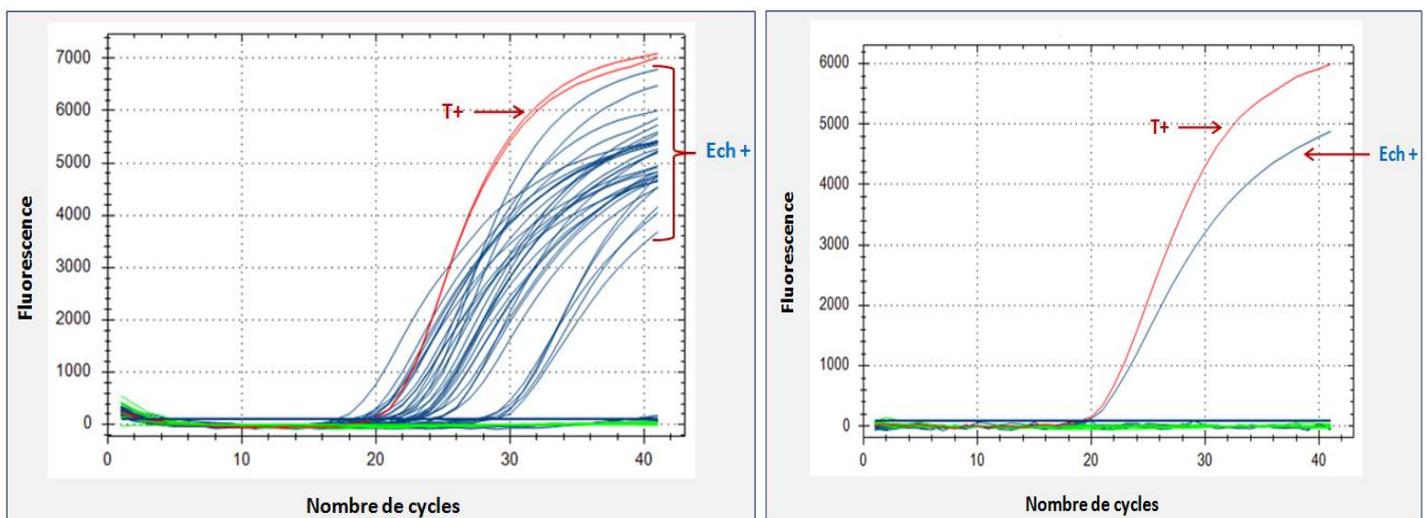


Figure 29: Les courbes d'amplification de *R. massiliae* (à gauche) et de *R. conorii* (à droite) dans les tiques par qPCR.

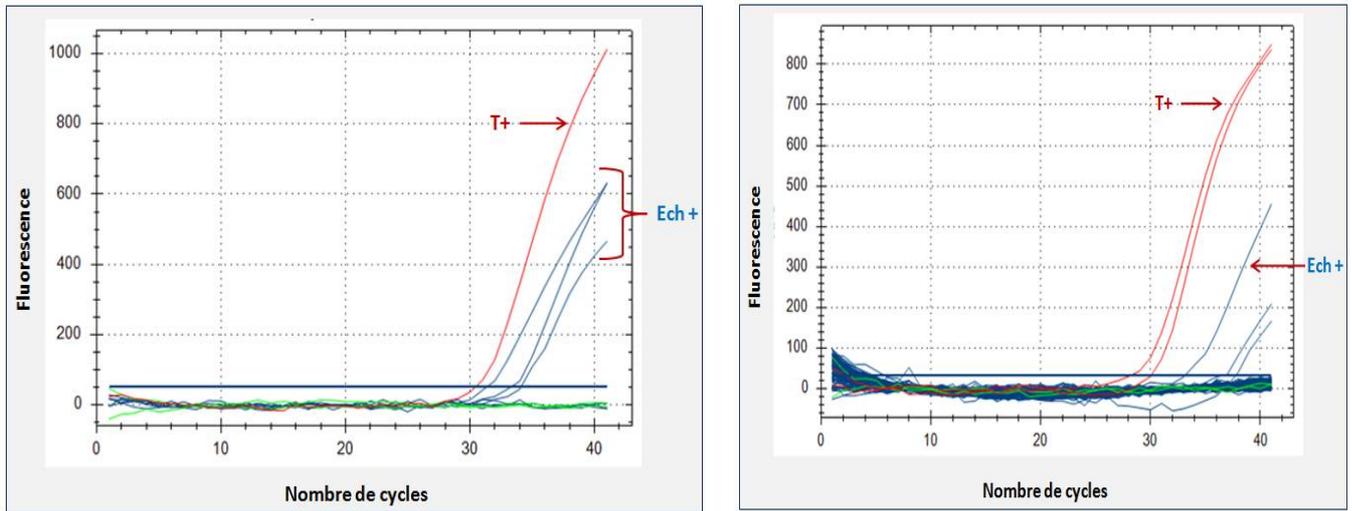


Figure 30: Les courbes d'amplification de *E. canis* dans les tiques par qPCR.

B. Les puces

La recherche de *Rickettsia* par deux qPCR ciblant le gène Citrate synthase et le gène de la phosphatase membranaire a révélé la présence de *R. felis* dans 2/225 puces (0,88% ; IC : 0 - 2,1%) (Fig. 31). L'ADN de *R. felis* a été détecté dans 2/87 (2,30% ; IC : 0 - 5,4%) *Ctenocephalides felis* collectées à partir de chats.

Sur l'ensemble de puces testées par la qPCR spécifique de *Bartonella* spp., 21 (9,33% ; IC : 5,5 - 13,1%) étaient positives. 11/225 (4,88% ; IC : 2,1 - 7,7%) puces se sont révélées positives à *B. henselae* par l'utilisation d'une qPCR ciblant un gène spécifique de cette bactérie (Pap31) (Fig. 32). L'ADN de *B. henselae* a été détecté dans 11/87 (12,64% ; IC : 5,7 - 19,6%) *Ctenocephalides felis* collectées à partir de chats.

Sur les dix autres puces positives au genre *Bartonella* et négatives à *B. henselae*, l'analyse de séquences d'ADN des produits de PCR standard ciblant le *gltA* a été réalisée. La recherche dans le GenBank de séquences similaires du gène *gltA* a indiqué que 6/225 (2,66% ; IC : 0,6 - 4,8%) puces portaient des ADNs identiques à *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (numéro d'accèsion DQ360833.1, avec 99% de similarité) et 4/225 (1,77% ; IC : 0 - 3,5%) insectes étaient porteurs de séquences en homologie complète avec *B. clarridgeiae* (numéro d'accèsion GenBank FN645454.1, avec 100% de similarité). L'ADN de *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* a été détecté dans 6/62 (9,67% ; IC : 2,3 - 17%) *Xenopsylla cheopis* recueillies auprès de chiens. *B. clarridgeiae* a été identifiée dans 4/87 (4,59% ; IC : 0,2 - 9%) *Ctenocephalides felis* collectées à partir de chats.

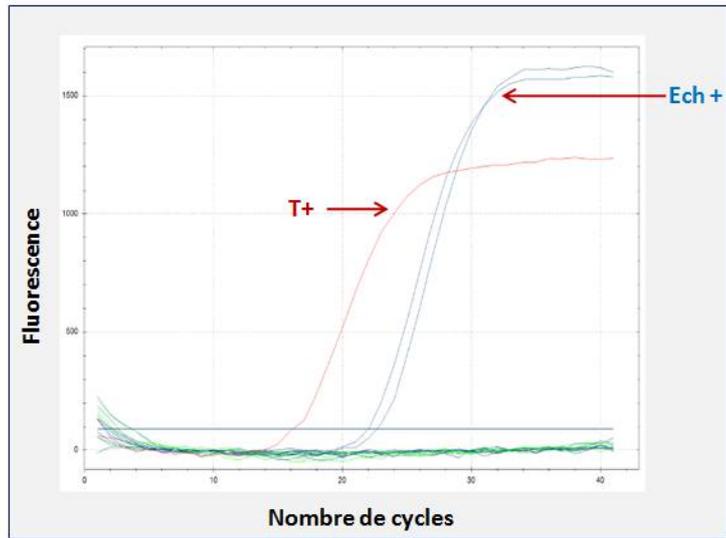


Figure 31: Les courbes d'amplification de *R. felis* dans les puces par qPCR.

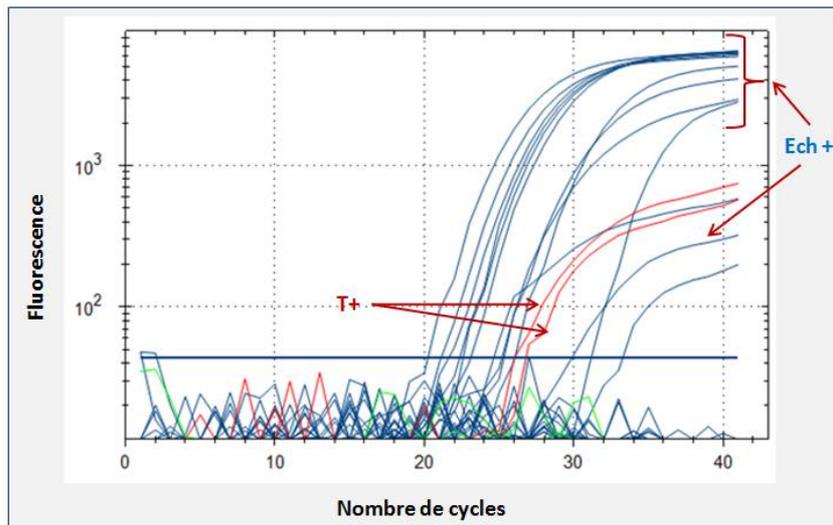


Figure 32: Les courbes d'amplification de *B. henselae* dans les puces par qPCR.

Tableau 12: Récapitulatif des résultats de détection moléculaire des pathogènes dans les arthropodes des chiens et des chats.

Espèces d'Ectoparasites	Hôte animal	Agents pathogènes recherchés [Nbr positifs / Nbr analysés, (Pourcentage), Ct]								
		<i>R. massiliae</i>	<i>R. conorii</i>	<i>R. felis</i>	<i>B. henselae</i>	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	<i>B. clarridgeiae</i>	<i>E. canis</i>	<i>C. burnetii</i>	<i>Br. spp.</i>
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Chiens	27/103 (26,21%)* Ct= 18-30	1/103 (0,97%) Ct= 20	-	-	-	-	8/103 (7,77%)* Ct = 31-34	-	-
	Chats	1/12 (8,33%) Ct= 26	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ctenocephalides felis</i>	Chiens	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Chats	-	-	2/87 (2,30%) Ct=22 et 23	11/87 (12,64%) Ct= 20-31	-	4/87 (4,59%)	-	-	-
<i>Xenopsylla cheopis</i>	Chiens	-	-	-	-	6/62 (9,67%)	-	-	-	-
	Chats	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ctenocephalides canis</i>	Chiens	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Chats	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*4/103 (3,88%) tiques de chiens étaient co-infectées par deux agents (*R. massiliae* et *E. canis*).

IV. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS OBTENUS

IV.1. Etude de l'effet de quelques paramètres sur le taux de positivité

IV.1.1. Chez l'espèce canine

IV.1.1.1. Répartition des maladies vectorielles en fonction du sexe

Le taux d'infection par les agents pathogènes d'origine vectorielle était supérieur chez les mâles (16,95 % ; IC : 7,4 - 26,5%) par rapport aux femelles (13,79 % ; IC : 4,9 - 22,7%). Statistiquement, cette différence est non significative.

Tableau 13: Récapitulatif des infections à transmission vectorielle chez les chiens selon le sexe.

Sexe	Nbr de cas positifs	Nbr de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
Femelles	8	50	13,79	p > 0,05
Mâles	10	49	16,95	

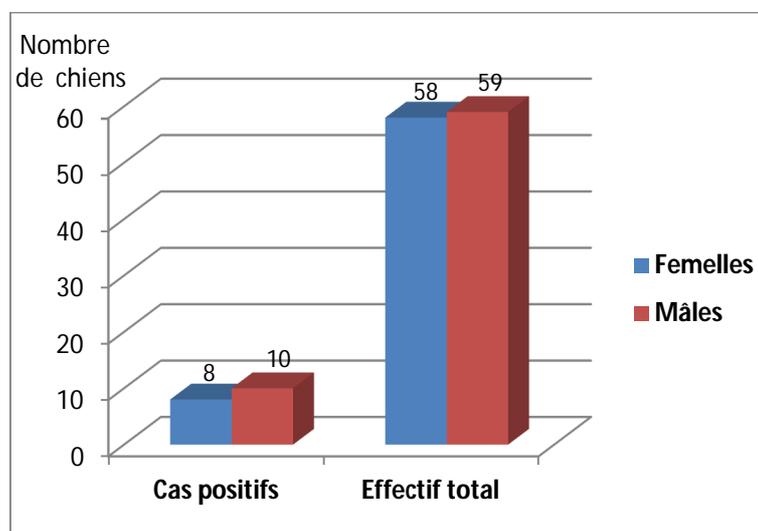


Figure 33: Répartition des maladies vectorielles en fonction du sexe.

IV.1.1.2. Répartition des maladies vectorielles en fonction de l'âge

La prévalence des maladies à transmission vectorielles chez les chiens adultes était de 16,39 % (IC : 7,1 - 25,7%) contre 14,28 % (IC : 5,1 - 23,5%) chez les chiots. La différence statistique en fonction de l'âge est non significative.

Tableau 14: Récapitulatif des infections à transmission vectorielle chez les chiens selon l'âge.

Age	Nbr de cas Positifs	Nbr de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
≤ 1 an	8	48	14,28	p > 0,05
> 1 an	10	51	16,39	

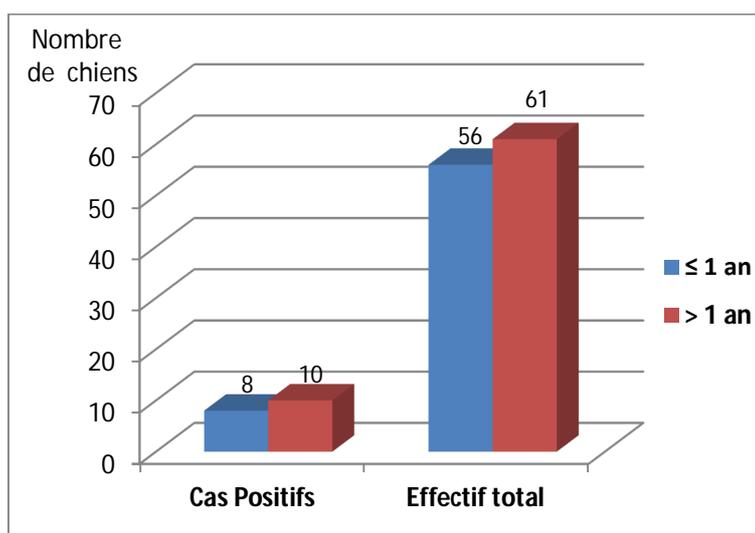


Figure 34: Répartition des maladies vectorielles en fonction de l'âge.

