

Année 2008

**ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE ÉQUINE :
ENQUÊTE SERO-ÉPIDÉMIOLOGIQUE
DANS LE SUD-EST DE LA FRANCE EN 2007.**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRETEIL

le.....

par

Bérénice TILLIETTE

Né (e) le 26 août 1984 à Ivry sur Seine (Val de Marne)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Pr. Boulouis HJ,

Professeur à l'ENVA

Assesseur : Dr. Pradier Sophie,

Maître de conférences à l'ENVA

ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE EQUINE : ENQUETE SERO-EPIDEMIOLOGIQUE DANS LE SUD-EST DE LA FRANCE EN 2007.

NOM et Prénom : TILLIETTE Bérénice

Résumé :

L'anaplasmose granulocytaire équine est une maladie infectieuse, non contagieuse, due à la bactérie *Anaplasma phagocytophilum* et transmise par les tiques *Ixodes spp.* Chez le cheval, le tableau clinique de la maladie est généralement celui d'un syndrome fébrile avec peu de symptômes spécifiques.

Anaplasma phagocytophilum est une bactérie à la pathogénie unique. Intracellulaire stricte, elle infecte les granulocytes neutrophiles de nombreux mammifères, dont l'homme. Ce travail s'intéresse donc, dans la synthèse bibliographique, aux mécanismes dont la bactérie dispose pour se développer chez son hôte.

De plus, nous avons réalisé pour l'année 2007 une enquête séro-épidémiologique qui repose sur la constitution d'un échantillon de 643 chevaux vivant dans le Sud-est de la France (Gard, Hérault, Bouches du Rhône). L'analyse sérologique par IFI de ces 643 sérums montre une prévalence pour l'anaplasmose équine de: - 8,6% (IC_{95%} : 7,5 – 9,7) à l'échelle des chevaux
- 39,3 % (IC_{95%} : 34-45%) à l'échelle des écuries.

Par ailleurs, une enquête équivalente avait déjà été menée en 2001 (Pradier, 2001). La comparaison des résultats obtenus pour 42 écuries communes à 2001 et 2007 montre une augmentation importante du nombre d'écuries positives en 2007. Ainsi, il semblerait que l'anaplasmose granulocytaire équine soit une maladie émergente dans la Sud-est de la France.

Mots clés :

ANAPLASMOSE	ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM	EHRlichia
TIQUE	IMMUNOFLOUORESCENCE INDIRECTE	SEROLOGIE
EQUIDE	ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE	CHEVAL
CAMARGUE		

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr. Boulouis

Assesseur : Dr. Pradier

Adresse de l'auteur :

Mlle Bérénice Tilliette

74 rue Diderot, 94300 Vincennes

EQUINE GRANULOCYTIC ANAPLASMOSIS : EPIDEMIOLOGICAL SURVEY IN THE SOUTH-EAST OF FRANCE IN 2007

SURNAME and Given name: TILLIETTE Bérénice

Summary:

Equine granulocytic anaplasmosis is a tick-borne infectious disease caused by the bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. Infected horses present a febrile syndrome with few specific symptoms.

Anaplasma phagocytophilum is a unique intracellular bacterium that colonizes polymorphonuclear leucocytes (neutrophils) of different animal species, including human one's. A part of this work focuses on some of the mechanisms that the bacterium uses for disseminating in his host cells.

Moreover, we have done an epidemiological survey on 643 horses living in the South-East of France (Gard, Hérault, Bouches du Rhône). By immunofluorescence assay analysis of these sera we found a prevalence of equine granulocytic ehrlichiosis of:

- 8,6% (IC_{95%} : 7,5 – 9,7) for horses,
- 39,3 % (IC_{95%} : 34-45%).for stables.

Furthermore, an equivalent study has already been done in 2001 (Pradier, 2001). Comparison of results obtained for 42 common stables along the years 2001 and 2007 shew an impressive increase of positive stables in 2007. In this way, equine granulocytic anaplasmosis could be an emergent disease in South-East of France.

Keywords :

ANAPLASMOSIS	ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM	EHRLICHIA
TICK	IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY	SEROLOGY
EQUIDAE	EPIDEMIOLOGICAL SURVEY	HORSE
CAMARGUE		

Jury :

President : Pr.

Director : Pr. Boulouis HJ.

Assessor : Dr. Pradier S.

Author's address:

Mlle Tilliette Bérénice

74 rue Diderot, 94300 Vincennes

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, CLERC Bernard

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSE Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henry, Maître de conférences - UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences - UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISSE Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences - UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences - DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur	- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences - UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences - DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur - UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences* - UNITE DE BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* - DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Professeur certifié
---	---

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Maître de conférences

- UNITE DE MEDECINE M. POUCHOLON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences - UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel - UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP) - DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS Mme Françoise ROUX, Maître de conférences contractuel	- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY-PLUMIOEN Béangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel - UNITE D'IMAGERIE MEDICALE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel - DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel - UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel Mme HALOS Lénaïg, Maître de conférences M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier - DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur M. GRANDJEAN Dominique, Professeur
---	---

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences

- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences - UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences - DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences	- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences* - UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences
---	---

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Président du jury,
Professeur à la faculté de Médecine de Créteil,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Henri-Jean Boulouis,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter et de diriger ce travail,
Pour ces heures à regarder des lames « qui font mal aux yeux »,
Pour votre sagesse, votre savoir et votre tranquillité rassurante.
Que vous trouviez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Mademoiselle le Docteur Sophie Pradier,
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Qui m'a proposé ce sujet enrichissant,
Pour tout le travail fourni en amont et en aval,
Pour votre professionnalisme et votre gentillesse,
Toute ma considération et ma gratitude.

A Madame la Professeur Agnès Leblond,
Pour son aide précieuse et sa maîtrise d'excel,
Pour m'avoir fait découvrir l'épidémiologie.

A Christelle Gandouin,
Pour m'avoir aidée et supportée au laboratoire,
Patience, une promotion est méritée.

*A mon père, ma mère, mes frères, ma famille : vous êtes ma patrie !
Pour être ce que vous êtes et avoir fait ce que je suis...
Par ce que même loin, vous êtes près... et jamais las !
A chacun de mes pas je vous sais avec moi,
Sans vous je n'avancerais pas !*

*A ma deuxième famille : Bayard, l'équit', le chewal, tout ça !
Depuis l'âge de 5 ans,
En moyenne 2 fois par semaine, 52 semaines par an,
Ca fait 1976 jours où je ne me suis pas passé de toi...
Passion de toujours, métier à jamais,
Sans cette fratrie et ses équidés je ne pourrais plus respirer !*

*A ma blondie trop chou,
Les blondes se sera toujours nous,
Ma coloc de tente, ma doublure, mon groom, ma blondie,
Sans toi je ne serais pas en vie !*

*Aux copains du lycée,
A nos vacances, nos instants, nos souvenir,
Ils m'ont vu chanter, boire, rire, pleurer,
Ils ont su m'aimer et me soutenir,
Sans eux je ne saurais pas ce qu'est « grandir » !*

*Aux « filles de la fac »,
Canada, Paris ou ailleurs,
Vous serez toujours dans mon cœur,
Sans vous, percé serait le panier, vide serait le sac !*

*Aux moules d'Alfort,
Mes mollusques préférés,
Aux urgences, au grisby, aux têtards, aux soirées filles et tous ces moments forts...
Sans vous je n'aurais jamais résisté !*

*Aux copains d'ici et d'ailleurs,
Dont certains parmi les meilleurs,
Vous m'avez ouvert l'esprit,
Sans vous je ne serais pas si épanouie !*

*A tous les pti'chevaux,
Pour m'avoir si souvent prêté leur dos,
Vous me donnez des ailes,
Sans vous je ne saurais pas ce qu'est reculer et « droit c'est droit ! b.... »*

*A mes n'animaux préférés,
Présents, futurs et passés,
Sans vous tout serait « calculé »*

*A mon amoureux,
Par ce qu'ensemble on est heureux,
On visite le monde,
Chaque jour, chaque seconde,
Tes bras sont synonymes d'évasion,
Sans toi je ne pourrais pas dire : « Nous nous aimons » !*

*Par ce qu'avancer, respirer, vivre, grandir, combler le panier, résister,
m'épanouir, aller droit, ne pas calculer, aimer, ...
Sont mes priorités,
Je ne saurais jamais assez vous remercier !*

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
TABLE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEUX.....	6
INTRODUCTION	7
 PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE EQUINE	 8
I. GENERALITES.....	9
A) L'ANAPLASMOSE	9
B) UNE HISTOIRE RECENTE ET MOUVEMENTEE	9
C) UNE BACTERIE COSMOPOLITE	10
D) HOTES ET RESERVOIRS.....	10
1) <i>Espèces atteintes</i>	10
2) <i>Réservoir et dissémination de la bactérie</i>	11
E) VECTEURS : LES TIQUES DU GENRE <i>IXODES</i>	12
1) <i>Des vecteurs différents selon la localisation géographique</i>	12
2) <i>A vecteurs différents, compétences vectorielles différentes</i>	13
3) <i>Anaplasma phagocytophilum chez son vecteur</i>	13
4) <i>Transmission d'Anaplasma phagocytophilum de l'animal au vecteur</i>	14
II. UNE BACTERIE UNIQUE.....	15
A) CARACTERES BACTERIOLOGIQUES D' <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i>	15
B) STRUCTURE EXTERNE	16
C) UNE CLASSIFICATION REVUE ET CORRIGEE, MAIS... DISCUTEE !	18
D) OUTILS DE CLASSIFICATION ET D'IDENTIFICATION DES SOUCHES	22
1) <i>Utilisation des MLVA pour faciliter l'identification des souches</i>	22
2) <i>Utilisation d'anticorps monoclonaux pour caractériser un lien épidémiologique</i>	23
III. A BACTERIE UNIQUE, PATHOGENIE UNIQUE	24
A) UNE BACTERIE INTRACELLULAIRE STRICTE : ADHESION A LA CELLULE	24
B) ECHAPPEMENT A LA PHAGOCYTOSE ET AUX VOIES DE DESTRUCTION DES NEUTROPHILES	25
1) <i>Anaplasma phagocytophilum se développe dans des vacuoles qui ne fusionnent pas avec les lysosomes</i>	25
2) <i>Anaplasma phagocytophilum inhibe la production de O₂⁻</i>	27
C) <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i> RETARDE L' APOPTOSE DES NEUTROPHILES	27
D) <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i> EXPLOITE LE CHIMIOTACTISME DES NEUTROPHILES	28
E) <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i> POSSEDE UNE PROTEINE (ANKA) CAPABLE D'ENTRER DANS LE NOYAU DES NEUTROPHILES	29
F) <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i> POURRAIT PENETRER DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES DE LA MICROVASCULARISATION	29
G) LESIONS HEPATIQUES : UNE DES CONSEQUENCES DE LA PHYSIOPATHOLOGIE D' <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i>	30
H) EN RESUME.....	31
IV. ETUDE CLINIQUE CHEZ LE CHEVAL	32
A) SYMPTOMES	32
B) ELEMENTS NECROPSIQUES ET HISTOLOGIQUES	32
C) SIGNES BIOLOGIQUES :	33
1) <i>Variations hématologiques</i>	33
2) <i>Variations biochimiques</i>	33
D) TRAITEMENT.....	33
E) PRONOSTIC.....	35
F) MIEUX VAUT PREVENIR QUE GUERIR... ENCORE FAUT-IL POUVOIR LE FAIRE.....	35

V. DIAGNOSTIC DE L'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE EQUINE	36
A) DIAGNOSTIC EPIDEMIO-CLINIQUE	36
1) Incidence saisonnière	36
2) Eléments symptomatiques	36
3) Signes biologiques : variations hématologiques.....	36
B) DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL.....	37
1) Diagnostic différentiel du syndrome « piro-like »	37
2) Diagnostic différentiel des symptômes nerveux	40
C) DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE	40
1) Frottis sanguin.....	40
2) Culture.....	41
3) Sérologie.....	42
4) PCR.....	45
D) CONCLUSION	48
VI. EXEMPLE D'ETUDE CLINIQUE ET DIAGNOSTIQUE	50
A) ELEMENTS SYMPTOMATIQUES	50
B) SIGNES BIOLOGIQUES	50
C) FROTTIS SANGUIN	50
D) PCR.....	51
E) SEROLOGIE.....	51
F) CONCLUSION	51
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	53
I. MATERIEL ET METHODES.....	54
A) SELECTION DE L'ECHANTILLON DE CHEVAUX.....	54
1) Zone géographique retenue	54
2) Population source	55
3) Sélection des écuries et des chevaux.....	55
B) SAISIE DES DONNEES ET ANALYSE STATISTIQUE	55
II. ANALYSES DE LABORATOIRE.....	56
A) COLLECTE DES SERUMS, ACHEMINEMENT ET STOCKAGE	56
B) ANALYSES SEROLOGIQUES.....	56
1) Immunofluorescence Indirecte : criblage	56
2) Lecture des lames.....	57
3) Immunofluorescence indirecte : dilution et détermination du taux d'anticorps :.....	58
TROISIEME PARTIE : RESULTATS	59
I. DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON.....	60
A) DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON DE CHEVAUX	60
1) Races.....	60
2) Type d'activité	61
3) Sexe.....	62
4) Age des chevaux.....	64
B) DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON D'ECURIES	65
1) Activité des écuries	65
2) Nombre moyen de chevaux prélevés par écurie.....	66
II. RESULTAT DES SEROLOGIES ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM.....	68
A) SEROPREVALENCE AU SEIN DE L'ENSEMBLE DE LA POPULATION EQUINE.....	68
B) SEROPREVALENCE DES ECURIES	69
III. FACTEURS DE RISQUE	71
A) A L'ECHELLE DES CHEVAUX	71
B) A L'ECHELLE DES ECURIES.....	71

IV. COMPARAISON 2001-2007	72
A) ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE EQUINE : MALADIE EMERGENTE EN CAMARGUE ?	72
B) RELATION ENTRE LE STATUT SEROLOGIQUE DES ECURIES EN 2001 ET 2007	73
C) CARTE 2007 ET COMPARAISON AVEC 2001	73
V. L'ANAPLASMOSE S'EXPRIME T-ELLE MAJORITAIREMENT DE MANIERE SUBCLINIQUE ?	76
 QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION.....	78
I. PROTOCOLE	79
A) PERIODE DE COLLECTE	79
1) <i>Collecte sur 3 mois</i>	79
2) <i>La période de prélèvement</i>	79
B) ÉCHANTILLON PRELEVE	79
C) CARACTERISTIQUES DE L'ÉCHANTILLON RELATIVES A LA ZONE D'ETUDE	80
1) <i>Prédominance des chevaux Camarguais</i>	80
2) <i>Activité des chevaux</i>	81
D) METHODE DIAGNOSTIQUE EMPLOYEE.....	82
II. RESULTATS	83
A) SEROPREVALENCE OBTENUE CHEZ LES CHEVAUX.....	83
B) SEROPREVALENCE OBTENUE POUR LES ECURIES	84
C) FACTEURS DE RISQUE.....	85
D) COMPARAISON 2001-2007	85
1) <i>ELISA versus IFI</i>	85
2) <i>Si l'IFI et l'ELISA sont des tests sérologiques équivalents</i>	85
E) INFECTION PRESENTE MAIS... INAPPARENTE !	87
CONCLUSION	88
BIBLIOGRAPHIE	89