IV.1.1.3. Répartition des maladies vectorielles en fonction de la race

Le pourcentage de positivité aux maladies vectorielles chez les chiens de race mixte (13,46 % ; IC : 6,9 - 20%) était inférieur à celui des autres races (Annexe 5) (30,77 % ; IC : 5,7 - 55,9%). Le test statistique montre qu'il n'y a pas une association significative (p > 0,05).

Tableau 15: Récapitulatif des infections à transmission vectorielle chez les chiens selon la race.

Race	Nbr de cas Positifs	Nbr de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
Race mixte	14	90	13,46	p > 0,05
Autres races	4	9	30,77	

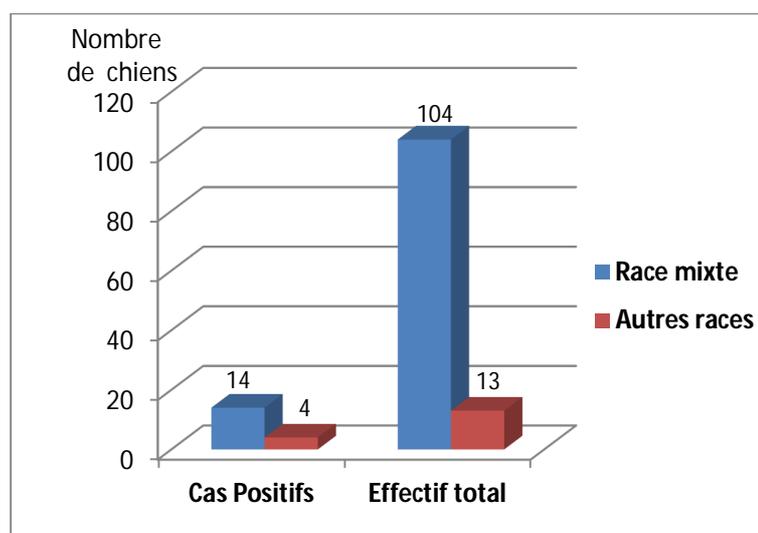


Figure 35: Répartition des maladies vectorielles en fonction de la race.

IV.1.1.4. Répartition des maladies vectorielles en fonction du statut clinique

Le pourcentage de positivité chez les chiens malades était de 9,67 % (IC : 0 - 20,1%), par contre il était de 17,44 % (IC : 9,4 - 25,5%) chez les animaux en bon état général. Cependant, l'analyse statistique a relevé que l'écart n'est pas significatif (p > 0,05).

Tableau 16: Récapitulatif des infections à transmission vectorielle chez les chiens selon le statut clinique.

Statut clinique	Nbr de cas Positifs	Nbr de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
Sains	15	71	17,44	p > 0,05
Malades	3	28	9,67	

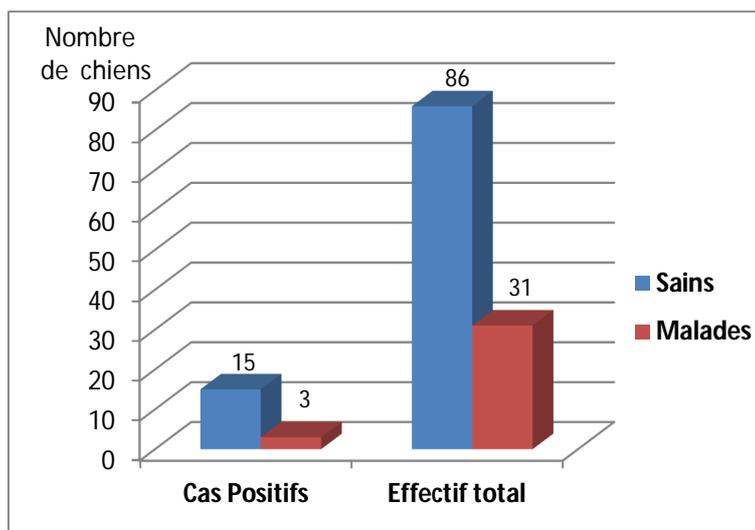


Figure 36: Répartition des maladies vectorielles en fonction du statut clinique.

IV.1.1.5. Répartition des maladies vectorielles en fonction de l'infestation par les arthropodes

La prévalence des maladies à transmission vectorielle chez les chiens infestés par les tiques et les puces (15,27 % ; IC : 7 - 23,6%) était semblable à celle des animaux non infestés (15,55 % ; IC : 5 - 26,1%). Donc, Il n'y a pas une relation statistiquement significative.

Tableau 17: Récapitulatif des infections à transmission vectorielle chez les chiens selon l'infestation par les arthropodes.

Présence d'arthropodes vecteurs sur l'animal	Nbr de cas Positifs	Nbr de cas Négatifs	Taux de positivité (%)	P
Oui	11	61	15,27	p > 0,05
Non	7	38	15,55	

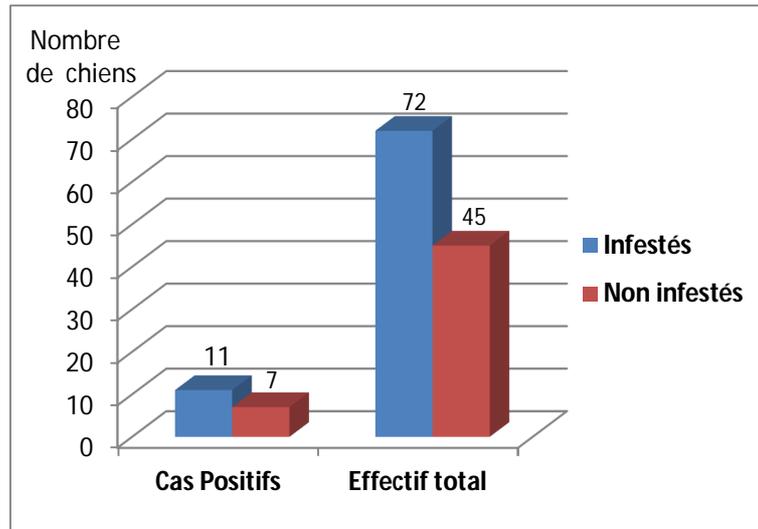


Figure 37: Répartition des maladies vectorielles en fonction de l'infestation parasitaire.

IV.1.2. Chez l'espèce féline

Sur un total de 107 chats, uniquement deux sujets se sont révélés atteints de zoonoses transmises par les tiques et les puces.

En appliquant le test de Khi-2, l'infection chez les chats est indépendante des facteurs étudiés.

Les informations relatives aux deux chats infectés étaient presque identiques. Ces derniers étaient des mâles, de race mixte, ne présentant aucun signe clinique et n'hébergeant pas d'ectoparasites (Annexe 6).

IV.2. Etude de la relation entre l'infection chez les animaux et leurs arthropodes

IV.2.1. Chez l'espèce canine

D'après nos résultats, il ya quatre cas de figures qui montrent le statut infectieux des chiens en comparaison à celui de leurs arthropodes. Le nombre des animaux positifs dont leurs arthropodes étaient aussi positifs était de cinq (6,94%). Parmi ces animaux, quatre (5,55%) chiens étaient porteurs de l'ADN du même agent pathogène détecté dans leurs ectoparasites. Par contre un seul (1,39%) chien était infecté d'un agent pathogène différent de celui décelé dans ses ectoparasites (Annexes 6, 7 et 8, Tableau 18).

Tableau 18 : Comparaison des résultats de la détection moléculaire des agents pathogènes à transmission vectorielle entre les chiens et leurs arthropodes.

Variables	Chiens positifs (Nbr/%)	Chiens négatifs (Nbr/%)	Total
Arthropodes positifs	5 (6,94%)	22 (30,55%)	27 (37,5)
Arthropodes négatifs	6 (8,33%)	39 (54,16%)	45 (62,5%)
Total	11 (15,72%)	61 (84,72%)	72

NB : 72 est le total des chiens infestés testés par qPCR.

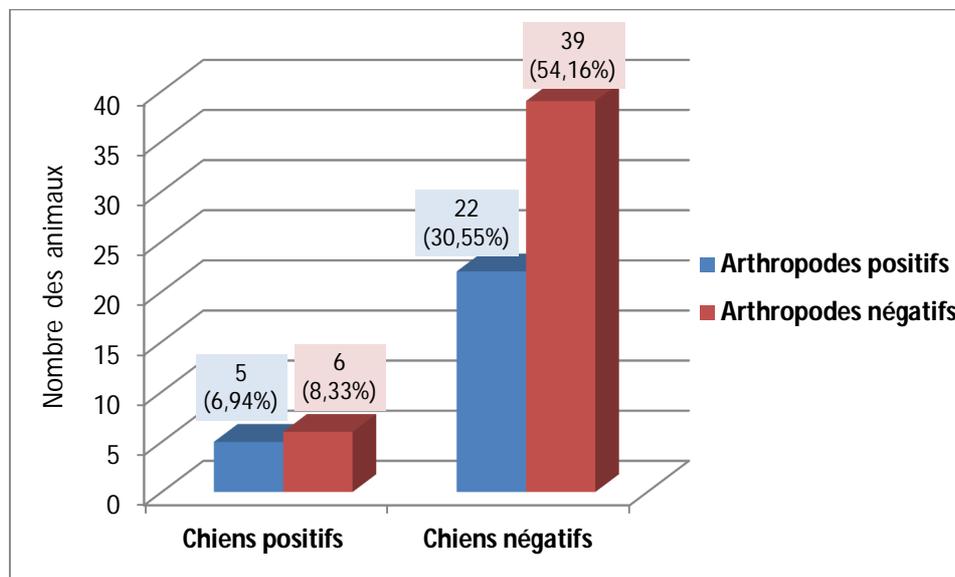


Figure 38 : Représentation de la relation de la présence ou l'absence de l'infection entre les chiens infestés et leurs arthropodes vecteurs.

Il y a une indépendance entre la positivité des chiens et de leurs arthropodes vis-à-vis les bactéries zoonotiques vectorisées en se basant sur le test de Fisher exact ($p > 0,05$).

IV.2.2. Chez l'espèce féline

Le Tableau montre deux catégories concernant la relation de la présence ou l'absence d'une infection entre les animaux réservoirs et leurs arthropodes vecteurs. Nos résultats indiquent que 18 (27,69%) chats négatifs par qPCR, hébergeaient des tiques et des puces infectées par des bactéries pathogènes (Annexes 6 et 9, Tableau 19). Aucune bactérie à transmission vectorielle, ciblée dans notre investigation, n'a été mise en évidence chez les chats infestés.

Tableau 19: Comparaison des résultats de la détection moléculaire des agents pathogènes à transmission vectorielle entre les chats et leurs arthropodes.

Variables	Chats négatifs (Nbr/%)
Arthropodes positifs	18 (27,69%)
Arthropodes négatifs	47 (72,31%)
Total	65

NB: 65 est le total des chats infestés testés par qPCR.

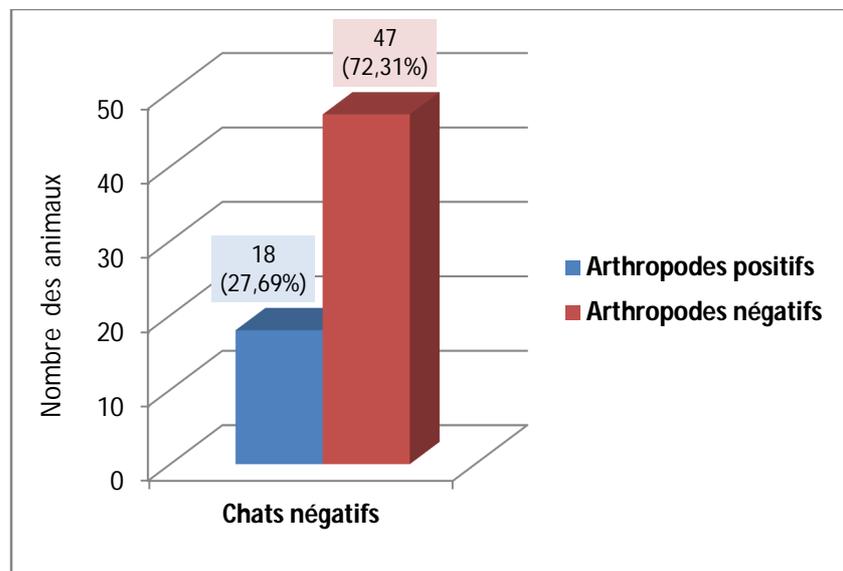


Figure 39: Représentation de la relation de la présence ou l'absence de l'infection entre les chats infestés et leurs arthropodes vecteurs.

Sur la globalité des chats négatifs, l'ensemble des arthropodes étaient négatifs. Cette relation est hautement significative ($p < 0,001$).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons réalisé une investigation sur la présence et la diversité des maladies à transmission vectorielle canine et féline en Algérie en utilisant des techniques moléculaires. Au total, 18/177 (15,38%) chiens et 2/107 (1,87%) chats étaient positifs pour au moins un agent pathogène, dont un chien co-infecté par deux agents. Nous avons montré également que les insectes et les acariens recueillis à partir de ces animaux ont été infectés par plusieurs espèces de bactéries.

Les techniques moléculaires sont plus utiles pour la détection des infections chroniques et subcliniques (Abd Rani et *al.*, 2011), et sont parfaitement adaptées aux enquêtes épidémiologiques comme indiqué ici. La validité de nos données était basée sur des méthodes et des techniques rigoureuses avec des équipements sophistiqués utilisés en routine dans le centre de référence URMITE, y compris la plus haute qualité des contrôles positifs et négatifs pour confirmer le test.

Le choix de la rate comme type de prélèvement sur nos animaux se justifie par le fait qu'elle soit hautement perfusée et agit en tant que filtre pour épurer le sang. Cet organe est également impliqué dans le contrôle immunologique et l'élimination des pathogènes à vecteur. En effet, ces derniers peuvent avoir un rôle fondamental dans la pathogenèse de la maladie splénique (Movilla et *al.*, 2017).

A notre connaissance, c'est la première étude moléculaire démontrant la présence de *C. burnetii* chez les chiens et les chats en provenance de l'Algérie. *C. burnetii*, l'agent causal de la fièvre Q, est reconnu comme l'un des agents pathogènes zoonotiques les plus importants. Cet organisme infecte un large éventail d'espèces animales et les infections endémiques sont répandues à travers le monde entier. Les tiques sont aussi impliquées dans le cycle de transmission de *C. burnetii* (Cairns et *al.*, 2007). En plus des animaux domestiques tels que les bovins, les ovins et les caprins, considérés comme les principaux réservoirs de *C. burnetii*, les chiens et les chats ont récemment reçu l'attention en tant qu'une source potentielle d'exposition humaine (Wei et *al.*, 2014). Ces derniers ont été impliqués dans certaines épidémies (Marrie et *al.*, 1988 ; Buhariwalla et *al.*, 1996).

Dans notre travail, *C. burnetii* a été détectée et confirmée dans les rates d'un seul chien et d'un seul chat. Basé sur les résultats de qPCR, *C. burnetii* a été également identifiée dans 1/123 (0,8%) échantillons de sang appartenant à des chiens asymptomatiques en Hongrie (Hornok et *al.*, 2013). Dans une autre enquête pour la recherche de *C. burnetii*, 12 chiens

et 4 chats hospitalisés ont été examinés au Japon, deux chiens étaient positifs au début, environ 5 mois plus tard, trois chats étaient devenus positifs à la PCR (Komiya et *al.*, 2003b). Récemment, *C. burnetii* a été amplifiée chez 2 chiens vivants dans une zone rurale au Brésil (Mares-Guia et *al.*, 2014). L'ADN de *C. burnetii* a été également détecté dans les placentas de chiens aux Pays-Bas (Roest et *al.*, 2013), et dans les biopsies utérines de chats cliniquement sains en Amérique du Nord (Cairns et *al.*, 2007).

En Algérie, une étude récente a montré que cette bactérie a été la cause de la fièvre chez un patient, mais les cas sont rarement documentés et la prévalence de la maladie est probablement sous-estimée (Angelakis et *al.*, 2014). Nos résultats indiquent que les carnivores domestiques apparemment sains pourraient devenir une source de l'infection humaine par *C. burnetii*. Il est possible que nos animaux positifs vivaient dans un habitat rural en contact étroit avec les ruminants. Un taux de contamination élevé est probable car *C. burnetii* peut être excrétée dans les urines, les matières fécales et le lait de ces derniers et se produit en grand nombre dans le liquide amniotique et le placenta à la naissance. En outre, ces bactéries sont extrêmement résistantes dans l'environnement (Gürtler et *al.*, 2014). L'infection directe en contact avec les rongeurs n'a pas été prouvée chez le chien, par contre elle a été fortement soupçonnée chez les chats qui consommaient des souris infectés. Cependant, les rongeurs infestés par les tiques, qui sont le réservoir naturel de *Coxiella*, peuvent contaminer les chiens via ces vecteurs (Boni et *al.*, 1989).

Dans notre étude, *E. canis* était le pathogène le plus fréquemment retrouvés dans les rates de chiens. L'infection par *E. canis* provoque l'éhrlichiose monocytaire canine, d'abord reconnue comme une entité clinique distincte en Algérie en 1935 (Donatien et Lestoquard, 1935). Depuis, l'éhrlichiose a été devenue une importante maladie émergente chez les humains et les animaux (Maazi et *al.*, 2014). *E. canis* se transmet principalement par la tique brune du chien *Rhipicephalus sanguineus* caractérisée par une distribution mondiale (Wei et *al.*, 2014). L'infection humaine par *E. canis* a été rapportée au Venezuela (Perez et *al.*, 2006). Cependant, l'importance de ce pathogène comme agent zoonotique reste inconnue (de Sousa et *al.*, 2013). Dans ce travail, le pourcentage de positivité de *E. canis* dans les échantillons de rate de nos chiens était de 14,5% (17/117). En Algérie, cette espèce a été récemment décelée dans le sang des chiens par PCR dans la kabylie avec un taux de 6,4% (7/110) (Dahmani et *al.*, 2015) et dans la wilaya d'Alger avec une valeur de 4,7% (10/213) (Azzag et *al.*, 2015).

Des études antérieures ont démontré que la rate est l'organe le plus susceptible de stocker *E. canis* pendant la phase sub-clinique et le dernier organe à abriter ces organismes avant leurs élimination (Harrus et al., 2004). Les auteurs ont également indiqué une longue persistance de cette bactérie dans les macrophages spléniques que dans les monocytes du sang (Baneth et al., 2009). Ces résultats révèlent que l'extraction et l'amplification de l'ADN à partir de ponctions de rate est une méthode fiable pour déterminer le portage de *E. canis* tel que rapporté ici (Harrus et al., 2004 ; Baneth et al., 2009). Récemment, 27/60 (45%) échantillons de rate provenant de chiens infectés naturellement ont été positifs par PCR à *E. canis* au Brésil (De Sousa et al., 2013).

Dans des rapports précédents, l'ADN de *E. canis* a été détecté dans des prélèvements de sang de chiens en provenance de Brésil (7,8% et 3,7%) (Carvalho et al., 2008 ; Tanikawa et al., 2013), de Nigeria (12,7%) (Kamani et al., 2013), d'Iran (22,5%) (Maazi et al., 2014), d'Inde (46,9%) (Lakshmanan et al., 2007) et d'Amérique Centrale (47%, 34% et 56%) (Romero et al., 2011 ; Rojas et al., 2014 ; Wei et al., 2014).

La différence dans les valeurs de prévalences relevées dans ces études peut être attribuée aux différentes origines géographiques des chiens et les tests de diagnostic utilisés. Autres facteurs favorisant les interactions vecteur-hôte jouent un rôle dans l'épidémiologie de l'ehrlichiose canine, comme le statut immunologique des animaux étudiés et la densité d'arthropodes vecteurs.

Les chats de notre étude étaient négatifs à *E. canis*. Ces animaux semblent être moins prédisposés aux maladies transmises par les tiques que les chiens (De Oliveira et al., 2009).

Dans notre enquête, 58,8% (10/17) de chiens infectés par l'ehrlichiose monocyttaire canine ont été porteurs d'ectoparasites. La recherche moléculaire de *E. canis* chez les tiques a démontré que 8/103 (7,77%) *Rhipicephalus sanguineus* étaient infectées. Ces tiques positives ont été recueillies à partir de 4/10 (40%) chiens infestés positifs à *E. canis*. Nous rapportons ici la première évidence directe de *E. canis* dans les tiques vectrices en Algérie. La prévalence de ce pathogène dans les tiques *Rhipicephalus sanguineus* collectées à partir des chiens dans d'autres pays africains a été signalée avec un taux de 6% au Cameroun (Ndip et al., 2010) et de 27% en Côte-d'Ivoire (Socolovschi et al., 2012) en utilisant des outils moléculaires.

Dans le présent travail, un seul chat était positif à *B. henselae* par qPCR. Cette bactérie est un pathogène émergent d'importance vétérinaire et médicale (Tsai et al., 2011). Les chats domestiques développent fréquemment une infection subclinique par *B. henselae*, le principal agent de la maladie des griffes du chat. Ils sont donc considérés comme le principal réservoir d'infection humaine (Chomel et al., 2006 ; Pennisi et al., 2013). Chez les patients malades, *B. henselae* peut provoquer des symptômes oculaires, une encéphalite, une endocardite, une anémie hémolytique, une hépatosplénomégalie, une glomérulonéphrite, une pneumonie et une ostéomyélite (Chomel et al., 2006).

La prévalence moléculaire de *B. henselae* dans la présente étude (1/107; 0,9%) était semblable à celles obtenues dans deux études menées sur des échantillons de sang de chats au Portugal 2/649 (0,3%) (Maia et al., 2014) et en Albanie 1/146 (0,7%) par PCR (Silaghi et al., 2014), mais inférieur à celles précédemment rapportées en Argentine 14/101 (11,9%) (Cicuttin et al., 2014) et à Guatemala (Bai et al., 2015). Récemment, des prélèvements sanguins en provenance des chats errants en Algérie, ont été cultivés pour détecter la présence d'espèces de *Bartonella*. *B. henselae* était la seule espèce isolée à partir de 36/211 (17%) animaux (Azzag et al., 2012).

Parce qu'aucune méthode de culture est actuellement recommandée comme technique de référence pour l'isolement des bartonelles, dans des cas où l'infection par ces agents est suspectée, l'approche moléculaire reste la plus sensible, en particulier la PCR en temps réel (Staggemeier et al., 2014; Bai et al., 2015). Notre faible résultat peut être expliqué par le fait que *Bartonella* peut causer une bactériémie persistante chez les chats et, par conséquent un grand nombre de microorganismes circulants.

Nous rapportons pour la première fois la détection de *B. henselae* et de *B. clarridgeiae* dans les puces *Ctenocephalides felis* recueillies à partir des chats en Algérie. Le taux de prévalence de l'ADN de *B. henselae* et de *B. clarridgeiae* était de 12,64% et 4,59% respectivement. Ces résultats suggèrent que les chats sont des sources importantes de ces bactéries dans notre pays et sont compatibles avec les rapports dans plusieurs pays à travers le monde (Parola et al., 2003 ; Tsai et al., 2011 ; Mokhtar et Tay, 2011 ; Kumsa et al., 2014). Dans notre pays, *B. clarridgeiae* a été détectée dans le sang de chiens (Kernif et al., 2010) et dans les puces des hérissons (Bitam et al., 2012). Basé sur la littérature, il n'y a aucun document publié sur l'identification de *B. henselae* dans les puces en Algérie.

Dans cette étude, nous avons détecté *B. henselae* dans la rate d'un seul chien. Les chiens subcliniquement infectés peuvent transmettre *Bartonella* aux humains en répandant les arthropodes infectés dans leur environnement (Solano-Gallego et al., 2006). Les chiens domestiques sont considérés en tant que sentinelles épidémiologiques de bartonellose chez l'homme (Diniz et al., 2013). En accordance avec notre résultat, l'ADN de *B. henselae* a été également amplifié à partir du tissu splénique des chiens dans d'autres pays (Ohad et al., 2010; Tabar et al., 2011 ; Friedenberget al., 2015). Récemment, *B. henselae* a été identifié dans 4/96 (4,16%) échantillons de sang de chiens en Algérie par PCR (Azzag et al., 2015).

Les chiens peuvent être infectés par une grande variété d'espèces de *Bartonella*. Des investigateurs indiquent que les chiens sont des hôtes accidentels probables pour *B. henselae*, tout comme les humains, et sont des réservoirs efficaces à la fois pour *B. vinsonii berkhoffii* et pour *B. rochalimae* (Diniz et al., 2013 ; Yore et al., 2014 ; Chomel et al., 2014). Dans ce travail, le chien positif à *B. henselae* était infesté de tiques et de puces. L'analyse moléculaire des ectoparasites de nos chiens a révélé que *B. vinsonii subsp. berkhoffii* a été détecté dans 6/62 (9,67%) *Xenopsylla cheopis*. Ces puces positifs appartiennent à des chiens qui étaient négatifs à *Bartonella* spp. Précédemment, *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* a été détectée infectant les chiens domestiques de la wilaya d'Alger (Kernif et al., 2010).

Xenopsylla cheopis « la puce orientale du rat », distribuée dans le monde entier, est suspectée de transmettre plusieurs espèces de *Bartonella* (Billeter et al., 2013). En Algérie, *B. elizabethae* et *B. tribocorum* ont été détectées dans les puces *Xenopsylla cheopis* de rongeurs (Bitam et al., 2012). Nous avons détecté pour la première fois la présence de *B. vinsonii subsp. berkhoffii* dans ces espèces de puces. *Xenopsylla cheopis* peuvent jouer un rôle dans l'épidémiologie de cette bactérie.

Dans notre étude, tous les animaux ont été testés négatifs pour *Rickettsia* spp. La recherche moléculaire de ces bactéries dans les ectoparasites a montré des résultats positifs. Nous avons identifié l'ADN de *R. felis* dans 2/87 (2,30%) *Ctenocephalides felis* de chats. En Algérie, la présence de *R. felis* a été détecté dans *Ctenocephalides canis* et *Xenopsylla cheopis* des rongeurs (Bitam et al., 2009a). Dernièrement, *Ctenocephalides felis* collectées d'hérissons ont été également démontrées abritant ce pathogène émergent (Leulmi et al., 2016).

Dans d'autres travaux, l'ADN de *R. felis* a été détecté dans *Ctenocephalides felis* de chats en Thaïlande (Parola et al., 2003), en Malaisie (Mokhtar and Tay, 2011) et en Éthiopie (Kumsa et al., 2014).

Nous avons également signalé un taux d'infection de 24,4% pour *R. massiliae* et 0,87% pour *R. conorii* dans les tiques *Rh. sanguineus*. Ces deux rickettsies du groupe boutonneux ont été auparavant amplifiées à partir de ces tiques par des outils moléculaires en Algérie (Bitam et al., 2006b ; Khaldi et al., 2012) et en Tunisie (Khrouf et al., 2014). Dans l'ensemble, nous confirmons que les chiens et les chats peuvent agir comme des hôtes efficaces d'ectoparasites infectés par plusieurs agents de rickettsioses.

Les animaux de notre étude étaient négatifs vis-à-vis l'infection par les espèces de *Borrelia burgdorferi* s.l. Dans les zones de faible densité de tiques vectrices (*Ixodes ricinus*) comme dans notre cas (la wilaya d'Alger) (Kernif, 2007), les études sérologiques sont préférables chez les carnivores domestiques (hôtes possibles de ces arthropodes) afin de surveiller la maladie de Lyme dans notre pays.