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Oiseau et chevreuil porteurs de nombreuses tiques.....	11
Figure 2 : Cycle de développement d'une tique	12
Figure 3 : Mâle et femelle adultes d'Ixodes.....	13
Figure 4 : Morulas d' <i>Anaplasma phagocytophilum</i> visibles dans le cytoplasme de cellules HL-60 en culture	15
Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes de pénétration et de développement d' <i>Anaplasma phagocytophilum</i> dans le neutrophile.....	26
Figure 6 : Suivi de paramètres diagnostiques d'anaplasmose équine après inoculation	52
Figure 7 : Suivi d'éléments diagnostiques et symptomatiques d'anaplasmose équine après inoculation.....	52
Figure 8 : Carte de la Camargue	54
Figure 9 : Image d'IFI, présence de nombreuses morulas	58
Figure 10 : Distribution des races des 643 chevaux prélevés en 2007	60
Figure 11 : Pourcentage des chevaux par catégorie d'activité.....	61
Figure 12 : Pourcentage de chevaux de chaque race selon l'activité.....	62
Figure 13 : Pourcentage des chevaux de chaque sexe	63
Figure 14 : Proportion des différents sexes dans chaque race	63
Figure 15 : Répartition des sexes selon le type d'activité.....	64
Figure 16 : Pourcentage de chevaux par catégorie d'âge.....	65
Figure 17 : Pourcentage de chaque catégorie d'écurie	66
Figure 18 : Pourcentage de chevaux prélevés par écurie	67
Figure 19 : Répartition des chevaux séropositifs en fonction de leur titre en anticorps.....	68
Figure 20 : Répartition des écuries selon le pourcentage de chevaux prélevés séropositifs.....	69
Figure 21 : Répartition des écuries positives en fonction de la proportion de chevaux séropositifs qu'elles contiennent	70

Figure 22 : Statut sérologique des écuries en fonction du pourcentage de chevaux prélevés	71
Figure 23 : Répartition des écuries en fonction de leur statut en anaplasmoses en 2001 et 2007.....	72
Figure 24 : Répartition géographique des écuries ayant fait l'objet de prélèvements dans la zone d'étude en 2007, selon leur statut sérologique.....	73
Figure 25 : Répartition géographique des écuries ayant fait l'objet de prélèvements dans la zone d'étude en 2001, selon leur statut sérologique.....	74
Figure 26 : Carte de séroprévalence de 2007 des écuries communes à 2001 et 2007	75
Figure 27 : Carte de séroprévalence de 2001 des écuries communes à 2001 et 2007	75
Figure 29 : Chevaux et bovins camarguais	80
Figure 28 : Abrivade à Arles.....	81
Figure 30 : Répartition d' <i>Ixodes ricinus</i> en Europe.....	84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des Ehrlichiae	20
Tableau 2 : Diagnostic différentiel du syndrome « piro-like »	39
Tableau 3 : IFI versus ELISA	43
Tableau 4 : Titre en anticorps anti-P44 d' <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	43
Tableau 5 : Détection d'ADN d' <i>Anaplasma phagocytophilum</i> et d'anticorps spécifiques de P44 recombinante dans des sérums issus de chevaux malades du Connecticut et de New York	44
Tableau 6 : Répartition des chevaux selon leur race.....	60
Tableau 7 : Répartition des chevaux selon leur activité.....	61
Tableau 8 : Proportion de chevaux de chaque sexe	62
Tableau 9 : Répartition des chevaux selon leur âge.....	64
Tableau 10 : Répartition des écuries par catégorie d'activité	65
Tableau 11 : Nombre de chevaux prélevés selon l'activité de l'écurie	66
Tableau 12 : Proportion de chevaux prélevés par écurie	67
Tableau 13 : Résultats des sérologies sur l'ensemble des chevaux	68
Tableau 14 : Résultats des écuries	69
Tableau 15 : Statut vis-à-vis de l'anaplasmose des écuries communes en 2001 et 2007	72
Tableau 16a et 16b : Maladies contractées par les chevaux et entrant dans le diagnostic différentiel de l'anaplasmose en fonction du statut sérologique.....	76

INTRODUCTION

L' anaplasmosse granulocytaire équine est une maladie infectieuse transmise par les tiques dont l'agent pathogène est une bactérie intracellulaire stricte : *Anaplasma phagocytophilum*. Zoonose émergente présente sur tous les continents et atteignant de nombreuses espèces de mammifères, elle est l'objet de nombreuses recherches.

Cette thèse s'est déroulée dans le contexte d'un projet de recherche débuté en 2001 sur l'anaplasmosse granulocytaire équine en Camargue. Ce projet a déjà permis de constituer un réseau de surveillance et d'identifier des cas cliniques. Par ailleurs, des enquêtes de terrain réalisées en parallèle doivent permettre de préciser le statut émergent ou non de cette maladie et d'identifier les vecteurs potentiels de l'infection en Camargue.

Ce projet s'inscrit dans l'objectif global de sécuriser la filière équine. Une meilleure connaissance de l'épidémiologie des affections à incidence socio-économique lourde et une amélioration de leur prévention y contribuent. L'intérêt économique du projet est de fournir à la filière équine des outils et méthodes de surveillance et d'alerte précoce des maladies infectieuses.

Au sein de ce projet, cette thèse a pour but d'estimer la séroprévalence de l'anaplasmosse granulocytaire équine dans le Sud-est de la France en 2007 et de la comparer à la séroprévalence et à la distribution géographique des agrégats de séropositifs obtenus par Pradier en 2001 (Pradier, 2003 ; Leblond *et al.*, 2005a).

Nous débuterons notre travail par une synthèse bibliographique en suivant le plan classique de description d'une maladie et en s'intéressant particulièrement à la pathogénie d'*Anaplasma phagocytophilum*. Puis, nous décrirons l'étude de séroprévalence conduite en 2007 sur la population de chevaux de 3 départements du Sud-Est de la France : le Gard (30), l'Hérault (34) et les Bouches du Rhône (13). Enfin, nous comparerons les résultats sérologiques obtenus en 2007 à ceux de 2001 (Pradier, 2003).

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE
L'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE EQUINE

I. GENERALITES

A) L'anaplasmose

L'anaplasmose est une maladie infectieuse due à une bactérie nommée *Anaplasma phagocytophilum*. Cette maladie, transmise par les tiques du genre *Ixodes*, touche de nombreuses espèces de mammifères, dont l'homme.

Bien que l'agent responsable soit toujours le même, elle porte différents noms selon l'espèce atteinte :

- anaplasmose granulocytaire équine chez le cheval,
- anaplasmose granulocytaire humaine (AGH) chez l'homme,
- anaplasmose granulocytaire bovine, fièvre des pâturages ou maladie des gros pâturons chez les bovins,
- anaplasmose granulocytaire ovine, fièvre-à-tiques ou *Bela Joar* chez les moutons.

De plus, la révision de la classification de cette bactérie étant récente (Dumler *et al.*, 2001), de nombreux auteurs utilisent encore le nom d'ehrlichiose plutôt que d'anaplasmose. Ainsi, ils parlent d'Ehrlichiose Granulocytaire Humaine (EGH) ou d'ehrlichiose granulocytaire équine.

B) Une histoire récente et mouvementée

Anaplasma phagocytophilum a été isolé pour la première fois chez une tique, *Ixodes ricinus*, en 1932, puis décrite, en 1949, par Foggie sous la dénomination de « *Rickettsia phagocytophila ovis* ». Après plusieurs modifications de nomenclature, Philip place cette bactérie dans le genre *Ehrlichia* et le nom de *Ehrlichia phagocytophila* est retenu dans les « Approved Lists of Bacterial Names ».

Ce n'est qu'en 1969 que l'anaplasmose est décrite chez un cheval par Gribble, en Californie. La présence de morulas est mise en évidence dans les granulocytes neutrophiles d'un frottis sanguin de cheval atteint, ce qui donne le nom d'ehrlichiose granulocytaire équine à la maladie. Gribble constate à l'époque que les symptômes sont observés au printemps et en automne.

En 1975, Lewis *et al.* baptisent cette bactérie *Ehrlichia equi*, mais il faut attendre 1988 pour que cette nomenclature soit valablement publiée par une inscription sur la liste de validation n°25 des « Approved Lists of Bacterial Names ».

La maladie a été identifiée tardivement chez l'homme. Ce n'est qu'en 1994 que le premier cas d'Ehrlichiose Granulocytaire Humaine (EGH) fut confirmé, suite à l'examen d'un frottis splénique montrant des morulas, chez un patient mort dans un état de détresse respiratoire (Chen *et al.*, 1994).

Différentes études (dont celles de Weisburg *et al.*, 1991, et de Sumner *et al.*, 1997) révèlent qu'en réalité *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* et l'agent de l'EGH sont très ressemblants sur le plan génétique. En 2001, une étude de Dumler *et al.* propose de regrouper ces trois espèces en

une seule, dénommée *Anaplasma phagocytophilum*. L'intérêt pour cette ehrlichiose ne se limite alors plus seulement à la médecine vétérinaire, mais aussi largement à la médecine humaine.

Les ehrlichioses sont aujourd'hui considérées comme des maladies infectieuses émergentes (Walker et Dumler, 1997), l'anaplasmose étant la zoonose transmise par les tiques la plus répandue dans le monde (Dumler, 2005).

C) Une bactérie cosmopolite

Bien que la bactérie soit présente sur tous les continents, elle est surtout retrouvée dans l'hémisphère Nord.

L'anaplasmose a été découverte aux Etats-Unis et plus particulièrement dans le nord de la Californie (Gribble, 1969). Depuis elle a été décrite dans de nombreux états américains, chez plusieurs espèces. Dans les régions endémiques des Etats-Unis, c'est-à-dire principalement au nord-est et au nord de la Californie, l'Anaplasmose Granulocytaire Humaine a une incidence annuelle de 2.3 à 16.1 pour mille (McQuiston *et al.*, 1999). Le Canada est touché lui aussi.

Elle est retrouvée également en Europe avec une large distribution dans le Nord-Ouest et l'Est du continent, dans de nombreux pays comme : la France, l'Allemagne, le Royaume-Uni, la Suisse, le Danemark, la Suède, la Norvège, la Slovénie... (Brouqui, 1999).

En Asie, la bactérie a été identifiée chez les tiques, au Vietnam, en Thaïlande (Parola *et al.*, 2003), en Chine chez *Ixodes persulcatus* (Cao *et al.*, 2006), en Corée chez *Hemaphysalis longicornis* (Kim *et al.*, 2003) et au Japon (Ohashi *et al.*, 2005 ; Kawahara *et al.*, 2006).

Quelques cas sont rapportés dans l'hémisphère Sud, en Israël et au Brésil (Levi *et al.*, 2006 ; Madigan et Pusterla, 2000).

D) Hôtes et réservoirs

1) *Espèces atteintes*

A. phagocytophilum a de nombreux hôtes (Dumler, 2005) dont :

- des hôtes sauvages : rongeurs, ruminants, ours et lamas,
- des hôtes domestiques : chevaux, ovins, caprins, bovins, chiens,
- ainsi que les hommes.

Les lapins, les oiseaux et les chats sauvages sont également impliqués dans l'épidémiologie de l'anaplasmose (Bjoersdorff *et al.* 1999, 2001 ; Daniels *et al.* 2002 ; Goethert et Telford 2003 ; Lappin *et al.* 2004). Les oiseaux (Figure 1), et plus particulièrement les oiseaux migrateurs, pourraient jouer un rôle de véhicule pour les tiques infectées (Alekseev *et al.*, 2001 ; Bjoersdorff *et al.*, 2001).

Il convient de souligner que cette maladie est une zoonose classée « mineure » par l'InVS (Institut de Veille Sanitaire Français).

Figure 1 : Oiseau et chevreuil porteurs de nombreuses tiques



(George 2008)

2) Réservoir et dissémination de la bactérie

Il a été montré que plusieurs espèces dont le rat (Foley *et al.*, 2002), le mouton, le chevreuil, le bovin (Stuen *et al.* 2006), et le chien (Egenvall *et al.*, 2000), peuvent être infectées de façon chronique, et pourraient constituer des réservoirs pour la bactérie. Les moutons peuvent être porteurs jusqu'à 25 mois après la rémission des symptômes, et le sang reste infectieux (Rikihisa, 1991).

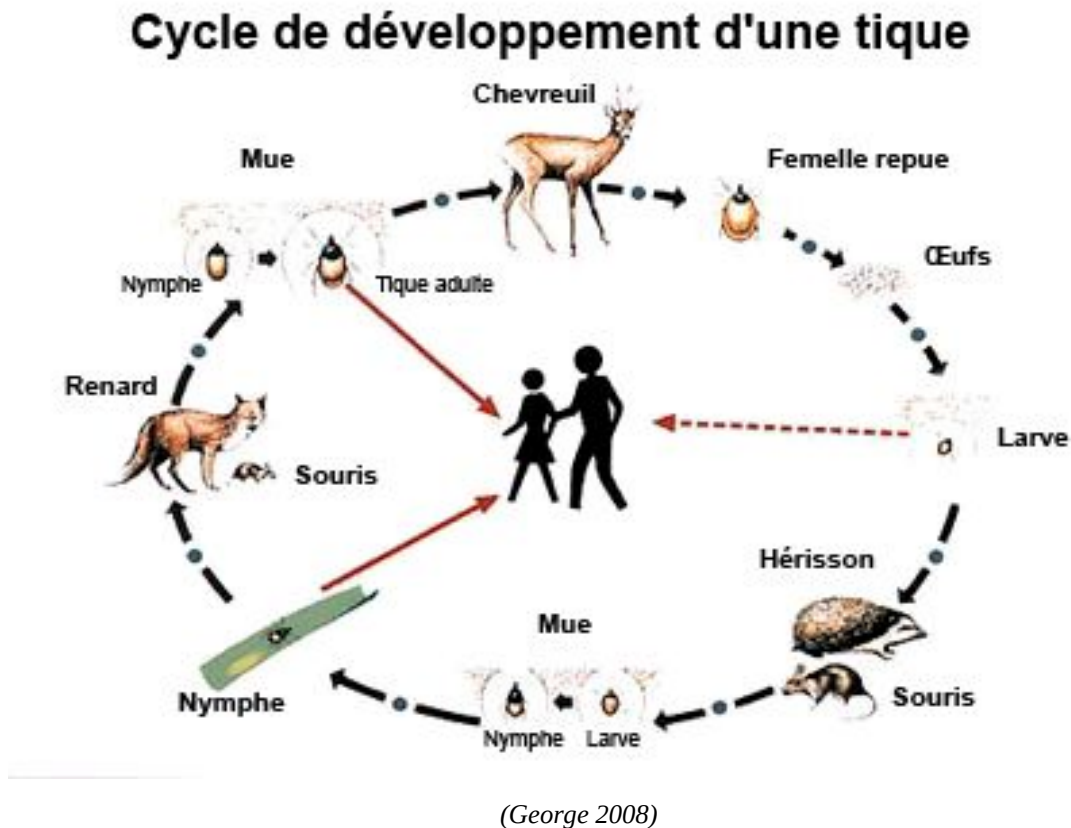
Le cheval, qui peut également être infecté de manière persistante (Franzen *et al.*, 2005), et l'homme, seraient des « impasses » épidémiologiques.

Par ailleurs, les petits mammifères sauvages sont des hôtes de prédilection pour les stades immatures de tiques (en particulier *Ixodes scapularis* aux Etats-Unis et *Ixodes ricinus* en Europe). Ils représentent donc des réservoirs naturels potentiels pour *Anaplasma phagocytophilum*. Ainsi, en Europe, le principal réservoir est le campagnol - *Clethrionomys glareolus* - (Brouqui 1999 ; Liz *et al.*, 2000), mais *Anaplasma phagocytophilum* a aussi été retrouvé chez d'autres petits rongeurs, *Apodemus flavicollis* et *Sorex araneus*, en Suisse (Liz *et al.*, 2000 ; Ogden *et al.*, 1998).

Aux Etats-Unis, le principal réservoir sauvage est la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) (Dumler et Bakken., 1998, Ogden *et al.*, 1998a). Les rats laveurs (*Procyon lotor*) et les écureuils gris (*Sciurus carolinensis*) (Telford *et al.* 1996, Levin *et al.* 2002) sauvages sont aussi porteurs de la bactérie.

Aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis, les cervidés sont également des réservoirs sauvages de la bactérie (De La Fuente *et al.*, 2004b; Liz *et al.*, 2002 ; Oporto *et al.*, 2003). Des PCR positives pour *Anaplasma phagocytophilum*, retrouvées par Magnarelli *et al.* (1999b) sur des bovins, coïncident avec la détection d'ADN de la bactérie chez les Cerfs (*Odocoileus virginianus*), en automne (Figure 2).

Figure 2 :



E) Vecteurs : les tiques du genre *Ixodes*

1) Des vecteurs différents selon la localisation géographique

En Europe du Nord, la tique dure *Ixodes ricinus* est considérée comme le vecteur le plus important d'*Anaplasma phagocytophilum* (Figure 3). Cependant la présence de la bactérie dans des régions où *Ixodes ricinus* n'est pas retrouvée suggère qu'il y a certainement d'autres vecteurs compétents (Bown *et al.*, 2003). La bactérie a été retrouvée chez une tique dure *I. trianguliceps* au Royaume-Uni (Ogden *et al.*, 1998b ; Joncour, 2003).

En Europe du Sud, *Anaplasma phagocytophilum* est majoritairement transmis par *Ixodes persulcatus*, car il y a peu d'*Ixodes ricinus*. On peut penser que d'autres tiques comme *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa* et différentes espèces d'*Ixodes* sont probablement des vecteurs de la bactérie dans les régions où il y a peu d'*Ixodes* spp. (de la Fuente *et al.* 2005a).

Aux Etats-Unis, des études ont montré la responsabilité d'*Ixodes scapularis* et d'*Ixodes pacificus* comme vecteurs importants de la bactérie, respectivement à l'Est et à l'Ouest du continent (Richter *et al.*, 1996 ; Telford *et al.*, 1996).

En Asie de l'Est, *Anaplasma phagocytophilum* a été détecté chez *I. persulcatus* et *I. ovatus* (Cao *et al.*, 2006, Ohashi *et al.*, 2005).

Ainsi, on constate aujourd'hui que les vecteurs sont relativement variables d'un continent à l'autre, ce qui semble montrer une certaine adaptabilité de la bactérie et permettrait d'expliquer en partie son émergence dans de nombreux pays.

Figure 3 : Mâle et femelle adultes d'*Ixodes*



(George, 2008)

2) A vecteurs différents, compétences vectorielles différentes (étude de Teglas et Foley, 2006) :

I. pacificus, tique prédominante à l'Ouest des Etats-Unis, a montré une compétence vectorielle significativement plus élevée pour la transmission d' *Anaplasma phagocytophilum* que la tique de l'Est, *I. scapularis*. Mais la souche américaine d' *Anaplasma phagocytophilum* en provenance de l'Est, dénommée Webster, infecte plus facilement les mammifères que la souche de l'Ouest, MRK. L'étude a ainsi montré que la répartition géographique d' *Anaplasma phagocytophilum* est plus dépendante des souches d' *Anaplasma phagocytophilum* en elles-mêmes que de la capacité vectorielle des tiques qui les transmettent. Ceci expliquerait qu'il y ait plus de cas d'anaplasmose à l'Est des Etats-Unis qu'à l'Ouest.

Nb : compétence vectorielle : capacité physiologique du vecteur à transmettre un pathogène.

3) *Anaplasma phagocytophilum* chez son vecteur

Chez les tiques, une transmission transtadiale de la bactérie existe, mais il n'a pas encore été montré qu'une transmission trans-ovarienne est possible (Ogden *et al.* 1998b et 2002; Telford *et al.* 1996). La bactérie est présente dans les glandes salivaires de la tique, où elle se multiplie. La tique joue donc un rôle de vecteur et d'amplification du pathogène, la transmission aux mammifères se faisant lors du repas sanguin. La transmission de la bactérie d'une tique à une souris met quelques heures (Des Vignes *et al.*, 2001).

Les *Ixodes* se nourrissent sur des animaux différents selon leur stade de développement. Ainsi, la larve et la nymphe se retrouvent chez les rongeurs et les petits mammifères, alors que l'adulte siège sur les grands animaux, dont l'homme (Furman et Loomis 1984). A noter tout de même que les stades larvaire et nymphal d' *I. pacificus* et les nymphes *I. scapularis* du Sud-Est des Etats-Unis préfèrent se nourrir sur les lézards (Durden *et al.*, 2002).

Par ailleurs, les tiques peuvent transmettre d'autres pathogènes, tels que des bactéries (autres *Anaplasma*, *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella spp.*,...), des protozoaires (*Babesia spp.*,...) ou des virus (virus de la Méningo-Encéphalite à Tique...). Se pose alors l'hypothèse d'une éventuelle interaction entre ces pathogènes. Une étude menée dans les régions où *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma centrale* et *Anaplasma marginale* sévissent de manière enzootique, a montré qu'il existe une concurrence entre ces bactéries chez les tiques et les ruminants (De la Fuente *et al.*, 2004a, 2005b ; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2004).

4) Transmission d'*Anaplasma phagocytophilum* de l'animal au vecteur (étude de Ogden *et al.*, 2003)

Les moutons constituant un réservoir important de la bactérie, notamment par l'existence d'une infection chronique (Ogden *et al.* 1998b), les auteurs ont voulu mettre en évidence les facteurs de risque de transmission d'*Anaplasma phagocytophilum* du mouton à la tique.

Ils ont ainsi constaté que :

- La transmission de la bactérie est plus importante durant l'expression aiguë, puis après l'expression des symptômes, que durant la phase préclinique (incubation).
- Plus le nombre de neutrophiles infectés est important, plus le risque de transmission d'*Anaplasma phagocytophilum* aux tiques est grand.
- Les tiques adultes sont plus souvent « PCR-positives » que les nymphes (les mâles *Ixodes* ne se nourrissent pas).
- Les nymphes se contaminent et restent infectées après la mue plus fréquemment que les larves.
- Plus il y a de tiques femelles adultes sur un mouton, moins celui-ci a de neutrophiles circulants, infectés ou non. Ceci peut être expliqué par un fort afflux de neutrophiles dans les lésions de morsures des tiques adultes. Cet afflux augmente le taux de neutrophiles dans la peau et semble dû à une réponse immunitaire de l'hôte à la salive des tiques (Wikel, 1999). Ainsi, plus il y a de tiques adultes gorgées sur l'animal, plus le nombre de neutrophiles augmente localement et donc plus le risque de contamination de ces tiques est important.
- Par contre, lors d'infestation par un grand nombre de nymphes, le nombre de neutrophiles par millilitre de sang augmente significativement, et le nombre de neutrophiles infectés augmente légèrement. Il semble donc que l'infestation par les nymphes stimule la libération de neutrophiles par la rate et les tissus hématopoïétiques.
- La probabilité d'avoir une contamination des tiques est liée à la charge bactérienne qu'elles ingèrent lorsqu'elles se gorgent.
- L'apparition d'anticorps spécifiquement dirigés contre *Anaplasma phagocytophilum* n'a pas montré d'influence dans la transmission de la bactérie du mouton à la tique.
- De même, la résistance des moutons aux tiques, n'influence pas la transmission du pathogène.

Cette étude originale, puisqu'elle concerne les modalités de transmission du pathogène de l'hôte au vecteur et non du vecteur à l'hôte, apporte des éléments capitaux pour mieux comprendre les capacités de dissémination de cette bactérie. De plus, elle permet de constater qu'il y a une réelle interaction entre le vecteur et l'hôte qui ont tous deux des rôles « actifs » dans cette transmission.

II. UNE BACTERIE UNIQUE

A) Caractères bactériologiques d'*Anaplasma phagocytophilum* (Dumler et al., 2001)

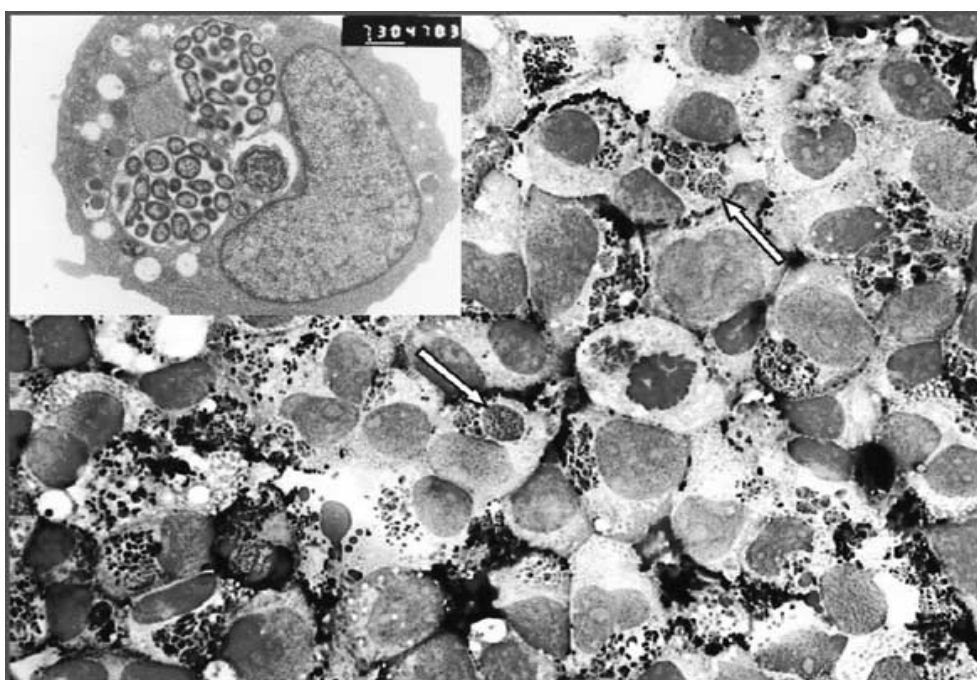
Anaplasma phagocytophilum est une bactérie Gram négative, de petite taille, souvent polymorphe (forme coccoïde ou ellipsoïdale). Elle infecte les cellules de la lignée myéloblastique des mammifères, notamment les granulocytes neutrophiles et, dans une moindre mesure, les granulocytes éosinophiles. Elle y forme, dans des vacuoles intracytoplasmiques, des structures appelées morulas, correspondant à des inclusions denses contenant un matériel fibrillaire au sein duquel sont présentes de nombreuses bactéries.

Les études de microscopie électronique révèlent l'existence de deux formes morphologiques au sein des morulas, des corps élémentaires ou corps initiaux denses et des corps réticulés. Les corps élémentaires mesurent environ 0,5 µm de diamètre alors que les corps réticulés peuvent atteindre 2 µm. Les morulas ont un diamètre compris entre 1,5 et 2,5 µm mais pouvant parfois atteindre 6 µm (Figure 4).

La taille du génome est d'environ 1494 kb et le G + C p. cent est estimé à 41.

Anaplasma phagocytophilum se cultive *in vitro* dans les cellules IDE8 = ATCC CRL 11973 (cellules embryonnaires de *Ixodes scapularis*) ainsi que dans les cellules de la lignée HL-60 (lignée de promyélocytes leucémiques d'origine humaine) non différenciées ou différenciées en granulocytes neutrophiles. Il est intéressant de remarquer que *Anaplasma phagocytophilum* ne se développe pas dans les cellules HL-60 différenciées en macrophages ce qui est superposable au tropisme présenté *in vivo* par cette espèce (Euzéby, 2008).

Figure 4 : Morulas d'*Anaplasma phagocytophilum* visibles dans le cytoplasme de cellules HL-60 en culture



(d'après P. Zeman et al., 2002)

B) Structure externe

Sa structure est celle des bactéries Gram négatives, mais sa paroi semble dépourvue de peptidoglycane ou possède un peptidoglycane peu rigide.

Les protéines de surface des *Ehrlichiae* du groupe 1 et 2, dont *Anaplasma phagocytophilum* fait partie, sont codées par une famille de multigènes polymorphiques, homologues, mais non identiques (Dumler *et al.*, 2001). Ces protéines expliquent la diversité antigénique existant au sein même de l'espèce (Asanovich *et al.*, 1997). Rikihisa (1999) souligne l'importance potentielle de cette diversité pour les antigènes de surface dans la pénétration cellulaire, la persistance des infections, l'échappement au système immunitaire et l'induction de la pathogénie.

Parmi les protéines de surface que possède *Anaplasma phagocytophilum*, il en existe une qui a particulièrement intéressé les chercheurs. Il s'agit d'une protéine de surface majeure, appelée MSP2 (P44) et ayant un poids moléculaire de 44kDa. Cette protéine est formée d'une région centrale hypervariable, de 280 bp, limitée par des séquences conservées terminales, 5' et 3' (ou amino- et carboxy-terminales), qui ont une longueur variant de 50 à 500 pb (Lin *et al.*, 2003; Zhi *et al.*, 1999). Les modèles expérimentaux montrent que les régions conservées ont un très faible rôle antigénique et sont probablement ancrées dans la membrane (Caspersen *et al.*, 2002) alors que les 3 domaines centraux, extrêmement variables, sont considérées comme induisant la diversité phénotypique de la membrane (Lin *et al.*, 2002). MSP2 est codée par un gène dont le site est sujet à de fréquentes recombinaisons avec des séquences dupliquées ailleurs dans le génome (Barbet *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003). Ainsi, il existe plus d'une centaine de copies du pseudogène *msp2* (*p44*) dans le génome de la bactérie (Dunning Hotopp *et al.*, 2006).