Parmi nos animaux positifs, un chien était co-infecté par deux agents : *E. canis* et *C. burnetii*. Depuis l'avènement des tests de diagnostic moléculaire, il est devenu de plus en plus évident que les co-infections de maladies transmises par les tiques sont communes chez les chiens (Shaw et al., 2001). Ce phénomène a été également signalé dans les tiques de nos animaux. Effectivement les tiques de nos chiens étaient co-infectés par *R. massiliae* et *E. canis*. Les rickettsioses et les ehrlichioses sont souvent transmises par les tiques (Chen et al., 2014). Les tiques co-infectées par de multiples agents pathogènes augmentent considérablement le risque de co-infections à l'homme, ce qui entraînerait une manifestation clinique plus complexe et pourrait être mal diagnostiquée.

Dans cette étude, l'analyse des variables à savoir le sexe, la race, l'âge et le statut clinique chez la population canine n'a pas montré de différences significatives ($p < 0,05$) parmi eux. Ces résultats corroborent avec ceux constatés par Carvalho et al. (2008), Dantas-Torres (2008), Abd Rani et al. (2011) et Nazari et al. (2013). Ces paramètres n'ont pas pu être étudiés chez la population féline. Ceci est dû au faible nombre de résultats positifs qui a présenté une limite à l'interprétation des résultats.

La prévalence des agents pathogènes chez les chiens n'était pas en corrélation positive avec la présence des arthropodes vecteurs sur l'animal. Ce qui est en contradiction avec les deux études de Carvalho et *al.* (2008) et Abd Rani et *al.* (2011) qui considèrent que l'infestation par les tiques est un facteur de risque pour ces infections. D'autres facteurs potentiellement hôtes et environnementaux peuvent aussi jouer un rôle important dans l'épidémiologie des infections à transmission vectorielles chez les chiens dans la région d'Alger.

Concernant la relation entre l'infection chez les animaux et leurs arthropodes, nos analyses statistiques ont indiqué qu'elle est indépendante chez les chiens. Il faut préciser qu'avant l'euthanasie de nos animaux, ces derniers étaient regroupés ensemble dans une cage unique, cette promiscuité a évidemment favorisé le déplacement des tiques et des puces d'un individu à un autre. Cette probabilité peut expliquer les cas identifiés dans notre enquête où les ectoparasites étaient infectés par contre leurs hôtes étaient négatifs vis-à-vis les bactéries vectorisés et vice-versa.

Il est possible que nos animaux positifs abritaient des arthropodes non infectés et présentaient une infection chronique ou bien lors de l'échantillonnage au hasard des ectoparasites à tester, nous n'avons pas sélectionné les arthropodes infectés. En revanche, il pourrait que les arthropodes porteurs de pathogènes attachés à leurs hôtes non infectés n'ont pas eu le temps de contaminer l'animal. Ceci dépend du pouvoir vectoriel et de la capacité de la tique ou de la puce à transmettre la bactérie à l'animal. L'identification des relations entre les microbes pathogènes, les arthropodes et les animaux est importante pour comprendre la survenue de la maladie.

La prévalence globale élevée des infestations par les tiques et les puces chez les chiens (61,53%) et les chats (60,74%) dans la présente étude suggère que les conditions écologiques et climatiques sont appropriées pour la survie de ces arthropodes vecteurs dans la zone d'étude. Le degré d'infestation par les tiques chez les chiens était significativement supérieur par rapport à celui des chats. Les chiens sont beaucoup plus affectés par les tiques que les chats, tout simplement parce que les chats sont moins susceptibles d'entrer dans le territoire de ces acariens et les propriétaires ne prennent pas leurs chats pour une promenade dans les forêts comme dans le cas des chiens domestiques. De plus, les chats infestés se débarrassent facilement des tiques par eux-mêmes en raison de leur comportement d'auto-toilette intensif.

Concernant les différentes espèces de puces qui parasitent les carnivores domestiques, Farkas et *al.* (2009) ont constaté que la prévalence de *Ctenocephalides canis* était plus élevée chez les chiens par rapport aux chats, par contre le taux d'atteinte par la puce *Ctenocephalides felis* était nettement supérieur chez les chats. Ce constat concorde avec nos résultats.

La prévalence de *Xenopsylla cheopis* était importante chez nos chiens. Cette espèce de puce est spécifique des rongeurs mais peuvent affecter les chiens surtout si ces derniers sont errants (Koutinas et *al.*, 1995 ; Cañón-Franco et Pérez-Bedoya, 2010).

L'habitat extérieur, le contact avec d'autres animaux réservoirs et la non-utilisation des applications antiparasitaires préventives ou thérapeutiques ont été trouvés corrélés avec la positivité en PCR aux infections d'origine vectorielle (Kamani et *al.*, 2013). Ces facteurs sont associés à une grande exposition des carnivores domestiques d'Alger aux vecteurs arthropodes et les microbes qu'ils pourraient transmettre.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les constats de cette recherche démontrent que les pathogènes humains et animaux sont présents chez les chiens et les chats et leurs ectoparasites en Algérie. Etant donné que les citoyens peuvent être en contact étroit avec ces animaux, il est possible que certaines maladies inconnues soient causées par les espèces bactériennes rapportées ici.

Les médecins et les vétérinaires doivent inclure ces agents infectieux dans le diagnostic différentiel des pathologies présentant des signes cliniques compatibles. En outre, l'utilisation de techniques moléculaires, en particulier la PCR en temps réel, est importante afin d'établir un diagnostic approprié et de fournir un traitement efficace pour leurs patients.

Cette étude originale est la première à enquêter sur l'exposition aux multiples pathogènes à transmission vectorielle chez les chats errants en Algérie. C'est également la première description de *C. burnetii* chez les animaux.

La présence de ces agents dans notre pays, avec le caractère zoonotique, souligne la nécessité d'alerter la communauté vétérinaire, les propriétaires et les autorités de santé publique pour le risque d'infection. Les mesures de contrôle, y compris la chimioprophylaxie contre les vecteurs ectoparasites, devraient être mises en œuvre pour prévenir l'infection des carnivores domestiques, d'autres hôtes vertébrés et de l'homme.

Ce document a fourni de nouvelles informations intéressantes sur les bactéries zoonotiques émergentes des animaux de compagnie. Des données épidémiologiques supplémentaires en examinant un nombre plus important d'animaux domestiques à partir de plusieurs localités sont nécessaires afin de déterminer la prévalence et la distribution réelle de ces maladies en Algérie, aussi bien pour permettre l'analyse approfondie des facteurs de risque associés. D'autres enquêtes sont justifiées afin d'isoler ces microorganismes et de déterminer leur signification clinique.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abd Rani P. A., Irwin P. J., Coleman G. T., Gatne M., Traub R. J. 2011. A survey of canine tick-borne diseases in India. *Parasit. Vectors.* 4:141.
2. Aboudharam G., Vu D. L., Davoust B., Drancourt M., Raoult D. 2005. Molecular detection of *Bartonella spp.* in the dental pulp of stray cats buried for a year. *Microb. Pathog.* 38(1): 47-51.
3. Aguirre E., Tesouro M. A., Amusategui I., Rodríguez-Franco F., Sainz A. 2004. Assessment of feline ehrlichiosis in central Spain using serology and a polymerase chain reaction technique. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026:103-5.
4. Alem A. and Hadji N. 1999. Clinico-serologic study of Lyme disease in Algeria (1996-1999). *Arch. Inst. Pasteur Alger.* 63:49-58.
5. Alexandre N., Santos A. S., Bacellar F., Boinas F. J., Nuncio M. S., De Sousa R. 2011. Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). *Ticks Tick Borne Dis.* 2(2), p: 119-122.
6. Allison R. W. and Little, S. E. 2013. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology.* 42: 127-144.
7. Anderson A., Bijlmer H., Fournier P. E., Graves S., Hartzell J., Kersh G. J., Limonard G., Marrie T. J., Massung R. F., McQuiston J. H., Nicholson W. L., Paddock C. D., Sexton D. J. 2013. Diagnosis and management of Q fever-United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *M.M.W.R. Recomm. Rep.* 62 (RR-03):1-30.
8. Angelakis E., Mediannikov O., Socolovschi C., Mouffok N., Bassene H., Tall A., Niangaly H., Doumbo O., Znazen A., Sarih M., Sokhna C., Raoult D. 2014. *Coxiella burnetii*-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa. *Int. J. Infect. Dis.* 28:107-110.
9. Angelakis E., Roux V., Raoult D., Rolain J. M. 2009. Real-time PCR strategy and detection of bacterial agents of lymphadenitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28:1363-1368.
10. Azad A. F., Radulovic S., Higgins J. A., Noden B. H., Troyer J. M. 1997. Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerg. Infect. Dis.* 3(3): 319-327.
11. Azzag N., Haddad N., Durand B., Petit E., Ammouche A., Chomel B., Boulouis H. J. 2012. Population structure of *Bartonella henselae* in Algerian urban stray cats. *PLoS. One.* 7:e43621.
12. Azzag N., Petit E., Gandoin C., Bouillin C., Ghalmi F., Haddad N., Boulouis H. J. 2015. Prevalence of select vector-borne pathogens in stray and client-owned dogs from Algiers. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 38:1-7.
13. Bacellar F., Dawson J. E., Silveira C. A., Filipe A. R. 1995. Antibodies against *Rickettsiaceae* in dogs of Setubal, Portugal. *Cent. Eur. J. Public Health.* 3(2): 100-102.
14. Bai Y., Kosoy M. Y., Boonmar S., Sawatwong P., Sangmaneedet S., Peruski L. F. 2010. Enrichment culture and molecular identification of diverse *Bartonella* species in stray dogs. *Vet. Microbiol.* 146 (3-4): 314-319.
15. Bai Y., Rizzo M.F., Alvarez D., Moran D., Peruski L.F., Kosoy M. 2015. Coexistence of *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae* in populations of cats and their fleas in Guatemala. *J. Vector. Ecol.* 40(2):327-332.
16. Baneth G., Harrus S., Ohnona F. S., Schlesinger Y. 2009. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Vet. Microbiol.* 136:321-325.
17. Bayliss D. B., Morris A. K., Horta M. C., Labruna M. B., Radecki S. V., Hawley J. R., Brewer M. M., Lappin M. R. 2009. Prevalence of *Rickettsia* species antibodies and *Rickettsia* species DNA in the blood of cats with and without fever. *J Feline Med. Surg.* 11(4): 266-270.
18. Beaman M.H. and Hung J. 1989. Pericarditis associated with tick-borne Q fever. *Aust. N. Z. J. Med.* 19(3):254-6.
19. Beaucournu J.C. et Launay H. 1990. Les puces (Siphonaptera) de France et du bassin méditerranéen occidental. *Paris : Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles.* 548 pages.

20. Bechah Y., Socolovschi C., Raoult D. 2011. Identification of rickettsial infections by using cutaneous swab specimens and PCR. *Emerg. Infect. Dis.* 17:83-86.
21. Benabdellah A., Mouffok N., Bensaad M., Belkadi K. A., Razik F. 2007. Mediterranean-spotted fever: clinical and laboratory characteristics of 34 children in Oran (Algeria). *Pathol. Biol. (Paris)*. 55(10): 539-542.
22. Benredjem W., Leulmi H., Bitam I., Raoult D., Parola P. 2014. *Borrelia garinii* and *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* ticks, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 20(10):1776-1777.
23. Benslimani A., Fenollar F., Lepidi H., Raoult D. 2005. Bacterial zoonoses and infective endocarditis, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 11(2): 216-224.
24. Berzina I. and Matise I. 2013. Seroprevalence against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and occurrence of antibody co-expression with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Latvia. *Ir. Vet. J.* 66(1): 9.
25. Billeter S. A., Colton L., Sangmaneedet S., Suksawat F., Evans B. P., Kosoy M. Y. 2013. Molecular detection and identification of *Bartonella* species in rat fleas from northeastern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 89:462-465.
26. Billeter S. A., Levy M. G., Chomel B. B., Breitschwerdt E. B. 2008. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med. Vet. Entomol.* 22: 1-15.
27. Birchard S. J. and Sherding R. G. 2006. Manual of small animal practice. *St. Louis, Mo. Saunders Elsevier*, 3rd ed. Chapitre 18: Borreliosis (lyme disease). P: 186-210.
28. Birtles R. J., Harrison T. G., Saunders N. A., Molyneux D. H. 1995. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 45(1): 1-8.
29. Bitam I. 2008. Identification of *Bartonella* species including human pathogens and new species (*Candidatus Bartonella eldjazairii*) in fleas from Algeria. Cited in: Approche moléculaire de l'épidémiologie des bactéries transmises par les puces en Algérie. Thèse de Doctorat. Université de la Méditerranée, Unité des Rickettsies. 180 Pages.
30. Bitam I. 2012. Vectors of rickettsiae in Africa. *Ticks. Tick. Borne. Dis.* 3:382-386.
31. Bitam I., Baziz B., Kernif T., Harrat Z., Parola P., Raoult D. 2009a. Molecular detection of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in fleas from Algeria. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (2): 255-256.
32. Bitam I., Dittmar K., Parola P., Whiting M. F., Raoult D. 2010. Fleas and flea-borne diseases. *Int. J. Infect. Dis.* 14(8): 667-676.
33. Bitam I., Parola P., De La Cruz k. D., Matsumoto K., Baziz B., Rolain J. M., Belkaid M., Raoult D. 2006a. First Molecular detection of *Rickettsia felis* in fleas from Algeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74(4): 532-535.
34. Bitam I., Parola P., Matsumoto K., Rolain J. M., Baziz B., Boubidi S. C., Harrat Z., Belkaid M., Raoult D. 2006b. First molecular detection of *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, and *R. massiliae* in ticks from Algeria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078:368-372.
35. Bitam I., Rolain J. M., Kernif T., Baziz B., Parola P., Raoult D. 2009b. *Bartonella* species detected in rodents and hedgehogs from Algeria. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (2): 102-103.
36. Bitam I., Rolain J. M., Nicolas V., Tsai Y. L., Parola P., Gundi V. A., Chomel B. B., Raoult D. 2012. A multi-gene analysis of diversity of *Bartonella* detected in fleas from Algeria. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35:71-76.
37. BITAN E. C. 2002. Les bactéries hémotropes : aspects bactériologique, épidémiologique, clinique chez le chien et pathologie comparée chez l'homme. Thèse de Doctorat vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. 126 pages.