Des expériences de Kim et ses collègues, en 1998 puis en 2000, ont montré que cette protéine de structure joue un rôle dans l'infection et la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, les anticorps anti-P44, protègent les souris de l'infection et la protéine P44 recombinante induit la libération de cytokines pro-inflammatoires par les leucocytes humains *in vitro* (Kim *et al.*, 2000).

Les nombreuses variations de séquence de la protéine, entraînant des variations antigéniques, expliquent en partie l'échappement de la bactérie aux réponses immunitaires spécifiques de l'hôte et son adaptation à un nouvel environnement. Par exemple, si *Anaplasma phagocytophilum* provenant du plasma d'un cheval infecté est cultivé puis mise en présence de la bactérie avec des cellules humaines HL-60, on constate une nouvelle transcription du gène *p44* par rapport au transcrit du cheval infecté (Wang *et al.*, 2004).

Comme nous l'avons vu, la bactérie se développe dans le cytoplasme, en amas de microcolonies appelées morulas. Au sein d'une même morula, il y a des clones différents de la bactérie avec différentes expressions de P44. De plus, les manipulations physiques et mécaniques, telles que la « sonication¹ » et l'homogénéisation, pour libérer la bactérie du milieu intracellulaire, augmentent les recombinaisons (Wang X., Rikihisa Y. - données non publiées - d'après Lin et Rikihisa, 2005). Les recherches sur *Anaplasma phagocytophilum*, et notamment sur les variations génétiques de P44, ne sont donc pas aisées.

¹ Exposition à des ondes sonores de hautes fréquences pour détruire les membranes cellulaires

Chez le cheval, comme chez les souris SCID, les résultats de l'étude de Lin et Rikihisa (2005) montrent que le taux de bactéries recombinantes pour la protéine est le même en présence ou en l'absence de sélection par le système immunitaire acquis. Ceci a déjà été mis en évidence dans une expérience chez le cheval et la souris, lors de laquelle les recombinaisons sont apparues avant la détection des anticorps spécifiques (Wang *et al.*, 2004). En effet, il a été constaté qu'après inoculation d'un clone déterminé, 48 % de la population initiale du clone a muté chez le cheval et 42 % chez la souris SCID. On peut donc penser que c'est plutôt le système immunitaire non spécifique qui participe à la sélection et/ou la recombinaison des clones, mais on ne sait pas encore à quel moment, ni comment cette recombinaison a lieu.

Cependant, cette même étude de Wang *et al.* (2004), utilisant la souche HZ d'*Anaplasma phagocytophilum* isolée d'une anaplasmose humaine, a montré que l'ajout de plasma module l'expression de *p44*. C'est la première étude mettant en évidence que le plasma contribue aux changements phénotypique et génétique de la bactérie *in vitro*. Bien que la sélection ou l'adaptation de la bactérie soit visible en culture (Lin *et al.*, 2002), un plus grand nombre de variants est observé *in vivo* (Wang *et al.*, 2004). Il y a donc un niveau de sélection plus élevé chez l'animal qu'en culture. Il existerait des facteurs présents dans le plasma qui activeraient la recombinaison de *p44 in vivo*. Par conséquent, même si des recombinaisons peuvent survenir avant l'apparition des anticorps, le système immunitaire spécifique, par l'intermédiaire des anticorps spécifiques d'une région hypervariable, pourrait aussi jouer un rôle dans la sélection des clones.

Toutefois, ces résultats sont délicats à interpréter, car il est difficile de comparer les recombinaisons apparaissant *in vitro* à celles survenant *in vivo*.

Par ailleurs, cette même souche HZ exprime majoritairement le transcrit *p44-18* du gène, en culture à 37°C et dans les premiers stades de l'infection du cheval et de la souris. Or, durant l'augmentation logarithmique du taux de rickettsies dans le sang, il y a un rapide changement du transcrit *p44-18*, dominant initialement, en d'autres transcrits et ceci après incubation de la bactérie ou transmission par une tique. Ces changements de transcription ne dépendent pas de la charge bactérienne, car ils apparaissent aussi bien durant le pic de bactériémie que lorsque celle-ci diminue. Ainsi, il y a eu trois vagues de changement de transcription de *p44*, en moins d'un mois, chez un cheval n'ayant montré qu'un seul pic de bactériémie. Cependant, le transcrit *p44-18* n'a pas été retrouvé dans les glandes salivaires des tiques, ce qui suppose qu'il existe un mécanisme induisant l'expression de ce transcrit après sa transmission au mammifère.

Une recherche plus récente, de Barbet *et al.* (2006), portant sur des souches provenant d'Europe et des Etats-Unis et issues de nombreuses espèces animales différentes montre une expression similaire de la protéine MSP2 (P44) quelle que soit son origine. Le promoteur du gène est très conservé entre les souches et la seule mutation mise en évidence est l'insertion d'une base entre la région 10 et la séquence palindromique.

Par contre, en amont, le gène *P44ESupl* des souches isolées de moutons norvégiens, contrairement à ce qui est constaté chez les souches isolées de l'homme en Amérique du Nord, a considérablement divergé et contient un grand nombre de substitutions d'acides aminés tout au long de la molécule. De même, les régions nucléotidiques encadrant *msp2* (*p44*), ont également muté.

Cependant, la protéine MSP2 (P44) elle-même a été bien conservée et a des régions C et N terminales presque identiques à celles des souches des Etats-Unis.

Les souches d'Europe et des Etats-Unis possèdent et utilisent les mêmes loci pour synthétiser cette protéine de membrane et parmi les souches américaines, 36 des loci pouvant recombiner avec *msp2* (*p44*) ont plus de 90 % de similitude et 18 sont identiques à 100 %.

Pour conclure, bien qu'il y ait des différences entre le locus des souches européennes et américaines, les caractéristiques structurales fondamentales sont conservées et la diversité génétique de MSP2 (P44) est due à des recombinaisons de ce locus. Ceci participe, semble-t-il, à la capacité d'invasion des cellules et à la survie dans les différents hôtes en créant un obstacle au contrôle de l'infection chronique.

Finalement, le potentiel d'expression globale de la membrane externe est très large. La grande flexibilité de cet organisme, compatible avec sa structure et sa capacité d'infection de divers vertébrés et invertébrés, est exceptionnelle par rapport à la taille de son génome qui n'est que de 1,47 Mb. Les recherches sur la protéine P44 ont apporté des données intéressantes pour expliquer un des mécanismes d'échappement aux défenses de l'hôte. Mais la possibilité de sélection ou d'influence sur les clones par l'hôte, en jouant sur l'expression *msp2*, limite l'interprétation des données épidémiologiques basées sur ce gène.

C) Une classification revue et corrigée, mais... discutée !

Une proximité génétique entre les *Ehrlichiae* infectant l'homme et l'animal n'est mise en évidence que dans les années 1990. C'est alors que des recherches plus approfondies, basées à la fois sur des critères génotypiques (séquençage et hybridation d'ADN, profil de migration de protéines, antigénicité, ribotypage), phénotypiques (structure de paroi, coloration, morphologie, métabolisme) et de pathogénicité (vecteurs, culture, espèces affectées, localisation tissulaire...) ont poussé les bactériologistes à revoir la classification de ces germes.

Jusqu'à maintenant, les souches isolées ont été comparées à partir de l'identification et de la comparaison de séquences nucléotidiques et de l'analyse de différents loci, tels que le gène codant l'ARNr 16S, l'opéron *groESL* (codant une protéine de choc thermique), *gltA* (codant une citrate synthétase), *msp2(p44)*, *msp4* (gènes de protéines de surface tous les deux), et *ankA* (codant pour une protéine de translocation) (de la Fuente *et al.*, 2005a ; Inokuma *et al.*, 2001 ; Massung *et al.*, 2000 ; Sumner *et al.*, 1997). Parmi ces loci, ce sont les séquençages du gène de l'ARNr 16S et de *groESL* qui ont été les plus souvent utilisés.

Ainsi, une nouvelle classification et une nouvelle nomenclature ont été établies suite à une publication de Dumler *et al.* en 2001. Leur recherche a en effet montré une très faible variation entre les ARNr 16S d'*Ehrlichia phagocytophila*, d'*Ehrlichia equi*, de l'agent de l'Ehrlichiose Granulocytaire Humaine (EGH) et des espèces d'*Anaplasma* ainsi qu'une équivalence de 100 % pour le gène *GroESL* de ces 3 bactéries. Ces *ehrlichia*, jusqu'alors considérées comme distinctes sont désormais regroupées en une même espèce, nommée *Anaplasma phagocytophilum*, classée dans le génogroupe 2 de la famille des *Anaplasmataceae* (Tableau 1).

Cependant, les ARNr 16S des souches d'*Anaplasma phagocytophilum* présentent de légères différences de séquence (environ 5 pb) et leurs caractères biologiques, notamment leur spectre d'hôtes, leur pouvoir pathogène et leur répartition géographique, ne sont pas parfaitement identiques. Aussi, il est reconnu l'existence de variants au sein de cette espèce nommés : *Anaplasma phagocytophilum* biovar *Phagocytophilum*, *Anaplasma phagocytophilum* biovar *Equi* et *Anaplasma phagocytophilum* biovar *EGH*.

C'est en partie pour cela que cette classification est remise en cause par Inokuma *et al.* (2001). Leur étude est fondée sur les niveaux de similitude entre les séquences nucléotidiques de *gltA* de différentes *Ehrlichiae* et le pourcentage de G+C. Elle rappelle aussi que les tropismes des bactéries sont différents. Les bactéries du groupe 2 ou « *Anaplasma* » infectent en effet majoritairement les érythrocytes des ruminants tandis que l'ancien groupe des *Ehrlichia* infecte les cellules de la lignée blanche.

De plus, il a été suggéré que certaines souches d'*Anaplasma phagocytophilum* provenant de ruminants pouvaient avoir des caractéristiques différentes de celles des souches infectant l'homme (Massung *et al.*, 2003 ; De la Fuente *et al.*, 2005b) et qu'il s'agirait donc d'autres espèces d'*Anaplasma*. Cependant, une explication plus probable est que certains génotypes d'*Anaplasma phagocytophilum* pourraient inhiber la multiplication des autres génotypes comme cela a été décrit pour des souches d'*Anaplasma marginale* dans des troupeaux et chez des tiques (De la Fuente *et al.*, 2002, 2004a). Une autre explication serait que la transmission est stochastique et, bien que des souches génétiquement différentes puissent infecter le même hôte, seul le génotype dominant est détecté à la PCR (Palmer *et al.*, 2004).

Tableau 1

CLASSIFICATION DES *EHRlichIEAE*

ESPECES	HOTES VERTEBRES	TRANSMISSION, VECTEURS	TROPISME CELLULAIRE	REPARTITION GEOGRAPHIQUE
GROUPE GENOMIQUE I				
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Ruminants	Tiques : <i>Amblyomma</i> sp.	Cellules endothéliales	Afrique, Caraïbes
<i>Ehrlichia canis</i>	Chiens et autres canidés	Tiques : <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Monocytes, macrophages, lymphocytes	Mondiale
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Cervidés (<i>Odocoileus virginianus</i>), hommes, canidés, chèvres	Tiques : <i>Amblyomma americanum</i> ++, <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Ixodes scapularis</i> , <i>Amblyomma testudinarium</i> , <i>Haemaphysalis yengi</i> *	Monocytes, macrophages	USA++, Asie ? Afrique ? Europe ?
<i>Ehrlichia ewingii</i>	Chiens, hommes	Tiques : <i>Amblyomma americanum</i> ++, <i>Dermacentor variabilis</i> **, <i>Rhipicephalus sanguineus</i> **.	Granulocytes	USA
<i>Ehrlichia muris</i>	Souris, campagnols, autres espèces animales ? homme ?	Tiques : <i>Haemaphysalis flava</i> , <i>Ixodes persulcatus</i> ?	Monocytes, macrophages	Japon, Russie ?
<i>Ehrlichia</i> sp. souches HF et Anan	Souris, rats	Tiques : <i>Ixodes ovatus</i>	Monocytes, macrophages, éosinophiles	Japon
" <i>Ehrlichia</i> -like <i>Rattus</i> "	Rats	?	?	Chine
" <i>Candidatus</i> <i>Ehrlichia</i> <i>walkerii</i> "	?	Tiques : <i>Ixodes ricinus</i>	?	Italie
Agent de l'ehrlichiose humaine du Venezuela	Hommes	?	Monocytes	Venezuela
GROUPE GENOMIQUE I BIS				
" <i>Candidatus</i> <i>Neohrlichia</i> <i>mikurensis</i>	Rats	Tiques : <i>Ixodes ovatus</i>	Cellules endothéliales	Japon
<i>Ehrlichia</i> sp. variant Schotti	Chevreaux ?	Tiques : <i>Ixodes ricinus</i>	?	Pays Bas
GROUPE GENOMIQUE II				
<i>Anaplasma marginale</i>	Bovins	Tiques : <i>Boophilus</i> sp.	Erythrocytes	Mondiale

<i>Anaplasma ovis</i>	Ovins	Tiques : <i>Rhipicephalus</i> sp., <i>Dermacentor</i> sp.	Erythrocytes	Mondiale
<i>Anaplasma</i> (<i>Ehrlichia</i>) <i>bovis</i>	Bovins	Tiques : <i>Hyalomma excavatum</i> , <i>Hyalomma truncatum</i> (?), <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> , <i>Amblyomma variegatum</i> , <i>Amblyomma cajennense</i> (?).	Monocytes	Afrique ++, Amérique du Sud, Iran, Inde.
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Equidés, Ruminants, Homme, Chiens	Tiques : <i>Ixodes pacificus</i> , <i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes trianguliceps</i>	Granulocytes	Mondiale
Agent de l'ehrlichiose granulocytaire du lama	Lamas	Tiques : <i>Ixodes pacificus</i>	Granulocytes	USA
<i>Aegyptianella</i>	Oiseaux	Tiques : <i>Argas (Persicargus) persicus</i>	Erythrocytes	Mondiale
GROUPE GENOMIQUE III				
Agent SF	Expérimentale ment, le chien et la souris sont réceptifs	Trématodes : <i>Stellantchasmus falcatus</i>	Monocytes, macrophages	Japon
<i>Ehrlichia risticii</i> (<i>Neorickettsia risticii</i>)	Chevaux	Trématodes : <i>Acanthatrium oregonense</i> , <i>Allasogonoporus vespertilionis</i> , autres trématodes ?	Monocytes, macrophages, entérocytes	USA ++, Europe
" <i>Ehrlichia risticii</i> subsp. <i>atypicalis</i> "	Chiens	?	Monocytes, macrophages, entérocytes	USA
<i>Ehrlichia sennetsu</i> (<i>Neorickettsia sennetsu</i>)	Homme	Ingestion de poissons crus infestés par des métacercaires de trématodes	Monocytes, macrophages	Japon, Malaisie
<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	Canidés	Trématodes : <i>Nanophyetus salmincola</i>	Macrophages	USA
GROUPE GENOMIQUE IV				
<i>Wolbachia</i> sp.	Aucun (infections décrites chez des insectes ou des tiques)	?	?	?

(d'après Euzéby, 2008)

D) Outils de classification et d'identification des souches

1) *Utilisation des MLVA pour faciliter l'identification des souches*

Comme nous l'avons vu, jusqu'à maintenant, les souches isolées d'*Anaplasma phagocytophilum* ont été comparées à partir de l'identification et de la comparaison de séquences nucléotidiques et de l'analyse de différents loci (cf. paragraphe sur la classification). Parmi ces loci, c'est l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S qui a été le plus souvent utilisée. Cependant, l'étude de ces différentes séquences a montré qu'une mutation à un locus donné n'est pas suffisante pour déterminer la variabilité génétique de certaines souches (Bown *et al.*, 2007 ; Von Loewenich *et al.*, 2003). De manière générale, aucun lien épidémiologique et génétique n'a pu être affirmé à ce jour.

La plus grande hétérogénéité entre les souches a été révélée par la comparaison des séquences *ankA* (Massung *et al.*, 2000 ; Von Loewenich *et al.*, 2003). Dans une étude de souches infectant *I. ricinus* en Allemagne, plus de 25 % de dissimilitudes ont été trouvées entre les cadres ouverts de lecture de *ank*, avec 20 allèles différents répertoriés pour les 24 souches isolées (Von Loewenich *et al.*, 2003). Cependant, cette séquence génétique est très importante (4000 bps) et son amplification étant ardue, elle est difficilement utilisable pour une recherche sur un grand nombre de souches (Bown *et al.*, 2007).

C'est pourquoi, Bown *et al.* ont voulu s'assurer de la faisabilité d'une méthode utilisant l'analyse des « multiple-locus variable number tandem repeat (MLVA) » comme nouvelle approche pour l'étude génétique d'*Anaplasma phagocytophilum*. En effet, l'analyse MLVA a auparavant montré qu'elle offrait une bonne capacité discriminante pour d'autres espèces de bactéries. 10 loci VNRT (« variable number tandem repeat ») ont été identifiés dans le génome à partir de 20 souches européennes d'*Anaplasma phagocytophilum* possédant un nombre variable de VNRT. Ainsi, les auteurs ont pu étudier l'hétérogénéité dans le nombre de répétitions de paires de bases pour 4 de ces loci, qui restent stables avec le temps. Selon les auteurs, l'utilisation des MLVA est une méthode d'avenir pour l'identification et l'exploration de la diversité génétique des souches. En effet, c'est une technique simple et qui, selon eux, serait plus sensible pour l'identification des souches que les séquençages de *msp4* ou de l'ARNr 16S, largement utilisés jusqu'à présent. Cependant, l'étude a uniquement pu montrer que l'utilisation des MLVA permet une bonne identification de la souche, mais n'a pas mis en évidence de lien entre provenance épidémiologique et génétique des souches. Son utilisation pour la recherche épidémiologique n'est donc pour l'instant pas envisageable. En effet, le nombre d'allèles retrouvés à chaque VNRT est beaucoup moins important que ce qui est retrouvé chez les autres bactéries où la méthode MLVA est développée - *Borrelia burgdorferii*, *Francisella tularensis* et *Coxiella burnetii* - (Bown *et al.*, 2007).

2) Utilisation d'anticorps monoclonaux pour caractériser un lien épidémiologique

De nombreux anticorps monoclonaux spécifiques ont démontré leur intérêt pour l'étude taxonomique des Rickettsies (Xu et Raoult, 1998; Yu *et al.*, 1993). Ils ont une forte affinité pour un épitope unique, pouvant inclure ceux codés par la région hypervariable de *msp2*. Ils sont donc potentiellement intéressants pour l'identification et la classification des *Anaplasma*.

L'équipe de Inokuma, en 2003, a utilisé des anticorps monoclonaux d'une souche d'*Anaplasma phagocytophilum* Webster (isolée chez un humain dans le Wisconsin) pour examiner sa réactivité avec des isolats de différents hôtes et de différentes localisations aux Etats-Unis. Leurs résultats montrent qu'il y a bien une spécificité de sérotype selon la zone géographique de provenance de l'isolat. Selon les auteurs, l'utilisation des anticorps monoclonaux pourrait être une méthode d'avenir pour caractériser l'antigénicité d'un isolat dans le cadre d'une enquête épidémiologique.

III. A BACTERIE UNIQUE, PATHOGENIE UNIQUE

La plupart des études concernant la physiopathologie de la bactérie ont été réalisées *in vitro*, principalement sur des cellules humaines. Cette partie concerne donc essentiellement les mécanismes de pénétration et de survie du pathogène chez l'homme, mais on peut penser qu'il utilise le même type de stratégies pour se développer chez l'animal en général et chez le cheval en particulier.

A) Une bactérie intracellulaire stricte : adhésion à la cellule

- *Anaplasma phagocytophilum* se lie à des récepteurs spécifiques des neutrophiles humains et de la lignée HL-60.

A priori, le récepteur membranaire auquel *Anaplasma phagocytophilum* se lie pour pénétrer dans la cellule est la glycoprotéine sélective P (PSGL-1) (Goodman *et al.*, 1999 ; Herron *et al.*, 2000). Cette glycoprotéine est présente sur les granulocytes, les monocytes et les lymphocytes. Elle joue un rôle clé dans les premiers pas de l'inflammation en facilitant la liaison entre les leucocytes et l'endothélium des tissus lésés pour permettre l'extravasation vasculaire. Cette liaison est en partie permise par des interactions stéréospécifiques entre PSGL-1 et la sélectine P, exprimée par les plaquettes activées et les cellules endothéliales.

Par ailleurs, il semble que la protéine x de sialylation de Lewis (sialyl lewis x : sLe^x) est également importante pour la liaison entre *Anaplasma phagocytophilum* et la cellule car :

- elle est richement exprimée par la lignée HL-60,
- une expérience a montré que l'infection des cellules périphériques et de la moelle osseuse peut être prévenue par un prétraitement avec chacun des 4 anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre sLe^x,
- pour que la liaison entre sLe^x et l'antigène soit fonctionnelle, il faut que l'acide sialique de liaison terminal 2,3 α soit présent. Or, un traitement des cellules HL-60 avec une neuraminidase, qui détruit cet acide sialique, empêche à la fois la liaison et l'invasion de ces cellules par *Anaplasma phagocytophilum* (Goodman *et al.*, 1999).

Ces éléments montrent bien que l'expression de sLe^x et la sialylation sont des points critiques pour l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte (Carlyon et Fikrig, 2003).

Goodman *et al.* (1999) ont créé une lignée HL-60-A2 n'exprimant pas la α 1,3-fucosyltransférase-VII (FucT-VII), qui contrôle la dernière étape de la biosynthèse du glycan α 1,3-fucosylé, faisant partie de différents ligands sélectifs des neutrophiles. Cette biosynthèse est cruciale pour la formation de sLe^x, PSGL-1 et d'autres ligands, car elle leur permet d'acquérir leur capacité de sélection (Lowe, 1997 ; McEver, 2002).

Ils ont ainsi constaté que les cellules HL-60-A2 sont très résistantes à l'infection par *Anaplasma phagocytophilum*. Si l'on transfecte ces cellules de manière à rétablir l'activité de la α 1,3-fucosyltransférase-VII et par conséquent l'expression de sLe^x et de PSGL-1, leur infection est rendue de nouveau possible. Leur étude suggère donc que le récepteur d'*Anaplasma phagocytophilum* est une glycoprotéine de surface α 1,3-fucosylée (Goodman *et al.*, 1999), ce qui est le cas de sLe^x et de PSGL-1.

Herron *et al.* (2000) ont observé que le prétraitement des neutrophiles humains ou des cellules HL-60 avec des anticorps monoclonaux contre la partie N-terminale de PSGL-1 prévient la liaison avec *Anaplasma phagocytophilum*. De plus, les lymphoblastes B de la lignée BJAB, qui sont résistants à la bactérie, n'expriment pas PSGL-1. Cependant, elles ne possèdent pas non plus FucT-VII et n'expriment donc pas correctement sLe^x. Par contre, la co-expression de PSGL-1 et de FucT-VII ensemble, mais non séparément, rend les cellules BJAB sensibles à l'infection. Ceci montre que la bactérie se lie spécifiquement au récepteur PSGL-1 α 1,3-fucosylé des cellules humaines, probablement près de la partie N-terminale, mais qu'une liaison efficace avec les neutrophiles nécessite également des glycanes α 2,3-sialylaté et α 1,3-fucosylé.

Contrairement à la liaison avec les neutrophiles humains qui requiert l'expression de PSGL-1 et la α 1,3-fucosyltransférase-VII (FucT-VII), la liaison avec les neutrophiles murins nécessite l'expression de FucT-VII, mais pas de PSGL-1, pour être effective (Carlyon et Fikrig, 2003). Une explication est qu'*Anaplasma phagocytophilum* reconnaît une petite séquence N-terminale de PSGL-1 chez l'homme qui n'existe pas chez la souris (Yago *et al.*, 2003).

Quoi qu'il en soit, on sait que le pathogène exprime au moins deux adhésines capables de se lier à au moins deux ligands pour adhérer aux neutrophiles humains et murins. L'adhésine qui se lie à PSGL-1 chez l'homme reconnaît certainement une séquence de structure similaire sur une autre protéine des neutrophiles de la souris ou peut-être existe-il une troisième adhésine se liant à une toute autre séquence.

Par ailleurs, une étude de Park *et al.* (2003) suggère que la protéine de surface P44 (MSP2) facilite la liaison entre PSGL-1 et *Anaplasma phagocytophilum* chez l'homme.

En conclusion, le fait qu'*Anaplasma phagocytophilum* utilise à la fois PSGL-1 et les glycanes α 1,3-fucosylé et α 2,3-sialylaté pour l'adhésion et l'invasion cellulaire n'explique pas uniquement sa spécificité pour les neutrophiles, mais également sa capacité à échapper à la destruction en évitant la voie normale de la phagocytose (Carlyon et Fikrig, 2003).

B) Echappement à la phagocytose et aux voies de destruction des neutrophiles

1) Anaplasma phagocytophilum se développe dans des vacuoles qui ne fusionnent pas avec les lysosomes

Après s'être liée à son récepteur, la bactérie pénètre et colonise le milieu intracellulaire, pourtant hostile, des neutrophiles. Ceci suggère qu'elle a la capacité d'échapper ou de résister à la biogenèse des phagolysosomes de la cellule hôte.

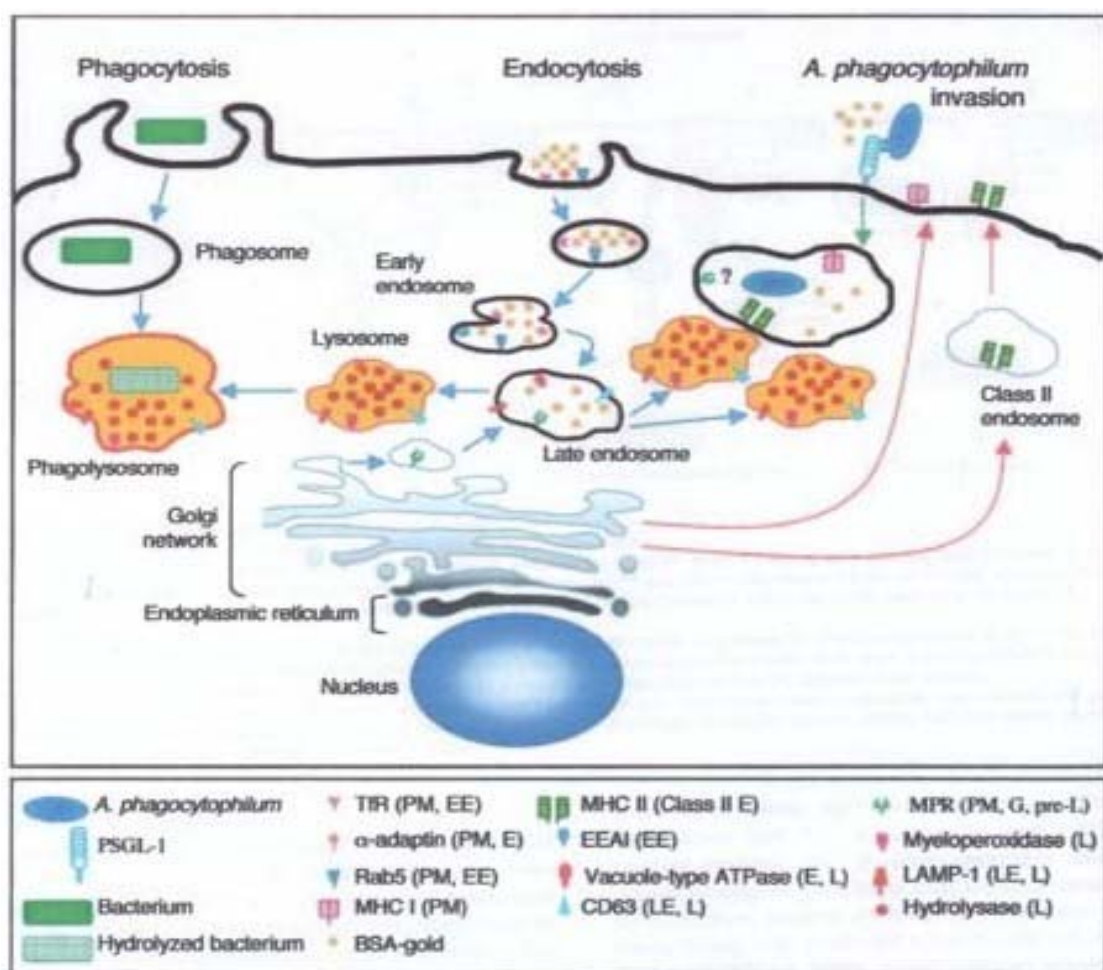
Normalement, une fois l'antigène phagocyté, le phagosome entreprend une série de maturations qui aboutit à la fusion avec le lysosome (Garin *et al.*, 2001 ; Gagnon *et al.*, 2002). Lors de la maturation, il y a une perte de certains composants du phagosome, qui sont recyclés et retournent dans la membrane cytoplasmique, tandis qu'il acquiert des marqueurs endosomaux et lysosomaux et que sa lumière s'acidifie (Pitt *et al.*, 1992 ; Desjardin, 2003).