38. Bjurman N.K., Bradet G., Lloyd V.K. 2016. Lyme disease risk in dogs in New Brunswick. *Can. Vet. J.* 57(9):981-4.
39. Boarbi S., Fretin D., Mori M. 2016. *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre Q. *Can. J. Microbiol.* 62: 102-122.
40. Boni M., Davoust B., Tissot-Dupont H., Raoult D. 1998. Survey of seroprevalence of Q fever in dogs in the southeast of France, French Guyana, Martinique, Senegal and the Ivory Coast. *Vet Microbiol.* 64: 1-5.
41. Bouattour A., Ghorbel A., Chabchoub A., Postic D. 2004. Lyme borreliosis situation in north Africa. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 81 (1-4):13-20.
42. Boulouis H. J., Chang C. C., Henn J. B., Kasten R. W., Chomel B. B. 2005a. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet. Res.* 36 (3): 383-410.
43. Boulouis H. J., Haddad N., Maillard R., Marignac G., Vayssier T. M. 2007. Les infections à *Bartonella* chez l'homme et l'animal : aspects diagnostiques et thérapeutiques. *Revue francophone des laboratoires.* 391: 33-40.
44. Boulouis H. J., Maillard R., Halos L., Vayssier T. M., Chomel B. 2005b. Les infections à *Bartonella* chez les mammifères. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire.* 298: 30-34.
45. Boulouis H. J., Marignac G., Haddad N., Maillard R., Chomel B. 2008. Les animaux réservoirs et victimes des *Bartonella*. *Mémoire, Bull. Acad. Vét. France.* 161 (3): 211-220.
46. Braga Í. A., Dos Santos L. G. F., De Souza Ramos D. G., Melo A. L. T., Da Cruz Mestre G. L., De Aguiar D. M. 2014. Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 45(2): 641-645.
47. Braga Mdo S., André M. R., Freschi C. R., Teixeira M. C., Machado R. Z. 2012. Molecular and serological detection of *Ehrlichia spp.* in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21 (1): 37-41.
48. Breitschwerdt E. B and Kordick D.L. 2000. *Bartonella* infection in animals: carrier ship, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 428-438.
49. Breitschwerdt E. B. 2008. Feline bartonellosis and cat scratch disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123: 167-171.
50. Breitschwerdt E. B., Blann K. R., Stebbins M. E., Munana K. R., Davidson M. G., Jackson H. A., Willard M. D. 2004. Clinicopathological abnormalities and treatment response in 24 dogs seroreactive to *Bartonella vinsonii (berkhoffii)* Antigens. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 40: 92-10.
51. Breitschwerdt E. B., Kordick D. L., Malarkey D. E., Keene B., Hadfield T. L., Wilson K. 1995. Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. *J. Clin. Microbiol.* 33: 154-160.
52. Breitschwerdt E.B., Abrams-Ogg A.C., Lappin M.R., Bienzle D., Hancock S.I., Cowan S.M., Clouten J.K., Hegarty B.C., Hawkins E.C. 2002. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 16(6):642-9.
53. Brenner D. J., Krieg N. R., Garrity G. M., Staley J. T. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria, Part 3. *Second Edition. Springer.* 2: 138.
54. Brenner D. J., Oconnor S. P., Winkler H. H., Steigerwalt A. G. 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order Rickettsiales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43(4): 777-786.
55. Buhariwalla F., Cann B., Marrie T. J. 1996. A dog-related outbreak of Q fever. *Clin. Infect. Dis.* 23:753-755.

56. Cairns K., Brewer M., Lappin M. R. 2007. Prevalence of *Coxiella burnetii* DNA in vaginal and uterine samples from healthy cats of north-central Colorado. *J. Feline. Med. Surg.* 9:196-201.
57. Cañón-Franco W. A. and Pérez-Bedoya J. L. 2010. Siphonaptera (Pulicidae) in dogs and cats of Colombia: Clinical and epidemiological aspects. *Vet. Parasitol.* 173 (3-4): 353-7.
58. Carvalho F. S., Wenceslau A. A., Carlos R. S., Albuquerque G. R. 2008. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. *Genet. Mo.l Res.* 7 (3): 657-62.
59. Case J. B., Chomel B., Nicholson W., Foley J.E. 2006. Serological survey of vector-borne zoonotic pathogens in pet cats and cats from animal shelters and feral colonies. *J. Feline Med. Surg.* 8(2): 111-117.
60. Chao L. L., Liu L. L., Ho T. Y., Shih C. M. 2014. First detection and molecular identification of *Borrelia garinii* spirochete from *Ixodes ovatus* tick ectoparasitized on stray cat in Taiwan. *PLoS One.* 9 (10): e110599.
61. Chen Z., Liu Q., Liu J. Q., Xu B. L., Lv S., Xia S., Zhou X. N. 2014. Tick-borne pathogens and associated co-infections in ticks collected from domestic animals in central China. *Parasit. Vectors.* 7: 237.
62. Chomel B. B. and Kasten R.W. 2010. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *Journal of Applied Microbiology.* 109 (3): 743-750.
63. Chomel B. B., Boulouis H. J., Breitschwerdt E. B. 2004. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224: 1270-1279.
64. Chomel B. B., Boulouis H. J., Breitschwerdt E. B., Kasten R. W., Vayssier T. M., Birtles R. J., Koehler J. E., Dehio C. 2009. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet. Res.* 40(2): 29.
65. Chomel B. B., Boulouis H. J., Maruyama S., Breitschwerdt E. B. 2006. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerg. Infect. Dis.* 12(3): 389-394.
66. Chomel B. B., Ermel R. W., Kasten R. W., Henn J. B., Fleischman D. A., Chang C. C. 2014. Experimental infection of dogs with various *Bartonella* species or subspecies isolated from their natural reservoir. *Vet. Microbiol.* 168:169-176.
67. Chomel B. B., Kasten R. W., Floyd H. K., Chi B., Yamamoto K., Roberts W. J., Gurfield A. N., Abbott R. C., Pedersen N. C., Koehler J. E. 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1952-1956.
68. Chomel B. B., Mac Donald K. A., Kasten R. W., Chang C. C., Wey A. C., Foley J. E., Thomas W. P., Kittleson M. D. 2001. Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3548-3554.
69. Chomel B. B., Wey A. C., Kasten R. W. 2003b. Isolation of *Bartonella washoensis* from a dog with mitral valve endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5327-5332.
70. Cicuttin G. L., Brambati D. F., De Gennaro M. F., Carmona F., Isturiz M. L., Pujol L. E., Belerenian G. C., Gil H. 2014. *Bartonella* spp. in cats from Buenos Aires, Argentina. *Vet. Microbiol.* 168:225-228.
71. Claerebout E., Losson B., Cochez C., Casaert S., Dalemans A. C., De C. A., Madder M., Saegerman C., Heyman P., Lempereur L. 2013. Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasit. Vectors.* 6:183.
72. Dahmani M., Loudahi A., Mediannikov O., Fenollar F., Raoult D., Davoust B. 2015. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. *Ticks. Tick. Borne. Dis.* 6:198-203.
73. Dantas-Torres F. 2008. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors. Review.* 1: 25.
74. Dantas-Torres F. and Otranto D. 2014. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. *Parasit. Vectors.* 7:22.

75. Davoust B., Mediannikov O., Marié J. L., Socolovschi C., Parola P., Raoult D. 2010. Les animaux vertébrés sont-ils réservoirs de rickettsies? *Mémoire. Bull. Acad. Vét. France.* 163 (4/5): 291-302.
76. Dawson J.E. Anderson B.E., Fishbein D.B., Sanchez J.L., Goldsmith C.S., Wilson K.H., Duntley C.W. 1991. Isolation and characterization of an *Ehrlichia sp.* from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 29 (12): 2741-2745.
77. De Oliveira L. S., Mourao L. C., Oliveira K. A., Da Matta A. M., De Oliveira A. C., De Almeida M. R, Fietto J. L., Conceicao L. G., Filho J. D., Galvao M. A., Mafra C. 2009. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (2): 53-54.
78. De Rooij M. M., Schimmer B., Versteeg B., Schneeberger P., Berends B. R., Heederik D., Van Der Hoek W., Wouters I. M. 2012. Risk factors of *Coxiella burnetii* (Q fever) seropositivity in veterinary medicine students. *PLoS. One.* 7(2): e32108.
79. De Sousa K. C., Andre M. R., Herrera H. M., de Andrade G. B., Jusi M. M., Dos Santos L. L., Barreto W. T., Machado R. Z., De Oliveira G. P. 2013. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22:525-531.
80. Diniz P. P., Maggi R. G., Schwartz D. S., Cadenas M. B., Bradley J. M., Hegarty B., Breitschwerdt E. B. 2007. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet. Res.* 38(5): 697-710.
81. Diniz P. P., Morton B. A., Tngrian M., Kachani M., Barron E. A., Gavidia C. M., Gilman R. H., Angulo N. P., Brenner E. C., Lerner R., Chomel B. B. 2013. Infection of domestic dogs in peru by zoonotic bartonella species: a cross-sectional prevalence study of 219 asymptomatic dogs. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 7:e2393.
82. Donatien A. and Lestoquard A. 1935. Existence en Algérie d'une rickettsia du chien. *Bul. Soc. Pathol. Exot.* 28: 418-419.
83. Duncan A. W., Maggi R. G., Breitschwerdt E. B. 2007. *Bartonella* DNA in dog saliva. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1948-5190.
84. Edouard S. and Raoult D. 2009. *Bartonella henselae*, un agent d'infections biquitaines. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 40 (6): 319-330.
85. Eklund C.M., Parker R.R., Lackman D.B. 1947. Case of Q fever probably contracted by exposure to ticks in nature. *Public Health Rep.* 62: 1413.
86. Eldin C., Mélenotte C., Mediannikov O., Ghigo E., Million M., Edouard S., Mege J. L., Maurin M., Raoult D. 2017. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clin Microbiol Rev.* 30(1):115-190.
87. Ereqat S., Nasereddin A., Vayssier-Taussat M., Abdelkader A., Al-Jawabreh A., Zaid T., Azmi K., Abdeen Z. 2016. Molecular evidence of *Bartonella* species in Ixodid ticks and domestic animals in Palestine. *Front. Microbiol.* 7:1217.
88. Estrada-Peña A., Bouattour A., Camicas J. L., Walker A. R. 2004. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. A Guide to Identification of Species. *Print book.* 131 pages.
89. Farkas R., Gyurkovszky M., Solymosi N., Beugnet F. 2009. Prevalence of flea infestation in dogs and cats in Hungary combined with a survey of owner awareness. *Med. Vet. Entomol.* 23 (3):187-94.
90. FotsoFotso A., Angelakis E., Mouffok N., Drancourt M. and Raoult D. 2015. Blood-Borne *Candidatus Borrelia algerica* in a Patient with Prolonged Fever in Oran, Algeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4; 93(5):1070-1073.
91. Franc M. 1994. Puces et méthodes de lutte. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE.* 13(4) : 1019-1037.

92. FriedenberG S.G., Balakrishnan N., Guillaumin J., Cooper E.S., Lewis K., Russell D.S., Breitschwerdt E.B. 2015. Splenic vasculitis, thrombosis, and infarction in a febrile dog infected with *Bartonella henselae*. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 25(6):789-94.
93. Gillespie T. N., Washabau R. J., Goldschmidt M. H., Cullen J. M., Rogala A. R., Breitschwerdt E. B. 2003. Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* DNA in hepatic specimens from two dogs with hepatic disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222: 47-51.
94. Gundi V. A., Bourry O., Davoust B., Raoult D., La Scola B. 2004. *Bartonella clarridgeiae* and *B. henselae* in dogs, Gabon . *Emerg. Infect. Dis.* 10: 2261-2262.
95. Guptill L. 2010. Bartonellosis. *Veterinary Microbiology.* 140 (3-4): 347-359.
96. Gürtler L., Bauerfeind U., Blümel J., Burger R., Drostén C., Gröner A., Heiden M., Hildebrandt M., Jansen B., Offergeld R., Pauli G., Seitz R., Schlenkrich U., Schottstedt V., Strobel J., Willkommen H. 2014. *Coxiella burnetii* - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. *Transfus. Med. Hemother.* 41(1):60-72.
97. Harrus S., Kenny M., Miara L., Aizenberg I., Waner T., Shaw S. 2004. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4488-4490.
Harrus S., Lior Y., Ephros M., Grisarú S. G., Keysary A., Strenger C., Jongejan F., Waner T., Baneth G. 2007. *Rickettsia conorii* in humans and dogs: seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(1): 133-135.
98. Hawley J. R., Shaw S. E., Lappin M. R. 2007. Prevalence of *Rickettsia felis* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J. Feline Med. Surg.* 9(3): 258-262.
99. Hegarty B. C., Quorollo B. A., Thomas B., Park K., Chandrashekar R., Beall M. J., Thatcher B., Breitschwerdt E. B. 2015. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. *Parasit. Vectors.* 8: 320.
100. Henn J. B., Gabriel M. W., Kasten R. W., Brown R. N., Koehler J. E., Macdonald K. A., Kittleson M. D., Thomas W. P., Chomel B. B. 2009. Infective endocarditis in a dog and the phylogenetic relationship of the associated “*Bartonella rochalimae*” strain with isolates from dogs, gray foxes, and a human. *J. Clin. Microbiol.* 47(3): 787-790.
101. Henn J. B., Liu C. H., Kasten R. W., Vanhorn B. A., Beckett L. A., Kass P. H., Chomel B. B. 2005. Seroprevalence of antibodies against *Bartonella* species and evaluation of risk factors and clinical signs associated with seropositivity in dogs from northern California. *Am. J. Vet. Res.* 66: 688-694.
102. Hii S. F., Kopp S. R., Abdad M. Y., Thompson M. F., O’leary C. A., REES R. L., Traub R. J. 2011. Molecular evidence supports the role of dogs as potential reservoirs for *Rickettsia felis*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(8): 1007-1012.
103. Hornok S., Denes B., Meli M. L., Tanczos B., Fekete L., Gyuranecz M., De la Fuente J., De Mera I. G., Farkas R., Hofmann-Lehmann R. 2013. Non-pet dogs as sentinels and potential synanthropic reservoirs of tick-borne and zoonotic bacteria. *Vet. Microbiol.* 167:700-703.
104. Houhamdi L., Parola P., Raoult D. 2005. Lice and lice-borne diseases in humans. *Med Trop.* 65(1):13-23.
105. Hunter A. 2006. La santé animale. Volume 2. Principales maladies. *Editions Quæ.* 310 p.
106. Inokuma H., Maetani S., Fujitsuka J., Takano A., Sato K., Fukui T., Masuzawa T., Kawabata H. 2013. Astasia and pyrexia related to *Borrelia garinii* infection in two dogs in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 75(7):975-8.
107. Jouret S. 2001. L’ehrlichiose monocytaire canine : étude expérimentale d’une nouvelle souche d’*Ehrlichia canis*. Ecole nationale vétérinaire d’Alfort. Thèse de Doctorat. 141p.
108. Kamani J., Baneth G., Mumcuoglu K. Y., Waziri N. E., Eyal O., Guthmann Y., Harrus S. 2013. Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 7:e2108.