Une étude, sur les marqueurs présents normalement dans les endosomes tardifs et les lysosomes, a montré que, dans les vacuoles où se trouve la bactérie, ces marqueurs ne sont pas exprimés alors qu'ils le sont dans les vacuoles contenant d'autres inclusions, pour une même cellule HL-60 (Webster *et al.*, 1998).

Anaplasma phagocytophilum n'altère pas l'ensemble des fusions phagolysosomiales ou des fonctions lysosomiales de la cellule, mais bloque uniquement la fusion des lysosomes avec le phagosome où il réside. Cette inhibition est dépendante des synthèses protéiques de la bactérie, car un traitement à l'oxytétracycline permet la maturation en phagolysosomes des vacuoles où se trouve la bactérie (Gocke *et al.*, 1999).

La structure du phagosome abritant *Anaplasma phagocytophilum* est unique et ne ressemble pas à celles des vacuoles occupées par d'autres microorganismes (Figure 5). Cette vacuole n'a pas les caractéristiques d'un endosome précoce ou tardif et contient les molécules du CMH de classe I et de classe II. Ceci permet à la bactérie de se « camoufler » dans la cellule et ainsi d'échapper aux voies normales de destruction par les neutrophiles (Carlyon et Fikrig, 2003).

Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes de pénétration et de développement d'*Anaplasma phagocytophilum* dans le neutrophile.



(d'après Carlyon et Fikrig, 2003)

2) *Anaplasma phagocytophilum* inhibe la production de O_2^-

Un des principaux moyens pour le neutrophile de détruire le pathogène est de produire des dérivés toxiques d'oxygène à partir de l'anion superoxyde (O_2^-) dans le phagosome (Babior, 1999). La diminution du pH de la vacuole d'endocytose résulte d'un influx d' O_2^- permettant la libération de protéases dans le phagosome (Reeves *et al.*, 2002). Cette production d' O_2^- est permise par le complexe NADPH oxydase activé.

Il a été montré qu'*in vivo*, les neutrophiles murins et humains, infectés par la bactérie, ont une activité de la NADPH oxydase diminuée (Wang *et al.*, 2002 ; Carlyon et Fikrig., 2003). *In vitro*, la production d' O_2^- est arrêtée après 30 minutes à 4 heures d'incubation avec *Anaplasma phagocytophilum* (Mott et Rikihisa, 2000 ; Wang *et al.*, 2002). Or, parmi les complications possibles de l'anaplasmose, il peut y avoir le développement d'infections opportunistes. Une des hypothèses pouvant expliquer cela est la diminution de cette activité NADPH oxydase entraînant la perte d'un des principaux moyens de défense de l'organisme (Carlyon et Fikrig, 2003).

Les mécanismes par lesquels *Anaplasma phagocytophilum* inhibe la NADPH oxydase sont complexes et multifactoriels, touchant l'enzyme au niveau de sa transcription, sa traduction et/ou son activation. La bactérie pourrait également se protéger des réactions oxydatives grâce à une enzyme O_2^- détoxifiante, la superoxyde dismutase (SOD), qui catalyse la réaction de transformation de O_2^- en H_2O_2 et O_2 . Ohashi *et al.*, en 2002, ont d'ailleurs mis en évidence la présence et l'expression d'un gène homologue de la SOD (*sodB*) chez la bactérie.

Finalement, *Anaplasma phagocytophilum* est capable d'échapper à sa destruction en évitant la synthèse phagolysosomiale et en limitant la synthèse des molécules oxydatives.

C) *Anaplasma phagocytophilum* retarde l'apoptose des neutrophiles

Après leur libération par la moelle osseuse, les PNN ont une demi-vie courte, de 6-12h (Homburg et Roos., 1996 ; Akgul *et al.*, 2001). Cette durée de vie peut être augmentée *in vitro* par des cytokines et *in vivo* lors d'inflammation (Colotta *et al.*, 1992).

Pour survivre et se développer, la bactérie est capable d'allonger la durée de vie des neutrophiles, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Yoshiie *et al.*, 2000 ; Scaife *et al.*, 2003). Yoshiie et son équipe (2000) ont remarqué qu'après 24h d'incubation *in vitro*, près de 100 % des neutrophiles issus de sang périphérique humain sont apoptotiques, alors que s'ils sont incubés avec *Anaplasma phagocytophilum*, plus de 50 % d'entre eux ne sont toujours pas apoptotiques au bout de 48h, et 10-20 % survivent jusqu'à 96h. Ainsi le temps de demi-vie des neutrophiles en culture seuls est de 12.2 +/- 2.5h contre 45.0 +/- 9.8h lorsqu'ils sont infectés par la bactérie.

Il semble que les protéines de surface de la bactérie jouent un rôle dans l'allongement de cette demi-vie, alors que les synthèses protéiques ne sont pas nécessaires, car un traitement à l'oxytétracycline ne diminue pas cet effet (Yoshiie *et al.*, 2000).

Une inhibition de l'activité NADPH oxydase pourrait en partie expliquer cette propriété de la bactérie (Banerjee *et al.*, 2000). Cette inhibition de la NADPH oxydase est probablement due, chez l'homme, à une protéine de surface, encore inconnue, de courte durée de vie et synthétisée par la bactérie au contact des neutrophiles (Yoshie *et al.*, 2000).

Bien que la durée de vie des neutrophiles soit effectivement augmentée, on ne sait pas encore comment cela peut suffire à la survie d'une bactérie avec un temps de développement aussi long. De plus, aucune étude montrant une corrélation entre la capacité à survivre d'*Anaplasma phagocytophilum* et la durée de vie des cellules n'a été menée.

Un des moyens de propagation du pathogène est la stimulation de la production de chimiokines qui induit le recrutement de neutrophiles naïfs sur le site de l'infection. L'allongement de la demi-vie des cellules hôtes pourrait donc permettre à la bactérie de maximiser cette voie de propagation et ses autres stratégies de survie.

Paradoxalement, l'infection des cellules HL-60 entraîne une apoptose rapide des cellules. Il semble donc que l'augmentation du délai d'apoptose lors d'invasion d'une cellule par *Anaplasma phagocytophilum* n'est valable que pour les neutrophiles et n'est ainsi pas une conséquence globale de l'infection (Carlyon et Fikrig, 2003).

Finalement, *Anaplasma phagocytophilum* est capable d'éviter la mort rapide de la cellule qui l'héberge ce qui lui laisse le temps d'initier sa multiplication et sa propagation.

D) *Anaplasma phagocytophilum* exploite le chimiotactisme des neutrophiles

L'infection microbienne stimule la production de cytokines, qui aident à contrôler l'infection, mais peuvent aussi contribuer à la physiopathologie de la maladie.

Les études sur les sérums d'hommes atteints d'anaplasmose (Dumler *et al.*, 2000), les souris d'expérimentation inoculées (Akkoyunlu et Fikrig, 2000 ; Martin *et al.*, 2000) ainsi que les cellules souches HL-60 et rHL-60 (Klein *et al.*, 2000) montrent une élévation des taux d'interféron gamma (IFN- γ) et d'interleukine 10 (IL-10).

Dans ces études, le taux des cytokines pro-inflammatoires, comme le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , l'IL-1 β , l'IL-4 et l'IL-6 ne sont pas augmentés. Par contre, une étude menée par Kim et Rikihisa, en 2000, a montré une élévation de l'ARN messager et de l'expression protéique de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-6 dans des leucocytes du sang périphérique incubés avec *Anaplasma phagocytophilum*. Les mêmes auteurs ont décrit, en 2002, une augmentation de la transcription de l'IL-1 β dans les neutrophiles et du TNF- α et de l'IL-6 dans les monocytes.

On sait que l'IFN- γ protège contre les infections par les bactéries intracellulaires et joue probablement le même rôle contre *Anaplasma phagocytophilum*. Cependant, l'IFN- γ a également des effets néfastes sur les cellules hôtes (Fresno *et al.*, 1997). On pense que c'est en partie pour cela que les lésions tissulaires et l'expression clinique de l'anaplasmose humaine sont plus importantes que ne le laisse prévoir le pouvoir pathogène propre de la bactérie (Walker et Dumler., 1997 ; Dumler et Brouqui., 2004).

Les chimiokines, qui sont des cytokines chimiotactiques majoritairement sécrétées par les cellules inflammatoires, sont d'importants médiateurs de l'activation leucocytaire et du chimiotactisme. Leur expression est induite par une variété de stimuli, incluant les cytokines pro-inflammatoires, le lipopolysaccharide (LPS) et d'autres molécules bactériennes (Adams et Lloyd, 1997).

L'invasion des cellules HL-60 et rHL-60 *in vitro* induit une élévation de la synthèse de certaines chimiokines (Klein *et al.*, 2000). Il en est de même pour les neutrophiles infectés expérimentalement ou les sérums d'hommes atteints d'anaplasmose (Akkoyunlu *et al.*, 2001). Ce phénomène semble être induit par un composant thermiquement stable de la bactérie et indépendant du LPS classiquement mis en jeu (Klein *et al.*, 2000).

La sécrétion de ces chimiokines, notamment de l'IL-8, permet un recrutement de neutrophiles naïfs à proximité des cellules infectées. Cependant, cette interleukine active également la phagocytose par les neutrophiles, ainsi que leur production de molécules oxydatives et leur dégranulation (Baggiolini *et al.*, 1994).

***Anaplasma phagocytophilum* étant une bactérie intracellulaire stricte, la réussite de l'infection et sa maintenance chez l'hôte sont dépendantes de son transfert à des neutrophiles naïfs ou à leurs précurseurs. Elle stimule la production d'IL-8, qui attire les neutrophiles sur le site de l'infection, et permet ainsi sa propagation.**

E) *Anaplasma phagocytophilum* possède une protéine (AnkA) capable d'entrer dans le noyau des neutrophiles (Park *et al.*, 2004)

AnkA est la seule protéine connue d'*Anaplasma phagocytophilum* qui est retrouvée au-delà de la vacuole cytoplasmique et qui est transportée dans le noyau des cellules infectées. Avec un poids moléculaire de 160 kDa, c'est également la plus grosse protéine qu' *Anaplasma phagocytophilum* synthétise.

In vitro, AnkA se lie à l'ADN et aux protéines nucléaires d'environ 86, 53 et 25 kDa des cellules HL-60, alors que la protéine de surface recombinante Msp2 ne le fait pas. Elle n'est pas associée à la membrane de la bactérie, mais est localisée à l'intérieur des noyaux des granulocytes infectés, à proximité de la chromatine condensée, probablement après sécrétion et transport (Caturegli *et al.*, 2000).

Une fois dans le noyau, AnkA se retrouve au niveau de plusieurs gènes cibles du génome humain, dont des gènes codant des protéines ayant des fonctions de type ATPase, tyrosine phosphatase, ou NADPH déshydrogénase.

Ainsi, l'étude de Park *et al.* (2004) a mis en évidence une interaction potentielle de AnkA avec la chromatine, des protéines nucléaires et/ou des protéines complexées avec l'ADN des neutrophiles.

Cependant, des investigations doivent encore être menées pour comprendre comment cette interaction joue un rôle dans la manipulation des fonctions neutrophiliques par le pathogène.

F) *Anaplasma phagocytophilum* pourrait pénétrer dans les cellules endothéliales de la microvascularisation (Munderloh *et al.*, 2004)

Les tiques ne transpercent pas directement les vaisseaux, mais se nourrissent des fluides extracellulaires et du sang provenant de capillaires endommagés. Par conséquent, *Anaplasma phagocytophilum* ne serait pas directement inoculé dans le sang de l'hôte, mais dans le milieu extracellulaire. Il lui faudrait donc traverser les parois vasculaires pour atteindre le sang, d'où l'idée qu'il puisse pénétrer dans les cellules endothéliales.

Une étude de Munderloh *et al.* (2004) a montré que la bactérie est capable d'entrer et de se multiplier dans les cellules endothéliales de la microvascularisation de primates et de bovins *in vitro*. Ainsi, les cellules endothéliales des microvaisseaux pourraient jouer un rôle dans la pathogénicité de l'anaplasmose, directement, en servant de cellules hôtes, et indirectement, de cellules présentatrices d'antigènes (Poher, 1999).

Le site de morsure de la tique est le siège d'une inflammation qui attire les neutrophiles (Tatchell et Moorhouse, 1970) et altère leur fonctionnement (Borjesson *et al.* 2005).

Une fois sur le lieu de l'inflammation, les leucocytes sécrètent des chimiotactines et des interleukines (Staykova *et al.*, 2000) qui, à leur tour, stimulent la libération ou activent le transport vers la lumière vasculaire et l'exposition à la surface endothéliale d'interleukines (Lienenluke *et al.*, 2000) comme c'est le cas avec l'interleukine 8 (IL-8). Ceci facilite l'infection des neutrophiles en les attirant vers le site de la morsure, lieu d'inoculation de la bactérie (Akkoyunlu *et al.*, 2001).

Une fois les neutrophiles sur le site de la morsure, les cellules endothéliales sont probablement un bon moyen de transfert de la bactérie. En effet, lors d'une inflammation, il y a adhésion, puis diapédèse des leucocytes à travers les cellules endothéliales (Snapp *et al.*, 2002). Comme nous l'avons vu, dans la lésion de morsure, le fonctionnement des neutrophiles est altéré et leur capacité à la diapédèse diminuée.

Ainsi, au lieu d'inoculation, la bactérie pénétrerait et se multiplierait dans les cellules endothéliales de la microvascularisation, puis envahirait les neutrophiles qui, altérés, resteraient dans la circulation sanguine, permettant la dissémination du pathogène.

Par ailleurs, en pénétrant dans les cellules, *Anaplasma phagocytophilum* est à l'abri de la réponse immunitaire à médiation humorale.

Les cellules endothéliales sont donc potentiellement capables de servir de « réservoir cellulaire » dans l'hôte, en permettant l'intégration et la multiplication du germe. De plus, elles ont une demi-vie bien plus longue que celle des neutrophiles, et pourraient, par conséquent, participer au maintien d'une infection chronique chez certains mammifères (Castro *et al.*, 2001 ; Stuen et Bergstrom, 2001).

Certains symptômes de l'anaplasmose, comme la thrombocytopénie et l'œdème des membres, jusqu'alors attribués aux cytokines myélosuppressives et pro-inflammatoires libérées par les neutrophiles (Kim et Rikihisa, 2000 ; Klein *et al.*, 2000), pourraient être dus à l'invasion des cellules endothéliales.

Au-delà de l'aide à la compréhension de la physiopathologie de l'infection, le fait que la bactérie puisse se développer dans les cellules endothéliales est intéressant pour la recherche. En effet, la culture bactérienne sur cellules endothéliales qui adhèrent directement au substrat, est plus aisée qu'avec la lignée HL-60 qui se développe en suspension, ou qu'avec des cellules de tiques.