109. Kamrani A., Parreira V. R., Greenwood J., Prescott J. F. 2008. The prevalence of *Bartonella*, *hemoplasma*, and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 72 (5): 411-419.
110. Kelly P., Rolain J. M., Maggi R., Sontakke S., Keene B., Hunter S., Lepidi H., Breitschwerdt K. T., Breitschwerdt E. B. 2006. *Bartonella quintana* endocarditis in dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 12(12): 1869-1872.
111. Kernif T. 2007. Contribution à l'étude des réservoirs et des vecteurs des agents des rickettsioses (par des techniques moléculaires) et des piroplasmoses dans la région d'Alger. Mémoire de Magistère. École Nationale Vétérinaire d'Alger. 138 pages.
112. Kernif T., Aissi M., Doumandji S.E., Chomel B.B., Raoult D., Bitam I. 2010. Molecular evidence of *Bartonella* infection in domestic dogs from Algeria, North Africa, by polymerase chain reaction (PCR). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83(2):298-300.
113. Khaldi M., Socolovschi C., Benyettou M., Barech G., Biche M., Kernif T., Raoult D., Parola P. 2012. Rickettsiae in arthropods collected from the North African Hedgehog (*Atelerix algirus*) and the desert hedgehog (*Paraechinus aethiopicus*) in Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35:117-122.
114. Khrouf F., M'Ghirbi Y., Znazen A., Ben J. M., Hammami A., Bouattour A. 2014. Detection of *Rickettsia* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks and *Ctenocephalides felis* fleas from southeastern Tunisia by reverse line blot assay. *J. Clin. Microbiol.* 52:268-274.
115. Kidd L., Maggi R., Diniz P. P., Hegarty B., Tucker M., Breitschwerdt E. 2008. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group *Rickettsia* in dog blood. *Vet. Microbiol.* 129 (3-4): 294-303.
116. Komiya T., Sadamasu K., Kang M.I., Tsuboshima S., Fukushi H., Hirai K. 2003a. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infections among cats in different living environments. *Vet. Med. Sci.* 65 (9):1047-8.
117. Komiya T., Sadamasu K., Toriniwa H., Kato K., Arashima Y., Fukushi H., Hirai K., Arakawa Y. 2003b. Epidemiological survey on the route of *Coxiella burnetii* infection in an animal hospital. *J. Infect. Chemother.* 9:151-155.
118. Koutinas A. F., Papazahariadou M. G., Rallis T. S., Tzivara N. H., Himonas C. A. 1995. Flea species from dogs and cats in northern Greece: environmental and clinical implications. *Vet. Parasitol.* 58 (1-2): 109-15.
119. Krupka I. and Straubinger R. K. 2010. 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.* 40:1103-1119.
120. Kumsa B., Parola P., Raoult D., Socolovschi C. 2014. Molecular detection of *Rickettsia felis* and *Bartonella henselae* in dog and cat fleas in Central Oromia, Ethiopia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90:457-462.
121. La Scola B. and Raoult D. 1996. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J. Clin. Microbiol.* 34 (9): 2270-2274.
122. Labruna M. B., Ogrzewalska M., Moraes F. J., Lepe P., Gallegos J. L., López J. 2007. *Rickettsia felis* in Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 13 (11): 1794-1795.
123. Lakshmanan B., John L., Gomathinayagam S., Dhinakarraaj G. 2007. Molecular detection of *Ehrlichia canis* from blood of naturally infected dogs in India. *Veterinarski Arhiv.* 77: 307-312.
124. Lang G.H. 1990. Coxiellosis (Q fever) in animals. In: *Marrie T. J., Ed. Q fever, the disease. Boca Raton: CRC press.* P: 23-48.
125. Langley J.M., Marrie T.J., Covert A., Waag D.M., Williams J.C. 1988. Poker players' pneumonia. An urban outbreak of Q fever following exposure to a parturient cat. *N Engl J Med.* 319: 354-6.

126. Lappin M. R., Chandrashekar R., Stillman B., Liu J., Mather T. N. 2015. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* infection in cats after exposure to wild-caught adult *Ixodes scapularis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27 (4): 522-5.
127. Leulmi H., Aouadi A., Bitam I., Bessas A., Benakhla A., Raoult D., Parola P. 2016. Detection of *Bartonella tamiiae*, *Coxiella burnetii* and rickettsiae in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria. *Parasit Vectors.* 20; 9(1):27.
128. Leulmi H., Socolovschi C., Laudisoit A., Houemenou G., Davoust B., Bitam I., Raoult D., Parola P. 2014. Detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, *Bartonella* Species and *Yersinia pestis* in Fleas (*Siphonaptera*) from Africa. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 8:e3152.
129. Levin M. L., Killmaster L. F., Zemtsova G. E. 2012. Domestic Dogs (*Canis familiaris*) as Reservoir Hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12 (1): 28-33.
130. Little S.E. 2010. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 40(6):1121-40.
131. Maazi N., Malmasi A., Shayan P., Nassiri S. M., Salehi T. Z., Fard M. S. 2014. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* in naturally exposed dogs in Iran: an analysis on associated risk factors. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23:16-22.
132. Maeda K., Markowitz N., Hawley R.C., Ristic M., Cox D., McDade J.E. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N. Engl. J. Med.* 2; 316(14):853-6.
133. Magnarelli L.A., Bushmich S.L., IJdo J.W., Fikrig E. 2005. Seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in cats. *Am. J. Vet. Res.* 66(11):1895-9.
134. Maia C., Ramos C., Coimbra M., Bastos F., Martins A., Pinto P., Nunes M., Vieira M. L., Cardoso L., Campino L. 2014. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasit. Vectors.* 7:115.
135. Mannelli A., Bertolotti L., Gern L., Gray J. 2012. Ecology of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiol Rev.* 36(4):837-61.
136. Manning A. P. and Graham O.H. 1997. Chewing and sucking lice as parasites of mammals and birds. *US Department of Agriculture*, 1st edition. 312 p.
137. Mares-Guia M. A., Rozental T., Guterres A., Gomes R., Almeida D. N., Moreira N. S., Barreira J. D., Favacho A. R., Santana A. L., Lemos E. R. 2014. Molecular identification of the agent of Q fever - *Coxiella burnetii* - in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47:231-234.
138. Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D. 2011. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Infect Genet Evol.* 11(7):1545-63.
139. Marrie T. J. 1990. Q fever - a review. *Can Vet J.* 31(8): 555-563.
140. Marrie T. J., Durant H., Williams J. C., Mintz E., Waag D. M. 1988. Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. *J. Infect. Dis.* 158:101-108.
141. Matthewman L., Kelly P., Hayter D., Downie S., Wray K., Bryson N., Rycroft A., Raoult D. 1997. Domestic cats as indicators of the presence of spotted fever and typhus group rickettsiae. *Eur. J. Epidemiol.* 13 (1): 109-111.
142. McElroy K. M., Blagburn B. L., Breitschwerdt E. B., Mead P. S., Mcquiston J. H. 2010. Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. *Trends in Parasitology.* 26 (4): 197-204.
143. Mcquiston J. H., Guerra M. A., Watts M. R., Lawaczeck E., Levy C., Nicholson W. L., Adjemian J., Swerdlow D. L. 2011. Evidence of exposure to spotted fever group rickettsiae among Arizona dogs outside a previously documented outbreak area. *Zoonoses Public Health.* 58(2): 85-92.
144. Mexas A. M., Hancock S. I., Breitschwerdt E. B. 2002. *Bartonella henselae* and *Bartonella elizabethae* as potential canine pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4670-4674.

145. Michau T. M., Breitschwerdt E. B., Gilger B. C., Davidson M. G. 2003. *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffi* as a possible cause of anterior uveitis and choroiditis in a dog. *Vet. Ophthalmol.* 6: 299 - 304.
146. Mikszewski J. S. and Vite C. H. 2005. Central nervous system dysfunction associated with Rocky Mountain spotted fever infection in five dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 41: 259-266.
147. Mokhtar A. S. and Tay S. T. 2011. Molecular detection of *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, and *B. clarridgeiae* in fleas from domestic dogs and cats in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85:931-933.
148. Mokrani K., Tebbal S., Raoult D., Fournier P. E. 2012. Human rickettsioses in the Batna area, eastern Algeria. *Ticks Tick Borne Dis.* 3(5-6):364-6.
149. Mouffok N., Benabdellah A., Richet H., Rolain J. M., Razik F., Belamadani D., Abidi S., Bellal R., Gouriet F., Midoun N., Brouqui P., Raoult D. 2006. Reemergence of rickettsiosis in Oran, Algeria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078: 180-184.
150. Mouffok N., Parola P., Lepidi H., Raoult D. 2009. Mediterranean spotted fever in Algeria - new trends. *International Journal of Infectious Diseases.* 13 (2): 227-235.
151. Mouffok N., Parola P., Raoult D. 2008. Murine typhus, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 14(4): 676-678.
152. Moulinier C. 2002. Parasitologie et mycologie médicale : éléments de morphologie et de biologie. *Editions Médicales Internationales.* Chapitre 10 «Acariens». P: 635-674.
153. Movilla R., Altet L., Serrano L., Tabar M. D., Roura X. 2017. Molecular detection of vector-borne pathogens in blood and splenic samples from dogs with splenic disease. *Parasit. Vectors.* 10 (1):131.
154. Mullins K. E., Hang J., Clifford R. J., Onmus-Leone F., Yang Y., Jiang J., Leguia M., Kasper M. R., Maguina C., Lesho E. P., Jarman R. G., Richards A., Blazes D. 2017. Whole-genome analysis of *Bartonella ancashensis*, a novel pathogen causing Verruga Peruana, rural ancash region, Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 23(3):430-438.
155. Nascimento D.A., Vieira R.F., Vieira T.S., Toledo R.D., Tamekuni K., Santos N.J., Gonçalves D.D., Vieira M.L., Biondo A.W., Vidotto O. 2016. Serosurvey of *Borrelia* in dogs, horses, and humans exposed to ticks in a rural settlement of southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 25(4):418-422.
156. Nazari M., Lim S. Y., Watanabe M., Sharma R. S., Cheng N. A., Watanabe M. 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs in Malaysia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(1) :e1982.
157. Ndip L. M., Ndip R. N., Esemu S. N., Walker D. H., McBride J. W. 2010. Predominance of *Ehrlichia chaffeensis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from kennel-confined dogs in Limbe, Cameroon. *Exp. Appl. Acarol.* 50:163-168.
158. Nogueras M. M., Pons I., Ortuno A., Miret J., Pla J., Castella J. and Segura F. 2013. Molecular detection of *Rickettsia typhi* in cats and fleas. *PLoS. One.* 8:e71386.
159. Nogueras M. M., Pons I., Ortuño A., Segura F. 2009. Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in dogs from north-eastern Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (2): 237-238.
160. Nozais J. P., Datry A., Danis M. 1996. *Traité de parasitologie médicale.* Editions Paradel. p : 44-66.
161. Ohad D. G., Morick D., Avidor B., Harrus S. 2010. Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella koehlerae* from aortic valves of Boxer dogs with infective endocarditis. *Vet. Microbiol.* 141(1-2): 182-185.
162. Ortuño A., Castellà J., Nogueras M. M., Pons I., Segura F. 2009. Dog as epidemiological marker of *R. conorii* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (2): 241-242.

163. Ortuño A., Gauss C. B., García F., Gutierrez J. F. 2005. Serological evidence of *Ehrlichia* spp. exposure in cats from northeastern Spain. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 52 (5): 246-8.
164. Oskouizadeh K., Zahraei-Salehi T., Aledavood S. J. 2010. Detection of *Bartonella henselae* in domestic cats' saliva. *Iran J. Microbiol.* 2(2): 80-84.
165. Pacheco R. C., Moraes F. J., Guedes E., Silveira I., Richtzenhain L. J., Leite R. C., Labruna M. B. 2011. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Med. Vet. Entomol.* 25(2): 148-155.
166. Pantchev N., Vrhovec M.G., Pluta S., Straubinger R.K. 2016. Seropositivity of *Borrelia burgdorferi* in a cohort of symptomatic cats from Europe based on a C6-peptide assay with discussion of implications in disease aetiology. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 129(7-8):333-9.
167. Parola P. and Raoult D. 2006. Tropical rickettsioses. *Clinics in Dermatology.* 24 (3): 191-200.
168. Parola P., Diatta G., Socolovschi C., Mediannikov O., Tall A., Bassene H., Trape J. F., Raoult D. 2011. Tick-borne relapsing fever borreliosis, rural senegal. *Emerg. Infect. Dis.* 17:883-885.
169. Parola P., Paddock C. D., Socolovschi C., Labruna M. B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M. Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P. E., Raoult D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26:657-702.
170. Parola P., Sanogo O. Y., Lerdthusnee K., Zeaiter Z., Chauvancy G., Gonzalez J. P., Miller R. S., Telford S. R., Wongsrichanalai C., Raoult D. 2003. Identification of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in ffrom the Thai-Myanmar border. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990:173-181.
171. Parzy D., Davoust B., Bissuel G., Vidor E. 1991. Human pathogenicity of *Ehrlichia canis*. *Lancet.* 11; 337(8750):1169.
172. Pennisi M. G., Marsilio F., Hartmann K., Lloret A., Addie D., Belak S., Boucraut-Baralon C., Egberink H., Frymus T., Gruffydd-Jones T., Hosie M. J., Lutz H., Mostl K., Radford A. D., Thiry E., Truyen U., Horzinek M. C. 2013. *Bartonella* species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline. Med. Surg.* 15:563-569.
173. Perez M., Bodor M., Zhang C., Xiong Q., Rikihisa Y. 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078:110-117.
174. Pérez-Eid C. 2007. Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. *Edition Lavoisier.* Pages : 305-314.
175. Pinter A., Horta M. C., Pacheco R. C., Moraes F. J., Labruna M. B. 2008. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. *Cad. Saude. Publica.* 24 (2): 247-252.
176. Piranda E. M., Faccini J. L., Pinter A., Pacheco R. C., Cançado P. H., Labruna M. B. 2011. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(1): 29-36.
177. Psaroulaki A., Chochlakis D., Ioannou I., Angelakis E., Tselentis Y. 2014. Presence of *Coxiella burnetii* in fleas in Cyprus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14 (9): 685-687.
178. Raoult D. 1988. La fièvre Q: infection à *Coxiella burnetii*. *Encycl. Méd. Chir. (Paris-France), Maladies infectieuses.* 8077 N°10, 10 p.
179. Raoult D. and Parola P. 2007. Rickettsial diseases. *Informa Healthcare USA, Inc.* p: 1-46, 87-111, 125-128.
180. Raoult D. and Roux V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 10(4): 694-719.
181. Raoult D. et Brouqui P. 1998. Les rickettsioses. *Éditions Elsevier. Encyclopédie Médico-chirurgicale. Paris, France.* 190 p.

182. Reeves W.K., Szumlas D. E., Moriarity J. R., Loftis A. D., Abbassy M. M., Helmy I. M., Dasch G. A. 2006. Louse-borne bacterial pathogens in lice (Phthiraptera) of rodents and cattle from Egypt. *J Parasitol.* 92(2):313-8.
183. Reif K. E. and Macaluso K. R. (2009): Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *J Med Entomol.* 46(4): 723-736.
184. Renvoisé and Raoult D. 2009 L.'actualité des rickettsioses. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 39 (2): 71-81.
185. Rodhain F. et Perez C. 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire : notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs. *Edition Maloine, Paris.* 458 pages.
186. Roest H. I., van Solt C. B., Tilburg J. J., Klaassen C. H., Hovius E. K., Roest F. T., Vellema P., van den Brom R., van Zijderveld F. G. 2013. Search for possible additional reservoirs for human Q fever, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 19:834-835.
187. Rojas A., Rojas D., Montenegro V., Gutierrez R., Yasur-Landau D., Baneth G. 2014. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: first molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Vet. Parasitol.* 199:121-128.
188. Rolain J. M., Franc M., Davoust B., Raoult D. 2003. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerg. Infect. Dis.* 9(3): 338-342.
189. Romero L. E., Meneses A. I., Salazar L., Jimenez M., Romero J. J., Aguiar D. M., Labruna M. B., Dolz G. 2011. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. *Res. Vet. Sci.* 91:95-97.
190. Rousset E., Russo E., Pépin M., Raoult D. 2001. L'épidémiologie de la fièvre Q animale. Situation en France. *Méd Mal Infect.* 31 Suppl 2 : 233-246.
191. Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J.H. Jr. 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis.* 2(3): 123-128.
192. Saisongkorh W., Rolain J. M., Suputtamongkol Y., Raoult D. 2009. Emerging *Bartonella* in humans and animals in Asia and Australia. *J. Med. Assoc. Thai.* 92(5): 707-731.
193. Saladin C. M. 2007. Caractérisation et diversité génétique des ehrlichioses canines en Guadeloupe. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. Thèse de Doctorat. 156 p.
194. Sarih M., Jouda F., Gern L., Postic D. 2003. First isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks in Morocco. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 3 (3):133-9.
195. Saunders G. K. and Monroe W. E. 2006. Systemic granulomatous disease and sialometaplasia in a dog with *Bartonella* infection. *Vet. Pathol.* 43: 391-392.
196. Savić S., Vidić B., Lazić S., Lako B., Potkonjak A., Lepsanović Z. 2010. *Borrelia burgdorferi* in ticks and dogs in the province of Vojvodina, Serbia. *Parasite.* 17(4):357-61.
197. Segura F., Pons I., Miret J., Pla J., Ortuno A., Nogueras M. M. 2014. The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. *Parasit. Vectors.* 7:353.
198. Senneville E., Ajana F., Lecocq P., Chidiac C., Mouton Y. 1991. *Rickettsia conorii* isolated from ticks introduced to northern France by a dog. *Lancet.* 337(8742):676.
199. Severo M. S., Pedra J. H.F., Ayllón N., Kocan K. M., De La Fuente J. 2015. Molecular Medical Microbiology (Second Edition). *Academic Press.* 3: 2033-2042.
200. Shapiro A. J., Bosward K. L., Heller J., Norris J. M. 2015. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domesticated and feral cats in eastern Australia. *Vet. Microbiol.* 177 (1-2):154-61.
201. Shapiro A. J., Norris J. M., Heller J. , Brown G., Malik R., Bosward K. L. 2016. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Australian dogs. *Zoonoses Public Health.* 63 (6):458-66.

202. Shaw S. E., Day M. J., Birtles J. R., Breitschwerdt B. E. 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology, Review*. 17 (2): 74-80.
203. Silaghi C., Knaus M., Rapti D., Kusi I., Shukullari E., Hamel D., Pfister K., Rehbein S. 2014. Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, *haemotropic mycoplasmas* and other arthropod-borne pathogens in cats from Albania. *Parasit. Vectors*. 7:62.
204. Skotarczak B. 2014. Why are there several species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* detected in dogs and humans? *Infect. Genet. Evol.* 23:182-188.
205. Skotarczak B., Wodecka B., Rymaszewska A., Sawczuk M., Maciejewska A., Adamska M., Hermanowska-Szpakowicz T., Swierzbńska R. 2005. Prevalence of DNA and antibodies to *Borrelia burgdorferi sensu lato* in dogs suspected of borreliosis. *Ann. Agric. Environ. Med.* 12(2):199-205.
206. Socolovschi C., Gomez J., Marie J. L., Davoust B., Guigal P. M., Raoult D., Parola P. 2012a. *Ehrlichia canis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in the Ivory Coast. *Ticks. Tick. Borne. Dis.* 3:411-413.
207. Socolovschi C., Kernif T., Raoult D., Parola P. 2012b. *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* species in bat ticks, France, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 18:1966-1975.
208. Socolovschi C., Reynaud P., Kernif T., Raoult D., Parola P. 2012c. Rickettsiae of spotted fever group, *Borrelia valaisiana*, and *Coxiella burnetii* in ticks on passerine birds and mammals from the Camargue in the south of France. *Ticks. Tick. Borne. Dis.* 3:355-360.
209. Solano-Gallego L., Llull J., Osso M., Hegarty B., Breitschwerdt E. 2006. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet. Res.* 37:231-244.
210. Solano-gallego L., Trotta M., Caldin M., Furlanello T. 2008. Molecular survey of *Rickettsia spp.* in sick dogs in Italy. *Zoonoses Public Health.* 55(8-10): 521-525.
211. Sorvillo F. J., Gondo B., Emmons R., Ryan P., Waterman S. H., Tilzer A., Andersen E. M., Murray R. A., Barr R. 1993. A suburban focus of endemic typhus in Los Angeles County: association with seropositive domestic cats and opossums. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48(2): 269-273.
212. Staggemeier R., Pilger D.A., Spilki F.R., Cantarelli V.V. 2014. Multiplex SYBR green-real time PCR (qPCR) assay for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 56(2):93-95.
213. Staggemeier R., Venker C. A., Klein D. H., Petry M., Spilki F. R., Cantarelli V. V. 2010. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105(7): 873-878.
214. Steere A.C., Strle F., Wormser G.P., Hu L.T., Branda J.A., Hovius J.W., Li X., Mead P.S. 2016. Lyme borreliosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2:16090.
215. Tabar M. D., Maggi R. G., Altet L., Vilafranca M., Francino O., Roura X. 2011. Gammopathy in a Spanish dog infected with *Bartonella henselae*. *J. Small Anim Pract.* 52:209-212.
216. Tanikawa A., Labruna M. B., Costa A., Aguiar D. M., Justiniano S. V., Mendes R. S., Melo A. L., Alves C. J., Azevedo S. S. 2013. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. *Res. Vet. Sci.* 94:474-477.
217. Torina A. and Caracappa S. 2006. Dog tickborne diseases in Sicily. *Parassitologia.* 48(1-2): 145-147.
218. Troude L. M. C. 2014. Enquête nationale sur la maladie de Lyme chez le chien. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. Thèse de Doctorat. 101p.
219. Tsai Y. L., Lin C. C., Chomel B. B., Chuang S. T., Tsai K. H., Wu W. J., Huang C. G., Yu J. C., Sung M. H., Kass P. H., Chang C. C. 2011. *Bartonella* infection in shelter cats and dogs and their ectoparasites. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* 11:1023-1030.

220. Tsai Y. L., Lin C. C., Chomel B. B., Chuang S. T., Tsai K. H., Wu W. J., Huang C. G., Yu J. C., Sung M. H., Kass P. H., Chang C. C. 2010. *Bartonella* infection in shelter cats and dogs and their ectoparasites. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(8): 1023-1030.
221. Unver A., Perez M., Orellana N., Huang H., Rikihisa Y. 2001. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *J. of Clin. Microbiol.* 39, 2788-2793.
222. Villeneuve A. 2003. Les zoonoses parasitaires. L'infection chez les animaux et chez l'homme. *Les Presses de l'Université de Montréal.* 506 p.
223. Walker A.R., Bouattour A., Camicas J. L., Estrada-Peña A., Horak I. G., Latif A. A., Pegram R.G., Preston P.M. 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. *Edinburgh: Bioscience Reports.* 221p.
224. Walter G., Botelho-Nevers E., Socolovschi C., Raoult D., Parola P. 2012. Murine typhus in returned travelers: a report of thirty-two cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86:1049-1053.
225. Wedincamp J. Jr. and Foil L. D. 2000. Infection and seroconversion of cats exposed to cat fleas (*Ctenocephalides felis Bouché*) infected with *Rickettsia felis*. *J. Vector. Ecol.* 25(1): 123-126.
226. Wei L., Kelly P., Ackerson K., Zhang J., El-Mahallawy H. S., Kaltenboeck B., Wang C. 2014. First report of *Babesia gibsoni* in Central America and survey for vector-borne infections in dogs from Nicaragua. *Parasit. Vectors.* 7:126.
227. Whitaker A. P. 2007. Fleas (*Siphonaptera*). *Royal Entomological Society.* p :178.
228. Yi-Lun T., Ching-Lin S., Cheng-Te Y., James A. 2012. The *Ixodid* ticks collected from dogs and other animals in Taiwan and Kinmen Island. *International Journal of Acarology.* 38(2):110-115.
229. Yore K., DiGangi B., Brewer M., Balakrishnan N., Breitschwerdt E. B., Lappin M. 2014. Flea species infesting dogs in Florida and *Bartonella spp.* prevalence rates. *Vet. Parasitol.* 199:225-229.
230. Younsi H., Postic D., Baranton G., Bouattour A. 2001. High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. *Eur. J. Epidemiol.* 17 (1):53-6.

Sources Internet (Consultées en Janvier 2017)

Source internet 1 :

https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Borrelia_burgdorferi_NEU2011

Source internet 2 :

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Alger>

Source internet 3 :

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi

ANNEXES

ANNEXE 01 : Caractéristiques épidémiologiques des rickettsioses (Davoust et al., 2010)

	Espèce	Maladie	Répartition géographique	Vecteurs	Transmission transovarienne chez le vecteur (%)	Animaux vertébrés potentiellement réservoirs
Génogroupe Typhus	<i>R. typhi</i>	Typhus murin	Ubiquitaire	Puce (<i>Xenopsylla cheopis</i>)	Oui	<i>Rattus rattus</i> , <i>R. norvegicus</i> , Souris, Opossum, Musaraigne, Chat
	<i>R. prowazekii</i>	Typhus épidémique	Afrique (Éthiopie, Burundi) Amérique centrale Amérique du Sud États-Unis, Asie	Poux (<i>Pediculus humanus corporis</i> <i>P.h. humanus</i>)	Non	Écureuil volant (<i>Glaucomys volans</i>) Aux États-Unis
Géno-groupe Boutonneux	<i>R. conorii conorii</i>	Fièvre boutonneuse méditerranéenne	Sud de l'Europe Afrique, Moyen Orient	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	100	Chien? Rongeurs ? Lagomorphes ?
	<i>R. conorii indica</i>	Typhus indien à tique	Inde	<i>R. sanguineus</i>		
	<i>R. conorii israelensis</i>	Fièvre boutonneuse d'Israël	Israël	<i>R. sanguineus</i>	Oui	
	<i>R. conorii caspia</i>	Fièvre boutonneuse d'Astrakan	Astrakan Tchad	<i>R. sanguineus</i> <i>R. pumilio</i>	Oui	Chien? Hérisson
	<i>R. rickettsii</i>	Fièvre pourprée des montagnes rocheuses	États-Unis Amérique du Sud	<i>Dermacentor andersoni</i> <i>D. variabilis</i> <i>R. sanguineus</i> <i>Amblyomma cajennense</i> <i>A. aureolatum</i>	D.a. 100 D.v. 30-40	Chien? , Lapin, Campagnol, Rats, Écureuil, Opossum, Capybara
	<i>R. sibirica sibirica</i>	Typhus à tiques de Sibérie	Russie Chine	<i>Dermacentor nuttalli</i> <i>D. marginatus</i> <i>D. silvarum</i> <i>Haemaphysalis concinna</i>	D.n. 100	Rongeurs (<i>Microtus arvalis</i> <i>Lagurus lagurus</i>)
<i>R. sibirica mongolitimonae</i>	LAR (<i>Lymphangitis associated rickettsiosis</i>)	Asie, France, Afrique	<i>Hyalomma asiaticum</i> <i>H. truncatum</i>	Oui	Oiseaux migrateurs ?	