Ceci pourrait aider pour les analyses génétiques ou la sélection clonale. De plus, les cellules endothéliales pourraient représenter une source de production potentielle d'antigène d'*Anaplasma phagocytophilum* pour le diagnostic ou la production de vaccins.

G) Lésions hépatiques : une des conséquences de la physiopathologie d'*Anaplasma phagocytophilum*

Comme nous l'avons vu, *Anaplasma phagocytophilum* est en partie capable d'échapper à l'immunité innée, mais provoque tout de même son activation et la libération d'effecteurs de cette immunité (Carlyon et Fikrig, 2003). Selon Browning *et al.* (2006) il semble que cette réaction immunitaire, non spécifique et précoce, est à l'origine de lésions inflammatoires hépatiques. De même, dans le modèle murin de l'anaplasmose Granulocytaire Humaine (AGH), la réponse immunitaire de l'hôte cause plus de lésions hépatiques que la charge bactérienne elle-même (Martin 2001, Scorpio *et al.*, 2004). Le mécanisme par lequel l'infection provoque ces lésions, par libération de ces molécules inflammatoires, n'est pas parfaitement connu. On sait seulement qu'il ne dépend

pas de la charge bactérienne et que le pathogène lui-même n'est pas la cause directe des lésions tissulaires (Martin *et al.*, 2000 et 2001 ; Von Loewenich *et al.*, 2004 ; Scorpio *et al.*, 2006). Ainsi, lors d'AGH chronique, des lésions d'infiltrations granulomateuses hépatiques sont retrouvées (Pollock *et al.*, 1995).

Plusieurs études sur les facteurs de l'immunité ont été menées pour comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'atteinte hépatique. Une déficience en « nitric oxide synthase » (NOS2), « tumor necrosis factor » (TNF), NADPH ou en « phagocyte oxydase » (phox) n'ont que peu de répercussions sur le contrôle d'*Anaplasma phagocytophilum*. De même, les souris déficientes en Toll-like récepteur 2, 4 (*Tlr2* -/- ou *Tlr4* -/-), et *Myd88* -/- ont des charges en pathogène similaires aux animaux contrôles (Von Loewenich *et al.*, 2004). Par conséquent, les facteurs de la réponse immunitaire innée ou acquise représentés par TLR2, TLR4, MyD88, phox, NOS2 et le TNF ne sont pas indispensables au contrôle du développement d'*Anaplasma phagocytophilum* (Von Loewenich *et al.* 2004) et ne seraient pas à l'origine des lésions hépatiques.

Par contre, lors de déficience en interféron gamma, la charge bactérienne est augmentée et il y a moins de lésions histopathologiques. L'interféron gamma permet donc un contrôle de l'infection, en limitant la charge bactérienne (Akkoyunlu *et al.*, 2000, Martin *et al.*, 2001), mais pourrait également participer aux lésions.

H) En résumé

Anaplasma phagocytophilum est un pathogène unique en raison de son tropisme pour une des barrières immunitaires majeures de l'organisme qu'est le granulocyte neutrophile.

Après s'être lié à un déterminant moléculaire spécifique de PSGL-1 des neutrophiles humains, il use de différentes stratégies qui travaillent en synergie pour promouvoir un environnement cellulaire propice à son développement.

Il inhibe la NADPH oxydase pour échapper aux défenses dépendantes de l'O₂⁻ tout en stimulant la production d'IL-8, créant un afflux de neutrophiles naïfs à infecter. De plus, il augmente le délai d'apoptose des cellules hôtes, ce qui lui permet, a priori, de disposer de suffisamment de temps pour mettre en place ses différents moyens de survie. Un des moyens expliquant ces capacités est qu'il pourrait influencer sur le fonctionnement du neutrophile, en agissant directement au niveau de l'expression génique, grâce à une protéine, AnkA, capable de se lier à des gènes cibles de celui-ci.

Par ailleurs, une expérience a montré qu'il est capable de pénétrer dans les cellules endothéliales *in vitro*. Ces cellules pourraient donc participer à la dissémination et au maintien de la bactérie dans l'organisme hôte.

Enfin, des études sur les atteintes hépatiques survenant lors d'anaplasmose révèlent qu'*Anaplasma phagocytophilum* ne serait pas directement à l'origine des lésions. Ce sont très probablement les mécanismes inflammatoires, mis en place par l'hôte pour lutter contre l'infection, qui les créent.

Des études complémentaires sur ce pathogène nous permettront de mieux comprendre sa physiopathologie unique et d'améliorer nos connaissances sur les bactéries intracellulaires et la biologie des neutrophiles.

IV. ETUDE CLINIQUE CHEZ LE CHEVAL

L'étude clinique chez le cheval est intéressante à la fois parce que c'est l'espèce qui nous concerne et parce que le cheval a été proposé comme modèle pour l'Anaplasmose Granulocytaire Humaine. Chez lui, la maladie est hautement reproductible et caractérisée par une clinique, des variations biologiques et une pathologie similaire à ce qui est observé chez l'homme (Lepidi *et al.*, 2000).

A) Symptômes

L'étude de Franzén *et al.* (2005), menée sur 6 chevaux inoculés avec *Anaplasma phagocytophilum*, a montré des signes cliniques constants pour tous les chevaux :

- hyperthermie,
- abattement (objectivé par une diminution de l'attention et des réponses aux stimuli ainsi qu'un port de tête bas),
- une dysorexie voire anorexie,
- une tachycardie et une polypnée,
- de l'ataxie,
- et un œdème distal des membres.

Ces symptômes ont débuté 6 à 9 jours après l'inoculation. La fièvre a duré de 5 à 10 jours et certains autres signes ont persisté plus longtemps.

D'autres études rapportent également un ictère et des pétéchies sur les muqueuses nasales et orales et sur la membrane nictitante (Pusterla *et al.*, 2002), ainsi qu'une possible orchite (Nolen-Walston *et al.*, 2004).

Toutefois, l'infection peut également passer inaperçue ou se manifester de manière très peu spécifique. Une étude réalisée dans le sud de la France (Pradier, 2004 ; Leblond *et al.* 2005a) en témoigne, avec des chevaux ayant une sérologie positive sans avoir exprimé de symptôme. De même, aux Etats-Unis, Madigan et Gribble montrent, dès 1987, que 50 % de chevaux avec une clinique sans anomalie ont des anticorps contre *Anaplasma phagocytophilum* dans certaines régions de Californie.

B) Eléments nécropsiques et histologiques

Durant l'expérience de Franzén *et al.* (2005), un des chevaux est mort soudainement après 2 jours d'expression clinique semblable aux autres. Ils publient alors, en 2007, les résultats de l'autopsie qu'ils ont réalisée.

Les lésions macroscopiques majeures identifiées étaient des hémorragies et des œdèmes des membres, de la paroi abdominale ventrale, du prépuce et des organes intra thoraciques et intra abdominaux, dont les reins.

Microscopiquement, des agrégations de cellules inflammatoires étaient présentes dans les travées hépatiques et certains hépatocytes étaient apoptotiques. Comme dans d'autres publications (Gribble, 1969 ; Lepidi *et al.*, 2000), des lésions de vascularite (angéite) ont été notées.

Par contre, ils ont retrouvé des lésions non encore décrites lors d'anaplasmose granulocytaire équine : une tuméfaction du glomérule et la présence de nombreux thrombi hyalins ou d'agrégats de globules rouges dans les artérioles et les capillaires rénaux. Ceci laisse à penser que le cheval a été victime d'une coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD) pouvant expliquer sa mort. Bien que cela ne soit pas communément observé, quelques publications rapportent des cas de coagulopathies ou de CIVD chez des hommes atteints d'anaplasmose (Bakken *et al.*, 1996 ; Behl *et al.*, 2000).

C) Signes biologiques :

1) *Variations hématologiques*

Les valeurs de la numération formule sanguine ayant les variations les plus importantes sont le nombre de plaquettes et de lymphocytes, qui chutent. Durant la phase fébrile de la maladie, les chevaux développent une leucopénie et une neutropénie transitoires ainsi qu'une lymphopénie marquée (jusqu'à moins de 1 000 cellules/ μ L).

Une thrombocytopénie importante, et de plus longue durée que la leucopénie, ainsi qu'une anémie modérée, sont également constatées (Franzén *et al.*, 2005 ; Nolen-Watson *et al.*, 2004).

2) *Variations biochimiques*

Une hyperbilirubinémie par élévation de la bilirubine non conjuguée ainsi qu'une augmentation de l'activité de la créatinine kinase sont parfois rapportées (Nolen-Watson *et al.*, 2004).

D) Traitement

Comme l'ont montré certaines études cliniques (Franzén *et al.*, 2005 ; Pusterla *et al.*, 2002), la guérison peut être spontanée. Cependant, il a été rapporté des possibilités de complications avec un risque de mort (Franzén *et al.*, 2005).

Chez l'homme, il a été que la sévérité des symptômes et la réussite du traitement sont fortement corrélées à la rapidité du diagnostic et à l'usage précoce des antibiotiques adaptés (Parola *et al.*, 1998), d'où l'intérêt de mettre rapidement en place le traitement adéquat.

Chez l'homme, la doxycycline et la rifampin sont les antibiotiques les plus actifs *in vitro* (Klein *et al.*, 1997 ; Maurin *et al.*, 2003).

Dès 1987, Madigan et Gribble ont établi que le meilleur traitement pour le cheval est l'oxytétracycline à la dose de 7 mg/kg, une fois par jour, par voie intraveineuse stricte. Ce traitement doit être poursuivi pendant sept jours, soit avec des injections journalières, soit avec deux jours d'injections pour faire baisser la fièvre puis des administrations par voie orale d'oxytétracycline à la dose de 20 mg/kg deux fois par jour. La guérison est en général rapide et la température est normalisée en 12-24h. Si ce n'est pas le cas, il faudra penser à une erreur de diagnostic.

Il n'y a pas encore de résistance décrite pour cet antibiotique (Dumler et Brouqui, 2004).

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques à spectre large. Leur indice thérapeutique est généralement considéré supérieur à 20. Elles présentent donc une faible toxicité. Dans certaines conditions cependant, l'administration de tétracyclines peut provoquer des désordres digestifs chez le cheval. Par exemple, lorsque le traitement est associé à un stress, le cheval peut développer une entéocolite dysentérique mortelle (Baker et Leyland, 1973). Cette perturbation ferait suite à un déséquilibre de la flore caecale ou pourrait résulter d'une action irritante directe des tétracyclines lors d'administration orale ou parentérale, du fait de son élimination biliaire (White et Prior, 1982). Cette complication apparaît après au moins deux jours de traitement à une posologie trop élevée, mais aussi à posologie normale. Même si un risque existe, l'oxytétracycline est fréquemment utilisée sans provoquer d'effets indésirables chez le cheval la plupart du temps.

Un traitement symptomatique pour maintenir l'hydratation et limiter les œdèmes peut être nécessaire. Il consiste notamment en une fluidothérapie, l'usage d'anti-œdémateux et la pose de bandes de repos aux quatre membres. Les chevaux fortement ataxiques doivent être placés dans un box adapté.

De plus, une infection concomitante doit être considérée comme une complication possible grave et doit être traitée très sérieusement, même si elle paraît mineure. En effet, une capacité d'*Anaplasma phagocytophilum* à réduire la réponse humorale et l'activité des polynucléaires neutrophiles a été documentée (Rikihisa, 1991). Même s'il est encore difficile d'évaluer les implications cliniques de cette baisse de l'immunité (Joncourt, 2003), pour Gocke et Woldehiwet (1999), *Anaplasma phagocytophilum*, en infectant les granulocytes neutrophiles, compromet les facultés de résistance aux autres infections.

Chez l'homme, des complications sévères peuvent apparaître incluant un choc septique avec une atteinte de multiples organes, une détresse respiratoire, une névrite périphérique et/ou le développement d'une maladie opportuniste. Parmi les 7 patients morts, alors qu'ils étaient atteints d'anaplasmose, dans des études de Bakken *et al.* (1996) et Hardalo *et al.* (1995), 3 des décès sont dus au développement de maladies opportunistes, dont une œsophagite à *Candida*, une pneumonie cryptococcique, une aspergillose pulmonaire invasive et une herpès-virose « esophagitis ». Ceci laisse penser qu'il existe bien un risque d'immunodépression lors d'anaplasmose.

Une période de repos suffisante, en fonction de la gravité des symptômes et de la durée de l'hyperthermie, doit être maintenue.

Pour exemple, un cas clinique référé à l'université américaine de Grafton, dans le Massachusetts (Nolen-Walston *et al.*, 2004). Le cheval est arrivé avec de la fièvre, un abattement, une anorexie, des œdèmes et surtout une forte ataxie. Un traitement symptomatique a immédiatement été entrepris. Le cheval a reçu un bolus de mannitol (1g/kg à partir d'une solution à 20%, IV) et une perfusion de 10L de Ringer Lactate dans les premières 24h, puis de 1,5 L/h pour le maintien du volume circulant. De la méthylprednisolone (1 mg/kg, IV, une fois) ainsi que de la flunixin méglumine (1mg/kg, IV) ont été administrées pour limiter l'inflammation et contrôler l'hyperthermie. Une fois le diagnostic d'anaplasmose certain, le cheval a été traité avec de l'hydrochloride d'oxytétracycline (10 mg/kg) dilué dans une poche de 500 ml de NaCl isotonique et administré par voie intraveineuse sur 15 minutes, une fois par jour, durant 7 jours. Les problèmes d'équilibre se sont rapidement améliorés et le cheval était beaucoup moins ataxique au bout de 48h. De même, il ne présentait plus de fièvre. Au bout de 6 jours, il se déplaçait normalement au pas et au trot. Après 12 jours d'hospitalisation, il a pu retourner dans son écurie. Une visite de contrôle, 2 mois plus tard, n'a pas montré de séquelles chez ce cheval.

E) Pronostic

Le pronostic est bon, avec de très rares cas rapportés de décès. En général, les chevaux infectés guérissent rapidement avec des soins appropriés et parfois même spontanément (Nolen-Walston *et al.*, 2004 ; Franzén *et al.*, 2005 ; Pusterla *et al.*, 2002).

Ce pronostic s'assombrit si des blessures consécutives à l'ataxie ou des complications infectieuses secondaires à l'immunodépression surviennent (Madigan et Pusterla, 2000).

F) Mieux vaut prévenir que guérir... encore faut-il pouvoir le faire...

Il n'existe pas de vaccin contre l'anaplasmose granulocytaire équine.

Les mesures prophylactiques se limitent à éviter ou au moins réduire l'exposition aux tiques. La lutte peut être à la fois chimique, écologique, biologique et immunologique.