<i>R. australis</i>	Fièvre du Queensland	Australie	<i>Ixodes holocyclus</i> <i>I. tasmani</i>	Oui	Rongeurs (<i>Rattus fuscipes</i>) Australie
<i>R. japonica</i>	Fièvre boutonneuse japonnaise	Japon	<i>Ixodes ovatus</i> <i>Dermacentor taiwanensis</i> <i>H. longicornis</i> <i>H. flava</i>	Oui	Cerf Sika (<i>Cervus nippon</i>) au Japon ; Rongeurs (<i>Bandicota indica</i>) A Thaïlande
<i>R. africae</i>	Fièvre à tiques africaine	Afrique, Antilles	<i>A. hebraeum</i> <i>A. variegatum</i>	A.h. 100	
<i>R. honei</i>	Fièvre boutonneuse de l'Ile Flinders	Australie (Ile Flinders) Thaïlande États-Unis (Texas)	<i>Aponomma hydrosauri</i> <i>A. cajennense</i> <i>Ixodes granulatus</i>	Oui	
<i>R. slovaca</i>	TIBOLA (<i>Tick-borne lymphadenopathy</i>)	Europe Afrique du Nord	<i>Dermacentor marginatus</i> <i>D. reticulatus</i>	D.m. 100	
<i>R. heilongjiangensis</i>		Est de l'Asie	<i>D. silvarum</i>		
<i>R. aeschlimannii</i>	Fièvre boutonneuse	Maroc Afrique du Sud Corse, Espagne	<i>Hyalomma marginatum marginatum</i> <i>H. marginatum rufipes</i> <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	H.m.m. Oui	
<i>R. parkeri</i>	Fièvre boutonneuse	États-Unis Amérique du Sud	<i>A. maculatum</i> <i>A. americanum</i> <i>A. triste</i>		

	<i>R. massiliae</i>	Fièvre boutonneuse	Europe du Sud Afrique	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>R. turanicus</i> <i>R. muhsamae</i>	R.t. 100	
	<i>R. helvetica</i>	Fièvre non éruptive	Thaïlande, Japon France, Espagne, Italie Europe de l'Est	<i>Ixodes ricinus</i> <i>I. ovatus</i> <i>I. persulcatus</i> <i>I. monospinus</i>	I.r. 100	Cervidés (<i>Cervus Nippon yesaensis</i>)
	<i>R. raoultii</i>	SENLAT (<i>Scalp eschar and neck lymphadenopathy</i>)	Europe	<i>Dermacentor reticulatus</i> <i>D. marginatus</i>	D.m. 86-100	Chien?
	<i>R. monacensis</i>	Fièvre boutonneuse	Europe, États-Unis, Maroc, Algérie, Tunisie	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>		
	<i>R. honei</i> "marmionii"	Fièvre boutonneuse d'Australie	Australie	<i>H. novaguineae</i> <i>Ixodes holocyclus</i>		
	<i>R. akari</i>	Rickettsiose vésiculeuse	États-Unis Croatie, Slovaquie, Ukraine Afrique du Sud, Turquie	<i>Liponyssoides sanguineus</i> (acarien)	> 60	Écureuil coréen (<i>Microtus fortis pelliceus</i>)
Autres rickettsies	<i>R. felis</i>	Fièvre boutonneuse à puces	Ubiquitaire	<i>Ctenocephalides felis</i> , <i>C. canis</i> <i>Pulex irritans</i> , <i>Archeopsylla erinacei</i> <i>Xenopsylla cheopis</i>	2,5 - 63	Chat, Chien Rongeurs, Hérisson, Opossum

ANNEXE 02: Fiche de renseignements

Prélèvement N°:

Date du prélèvement :/...../.....

Localité du prélèvement : Fourrière canine, EL HARRACH.

- **Espèce:** Canine / féline
- **Race:**
- **Age:**
- **Sexe:**
- **Origine:** Indéterminée.

État de l'animal avant l'euthanasie :

- État général:.....
- Couleur des Muqueuses.....
- Examen dermatologique.....
- Autres anomalies cliniques

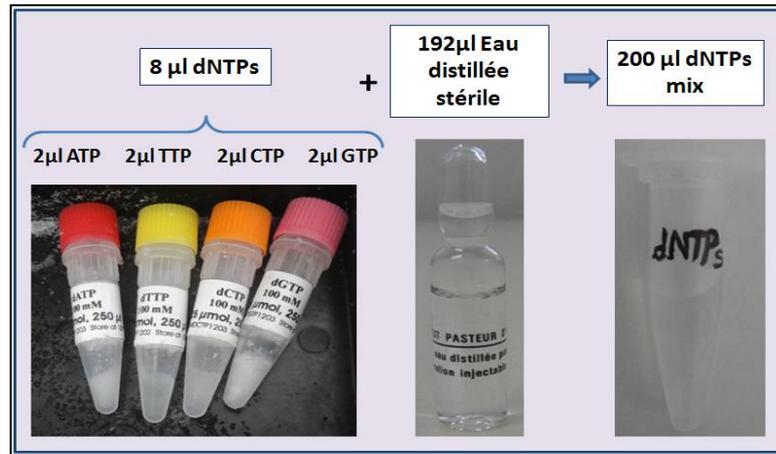
Présence d'ectoparasites :

OUI

NON

Si OUI, Quels ectoparasites :

ANNEXE 03: Préparation de la solution de dNTPs



ANNEXE 04: Formule du tampon de migration (Électrophorèse)

Préparation du tampon d'électrophorèse **TBE 5x** (Tris Borate EDTA), pour 1 litre :

- Peser 54 g de Tris-HCL et 27,5 g d'acide borique dans un bécher. Les dissoudre dans 800 ml d'eau déminéralisée puis mélanger très bien la solution à l'aide d'un agitateur magnétique
- Ajouter 20 ml d'EDTA (pH 8).
- Ajustez le volume final de 1000 ml avec de l'eau distillée. Mélangez très bien.

Il n'est pas nécessaire de stériliser la solution, le TBE peut être stocké à température ambiante pendant plusieurs mois.

Pour électrophorèse sur gel, le TBE 5x doit être dilué avant son utilisation à :

- **0.5 x TBE:** 100 ml de TBE 5x + 900 ml d'eau distillée.
- **1 x TBE:** 200 ml de TBE 5x + 800 ml d'eau distillée.

ANNEXE 05: Les informations relatives aux animaux prélevés

Variable/ Catégorie	Nombre de chiens testés	Nombre de chats testés
<u>Nombre Total</u>	117	107
<u>Sexe</u>		
Mâle	59 (50,42%)	58 (54,20%)
Femelle	58 (49,57%)	49 (45,79%)
<u>Age</u>		
≤ 1 an	56 (47,86%)	23 (21,49%)
> 1 an	61 (52,13%)	84 (78,50%)
<u>Race</u>		
Race mixte	104 (88,88%)	101 (94,39%)
Autres races	13 (11,11%)	6 (5,60%)
Races canines		
- Berger allemand	3 (2,56%)	-
- Berger croisé	8 (6,83%)	-
- American Staffordshire terrier	1 (0,85%)	-
- Pitbull croisé	1 (0,85%)	-
Races félines	-	4 (3,74%)
- Race européenne	-	2 (1,87%)
- Siamois croisé		
<u>Statut clinique</u>		
Sain	86 (73,50%)	99 (92,52%)
Malade	31 (26,49%)	8 (7,47%)
<u>Présence d'ectoparasites</u>		
OUI	72 (61,53%)	65 (60,74%)
NON	45 (38,46%)	42 (39,25%)
Infestation par des tiques	68 (58,12%)	11 (10,28%)
Infestation par des Puces	62 (55,99%)	65 (60,74%)
Infestation par des Poux	2 (1,71%)	4 (3,74%)
Association de deux ou trois types d'arthropodes	61 (52,13%)	18 (16,82%)

ANNEXE 06 : Les pathogènes détectés chez les chiens et les chats de la région d'Alger, tels que déterminés par la PCR quantitative et les informations relatives aux animaux positifs.

N° de l'Animal	Espèce animale	Age	Sexe	Race	Statut clinique	Présence d'ectoparasites	Résultats de qPCR
1	Canine	< 1 an	F	Race mixte	Sain	Tiques et puces	<i>E. canis</i>
2	Canine	30 mois	M	Race mixte	Sain	Tiques ^a et puces	<i>E. canis</i>
3	Canine	< 1 an	F	Race mixte	Sain	Tiques ^a et puces	<i>E. canis</i>
4	Canine	4 mois	M	Race mixte	Malade	Tiques, puces et poux	<i>E. canis</i>
5	Canine	8 ans	M	American Staffordshire terrier	Malade	Tiques et puces	<i>E. canis</i>
6	Canine	4 mois	M	Race mixte	Sain	Tiques ^b et puces	<i>E. canis</i>
7	Canine	7 mois	F	Berger allemand	Sain	Tiques ^c et puces	<i>E. canis</i>
8	Canine	1 an	M	Berger croisé	Malade	Tiques et puces	<i>E. canis</i>
9	Canine	18 mois	M	Race mixte	Sain	-	<i>E. canis</i>
10	Canine	< 1 an	F	Race mixte	Sain	Tiques ^b et puces	<i>E. canis</i>
11	Canine	-	F	Race mixte	Sain	-	<i>E. canis</i>
12	Canine	2 ans	M	Race mixte	Sain	-	<i>E. canis</i>
13	Canine	1 an	F	Race mixte	Sain	Tiques et puces	<i>E. canis</i>
14	Canine	-	F	Race mixte	Sain	-	<i>E. canis</i>
15	Canine	3 ans	M	Race mixte	Sain	-	Co-infection

							avec <i>E. canis</i> et <i>C. burnetii</i>
16	Canine	-	M	Race mixte	Sain	-	<i>E. canis</i>
17	Canine	-	F	Race mixte	Sain	-	<i>E. canis</i>
18	Canine	18 mois	M	Berger croisé	Sain	Tiques et puces	<i>B. henselae</i>
19	Féline	2 ans	M	Race mixte	Sain	-	<i>B. henselae</i>
20	Féline	< 1 an	M	Race mixte	Sain	-	<i>C. burnetii</i>

M = mâle; F = femelle.

^a *Rhipicephalus sanguineus* positives par qPCR à *E. canis* et *R. massiliae*.

^b *Rhipicephalus sanguineus* positives par qPCR à *E. canis*.

^c *Rhipicephalus sanguineus* positives par qPCR à *R. massiliae*.

**ANNEXE 09: Détection moléculaire des agents pathogènes sur des tiques
et des puces appartenant à des chats négatifs**

N° de chat	Ectoparasites	<i>R. felis</i>	<i>R. massiliae</i>	<i>B. henselae</i>	<i>B. clarridgeiae</i>
1	<i>Rh. sanguineus</i>	-	Pos	-	-
	<i>Ct. felis</i>	-	-	-	-
2	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-
3	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-
4	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-
5	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-
6	<i>Rh. sanguineus</i>	-	-	-	-
	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-
7	<i>Ct. canis</i>	-	-	-	-
	<i>Ct. felis</i>	Pos	-	-	-
8	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-
9	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-
10	<i>Ct. felis</i>	-	-	-	Pos
11	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-
12	<i>Ct. felis</i>	-	-	-	Pos
13	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-
	<i>Rh. sanguineus</i>	-	-	-	-
14	<i>Ct. felis</i>	-	-	-	Pos
15	<i>Ct. felis</i>	-	-	-	Pos
16	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-
17	<i>Ct. felis</i>	Pos	-	-	-
18	<i>Ct. felis</i>	-	-	Pos	-

Pos : positif par la qPCR ou par le séquençage d'ADN.

**ANNEXE 08: Détection moléculaire des agents pathogènes sur des tiques
et des puces appartenant à des chiens négatifs**

N° de chien	Ectoparasites	<i>R. massiliae</i>	<i>R. conorii</i>	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>Berkhoffii</i>
1	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
2	<i>X. cheopis</i>			Pos
	<i>Ct. canis</i>			
3	<i>Rh. sanguineus</i>		Pos	
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>X. cheopis</i>			Pos
4	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Ct. canis</i>			
	<i>X. cheopis</i>			
	<i>X. cheopis</i>			
5	<i>Rh. sanguineus</i>			
	<i>Ct. canis</i>			
	<i>X. cheopis</i>			Pos
6	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Rh. sanguineus</i>			
	<i>X. cheopis</i>			
	<i>Ct. canis</i>			
7	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Ct. canis</i>			
	<i>X. cheopis</i>			
8	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>X. cheopis</i>			
	<i>Ct. felis</i>			
9	<i>Ct. canis</i>			
	<i>X. cheopis</i>			Pos
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Ct. felis</i>			
10	<i>X. cheopis</i>			
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Ct. canis</i>			
11	<i>Ct. felis</i>			
	<i>X. cheopis</i>			
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Ct. canis</i>			
12	<i>X. cheopis</i>			Pos
	<i>Ct. canis</i>			
	<i>Rh. sanguineus</i>			

13	<i>X. cheopis</i>			
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
14	<i>X. cheopis</i>			
	<i>Ct. felis</i>			
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
15	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Rh. sanguineus</i>			
	<i>X. cheopis</i>			
16	<i>Ct. felis</i>			
	<i>X. cheopis</i>			
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
17	<i>X. cheopis</i>			
	<i>Ct. canis</i>			
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Ct. felis</i>			
18	<i>Ct. canis</i>			
	<i>X. cheopis</i>			
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
19	<i>X. cheopis</i>			
	<i>Ct. felis</i>			
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
20	<i>X. cheopis</i>			Pos
	<i>Ct. canis</i>			
	<i>Ct. felis</i>			
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
21	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Rh. sanguineus</i>			
	<i>Ct. felis</i>			
	<i>X. cheopis</i>			
22	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos		
	<i>Rh. sanguineus</i>			
	<i>Ct. felis</i>			

**ANNEXE 07: Détection moléculaire des agents pathogènes sur des tiques
et des puces appartenant à des chiens positifs**

N° de chien	Ectoparasites	<i>R. massilae</i>	<i>E. canis</i>
1 (positif à <i>E. canis</i>)	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos	
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos	Pos
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos	Pos
	<i>Ct. canis</i>		
	<i>X. cheopis</i>		
2 (positif à <i>E. canis</i>)	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos	
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos	Pos
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos	Pos
	<i>Ct. canis</i>		
	<i>Ct. felis</i>		
	<i>X. cheopis</i>		
	<i>X. cheopis</i>		
3 (positif à <i>E. canis</i>)	<i>Rh. sanguineus</i>		
	<i>Rh. sanguineus</i>		
	<i>Rh. sanguineus</i>		
	<i>Rh. sanguineus</i>		Pos
	<i>Rh. sanguineus</i>		Pos
	<i>Ct. felis</i>		
	<i>Ct. canis</i>		
	<i>X. cheopis</i>		
4 (positif à <i>E. canis</i>)	<i>Rh. sanguineus</i>		
	<i>Rh. sanguineus</i>	Pos	
	<i>Rh. sanguineus</i>		
	<i>X. cheopis</i>		
	<i>Ct. felis</i>		
	<i>Ct. canis</i>		
	<i>Ct. canis</i>		
5 (positif à <i>E. canis</i>)	<i>Rh. sanguineus</i>		Pos
	<i>Rh. sanguineus</i>		
	<i>Rh. sanguineus</i>		Pos
	<i>Ct. felis</i>		
	<i>Ct. canis</i>		