La lutte chimique consiste en l'application d'antiparasitaires actifs contre les tiques. Les molécules utilisables font partie de 5 grandes familles : Organochlorés, Organophosphorés, Formamidines, Pyrétrinoïdes et Avermectines. Il convient de traiter tous les animaux et de désinfecter et désinsectiser les locaux, le matériel et les véhicules de transport (Martin, 1998).

La lutte écologique peut être définie comme l'ensemble des méthodes qui tendent à rendre le milieu défavorable aux agents de nuisance. Ceci peut être obtenu par modification du biotope ou de la biocénose. Le retrait saisonnier des espèces hôtes aux époques de prolifération ou d'activité maximale s'est avéré efficace. Mais la période de plus forte densité des tiques correspond à celle où les ressources fourragères sont les plus abondantes et le retrait des animaux à ce moment serait une mesure anti-économique. Le retrait périodique, à certaines heures de la journée (les heures les plus chaudes correspondant à celles où les tiques à jeun sont les plus actives), comme par exemple le pâturage uniquement nocturne ou la rotation entre 2 pâtures sur 24 heures, semble réalisable en pratique. On peut simplement éviter la rencontre hôte-parasite en installant dans les pâturages à risque, des clôtures, disposées à un mètre de la végétation périphérique pour empêcher l'accès des animaux aux haies et broussailles. Dans le même ordre d'idée il faut éviter, si possible, les accès aux aires de pâture comportant des passages en sous-bois où les animaux peuvent être agressés par les tiques. La survie des tiques est sensiblement diminuée lorsque le couvert végétal est ras, ce qui les expose directement aux facteurs climatiques. Les buissons, les touffes d'herbes hautes, les zones ombragées constituent des refuges où la survie peut être extrêmement longue. Le désherbage chimique ou un surpâturage limité, qui fait disparaître temporairement le couvert végétal, combiné à un apport alimentaire complémentaire aux chevaux, a un effet défavorable sur la survie des tiques (Martin, 1998). Certains micromammifères sont hôtes des formes immatures, leur destruction peut contribuer à la diminution du nombre de tiques, mais ces rongeurs sont parfois aussi des prédateurs des tiques...

La lutte biologique peut être définie, au sens strict, comme l'utilisation d'organismes vivants pour lutter contre les arthropodes ; par extension, cette définition peut aussi inclure les produits issus de ces organismes. Il s'agit d'utiliser des insectes ou des nématodes afin de parasiter les tiques, ainsi que des prédateurs (oiseaux, fourmis) (Martin, 1998).

La lutte immunologique consiste à exploiter la résistance spontanée ou acquise de l'hôte vis-à-vis des tiques. Cette méthode, permettant d'immuniser l'animal contre le pathogène, a surtout été étudié chez les bovins. Quelques essais de vaccination ont été effectués sans résultats probants (Allen, 1994).

V. DIAGNOSTIC DE L'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE EQUINE

Le diagnostic doit être fait rapidement, dès l'expression des symptômes, pour limiter le risque de voir s'installer des complications (Bakken *et al.*, 1996 ; Bakken et Dumler, 2000).

A) Diagnostic épidémio-clinique

L'anaplasmose a longtemps été considérée comme une maladie rare, mais l'amélioration des méthodes diagnostiques et de meilleures connaissances de la maladie ont permis d'augmenter considérablement son diagnostic dans diverses régions du globe.

1) Incidence saisonnière

La maladie étant vectorisée, son incidence clinique est liée à la saisonnalité des tiques. La période de plus grande activité des tiques correspond à des conditions climatiques douces et humides. En France, on observe deux pics d'activité : au printemps et à l'automne.

En Europe, la séroprévalence des anaplasmoses granulocytaires du bétail augmente progressivement lors des périodes de pâture, au printemps, et diminue avec le retour à la stabulation au début de l'automne, ce qui est lié à l'exposition au vecteur *Ixodes sp.* (Brouqui, 1999 ; Joncourt, 2003).

Il faut toutefois garder en mémoire la possibilité de formes latentes (infections chronique et subclinique possibles chez les ruminants et les rongeurs notamment) et le maintien de cycles parallèles faisant intervenir différents hôtes intermédiaires et réservoirs. Ainsi, une étude de Magnarelli et ses collègues (1999a) a mis en évidence des PCR positives, quelle que soit la saison, sur des chevaux Nord-Américains.

2) Eléments symptomatiques

L'anaplasmose granulocytaire équine doit être suspectée dans tout syndrome d'hyperthermie indéterminée. Dans les régions endémiques, un simple abattement accompagné de fièvre doit faire rentrer la maladie dans le diagnostic différentiel de ce syndrome (Amory et Pitel, 2007). De plus, l'infection passe souvent inaperçue et plusieurs études épidémiologiques rapportent des sérologies positives sur des chevaux n'ayant jamais exprimé de symptômes. Ainsi, dans certaines régions de Californie, 50 % de chevaux cliniquement normaux ont des anticorps contre *Anaplasma phagocytophilum* (Madigan et Gribble, 1987), comme cela a déjà été souligné plus haut.

3) Signes biologiques : variations hématologiques

La numération formule sanguine montre le plus souvent une thrombocytopénie marquée ainsi qu'une leucopénie due à une neutropénie transitoire et une lymphopénie marquée. Une anémie modérée ainsi qu'une hyperbilirubinémie peuvent également être mises en évidence (Franzén *et al.*, 2005 ; Nolen-Watson *et al.*, 2004).

B) Diagnostic différentiel

1) *Diagnostic différentiel du syndrome « piro-like »*

Depuis quelques années en France, un syndrome particulier rencontré chez les équidés a été dénommé syndrome « piro-like » par les vétérinaire équins. Ce syndrome englobe les maladies infectieuses qui sont associées à un tableau clinique de fièvre récurrente d'origine inconnue, sans symptôme caractéristique. Il peut parfois être accompagné d'ictère, d'anémie et/ou d'œdèmes périphériques (Tableau 2).

Les principales maladies infectieuses entrant dans le diagnostic différentiel du syndrome avec abattement et hyperthermie sont :

- l'anaplasmose granulocytaire équine,
- les babésioses,
- la borréliose ou maladie de Lyme,
- La leptospirose,
- et l'anémie infectieuse équine (AIE).

En France, l'anaplasmose est encore peu connue, le vétérinaire pense en général d'abord à la leptospirose ou aux babésioses lors d'abattement et d'hyperthermie. La Camargue est connue pour être une région fortement endémique vis-à-vis des babésioses équines, des séroprévalences élevées pour *Babesia caballi* et *Theileria equi* ont été observées lors d'une enquête sérologique effectuée en 2002 dans la zone (20 % de chevaux positifs pour *Babesia caballi* et 64 % de positifs pour *Theileria equi* par le test de Fixation du Complément) (Leblond *et al.*, 2005b).

Tableau 2 : DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DU SYNDROME « PIRO-LIKE »

MALADIE	AGENT(S) RESPONSABLE(S)	ETIOLOGIE EPIDEMIOLOGIE	SYMPTOMES	EXAMENS COMPLEMENTAIRES - DIAGNOSTIC	TRAITEMENT
Anaplasmose équine	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	- Transmission par les tiques, - Nombreux séropositifs sains, - Incubation : 5-20 jours, - Infection des polynucléaires neutrophiles.	<u>Variables :</u> - Fièvre - puis abattement, anorexie, - œdèmes des membres, - pétéchies, - ictère, ataxie - et/ou orchite.	- <u>Numération formule sanguine</u>: leucopénie avec lymphopénie, neutropénie anémie, thrombocytopénie, augmentation de la bilirubine non conjuguée. - <u>Frottis sanguin périphérique</u> : Morulas visibles dans les polynucléaires neutrophiles. - <u>Sérologie couplée par IFI ou ELISA</u> - <u>PCR</u> : sur sang, rate	- Oxytétracycline 7mg/kg IV SID, - pendant 5-7 jours, - guérison spontanée possible.
Babésioses	<i>Theileria equi</i> <i>Babesia caballi</i>	- Transmission par les tiques, - Incubation : 10-19 jours pour <i>Theileria equi</i> 7-30 jours pour <i>Babesia caballi</i>, - Infection des lymphocytes puis des globules rouges pour <i>Theileria equi</i>, Uniquement des globules rouges pour <i>Babesia caballi</i>.	<u>Souvent uniquement :</u> - Forte hyperthermie, - abattement, - et/ou anorexie. <u>Autres symptômes très variables :</u> - perte de poids, - tachycardie, - polypnée - couleur des muqueuses variable, - Urine +/- foncée. <u>Si chronique :</u> - fatigabilité, - baisse de performances, - amaigrissement, - oedèmes, - muqueuses pâles.	- <u>NFS</u> : +/- anémie, thrombocytopénie, monocytose, hyperfibrinogénémie, Hypoalbuminémie. - <u>Biochimie</u> : Parfois augmentation des enzymes hépatiques (PAL, ASAT, GGT) et de la créatinine kinase (CK), hyperbilirubinémie, Diminution phosphore et fer. - <u>Frottis sanguin</u> : peu sensible, à faire en phase d'hyperthermie, permet de différencier <i>Theileria equi</i> et <i>Babesia caballi</i>. - <u>Sérologie</u> : Fixation du complément, IFI, ELISA. - <u>PCR</u>	- Imidocarbe (Carbésia®) - <i>Theileria equi</i> : 4 mg/Kg IM 3 à 5 fois à 72h d'intervalle, - <i>Babesia caballi</i> : 2 mg/kg IM 2 fois à 24h d'intervalle.

Borréliose	<i>Borrelia burgdorferi</i>	- Transmission par les tiques, - Nombreux séropositifs sains	<u>Nombreux et variables :</u> - fièvre modérée, - léthargie, - anorexie, - raideur, - myosite, - arthrites avec distensions articulaires, - boiterie sporadique, - fourbure, - uvéite antérieure, - amaigrissement chronique, - (méningo) encéphalite, - avortement.	- <u>Biopsie cutanée ou culture :</u> Mise en évidence des spirochètes - <u>Sérologie couplée par IFI</u> - <u>PCR :</u> sur sang, LCR, liquide synovial.	- Oxytétracycline 6.6 mg/kg, 2 fois/j. - > 2 semaines
Leptospirose	<i>Leptospira pomona</i> <i>L. grippotyphosa</i> <i>L. australis...</i>	- Transmission par l'urine contaminée via la litière, les aliments, l'eau ou les prairies, - Nombreux séropositifs sains	<u>Rarement d'expression clinique</u> <u>Symptômes possibles :</u> - uvéite aiguë ou récurrente, - avortement/mortalité périnatale/faiblesse et ictère chez le poulain, - très rarement : dysfonctionnement rénal ou hépatique.	- <u>Sérologie couplée :</u> IFI Micro-agglutination - <u>PCR :</u> sur organes, humeur aqueuse, LCR, sang, urine	- Controversé - Pénicilline 10-15 000 UI/kg IM BID - Streptomycine 10 mg/kg IM BID - Oxytétracycline 5-10 mg/kg IV - 1 semaine
Anémie infectieuse équine	Lentivirus de la famille des Retroviridés	- Transmission par un vecteur mécanique, insecte hématophage ou de manière iatrogène ou transplacentaire, - Incubation : 1 à 3 semaines, jusqu'à 3 mois.	<u>3 expressions cliniques possibles :</u> - aiguë : forte fièvre, dépression, anorexie, thrombocytopénie +/- diathèse hémorragique ; - chronique : fièvre, dépression et thrombocytopénie +/- anémie récurrentes, amaigrissement, œdèmes déclives ; - asymptomatique	- <u>NFS :</u> Thrombocytopénie, leucocytose neutrophilique, anémie si chronique, +/- hyperglobulinémie chez porteurs asymptomatiques, - <u>Biochimie :</u> élévation enzymes hépatiques et bilirubine, hypoalbuminémie, - <u>Sérologie :</u> test de Coggins - <u>PCR</u> - <u>Nécropsie</u>	- MLRC : abattage systématique

(réalisé d'après Amory et Pitel, 2007)

2) Diagnostic différentiel des symptômes nerveux

Le principal symptôme nerveux rapporté lors d'anaplasmose est une ataxie réversible après guérison. Sensu stricto, l'ataxie désigne les perturbations du mouvement résultant d'un déficit du contrôle que les informations sensibles exercent sur son déroulement (Cambier *et al.*, 2008). Parmi les maladies infectieuses pouvant provoquer des troubles nerveux similaires, peuvent être citées entre autres:

- la rhinopneumonie à Herpes virus équin de type I, qui est une maladie cosmopolite touchant surtout les femelles en fin de gestation (avortement) et moins fréquemment les poulains (Khon et Fenner, 1987). Les signes nerveux apparaissent 7 à 10 jours après un avortement ou un épisode infectieux des voies respiratoires supérieures touchant le même animal ou un autre individu du même élevage.

- la maladie de West Nile est une arbovirose, transmise par des arthropodes hématophages, essentiellement des moustiques. Elle peut occasionnellement toucher l'homme et le cheval, qui sont considérés comme des impasses épidémiologiques. En France, deux épizooties de West Nile ont été signalées en Camargue, en 1962-1963 et plus récemment en 2000 (Leblond *et al.*, 2005b).

- l'encéphalomyélite à protozoaire, qui est causée par un protozoaire du genre *Sarcocystis*, baptisé *Sarcocystis neurona*. Aux Etats-Unis, elle représente l'affection la plus fréquemment responsable de troubles de la démarche d'origine médullaire après les traumatismes et l'ataxie spinale du poulain (Vrins, 1990).

C) Diagnostic de laboratoire

1) *Frottis sanguin*

La mise en évidence de morulas par microscopie optique sur un frottis sanguin permet un diagnostic relativement précoce de l'anaplasmose et est ainsi un moyen diagnostic facilement réalisable par le praticien (Raoult et Brouqui, 1998).

Les premières morulas apparaissent dans les neutrophiles en moyenne 2 à 3 jours après le début des signes cliniques et persistent pendant environ 7 à 8 jours (Franzén *et al.*, 2005).

Les bactéries sont sous la forme d'inclusions basophiles, bleu sombre à bleu gris pâle (coloration May-Grünwald-Giemsa), dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles et parfois éosinophiles. Ces inclusions sont rondes, parfois pléomorphiques (surtout en culture) et situées en général contre le noyau des cellules parasitées (Raoult et Brouqui 1998).

- Sensibilité :

La bactérie infeste relativement peu de neutrophiles, le pourcentage d'inclusions neutrophiliques variant de 0,5 à 16 % en fonction du temps d'évolution de l'infection et des chevaux (Franzén *et al.*, 2005). La bactériémie est transitoire et montre un maximum à la fin et après la période fébrile (Pusterla *et al.*, 2002). De plus, si un traitement à base d'oxytétracycline est déjà mis en place, les neutrophiles infectés ne sont pas retrouvés (Bakken et Dumler, 2000). Cet examen direct a donc une faible sensibilité. Ainsi, même s'il est simple et peu onéreux pour le praticien de réaliser ce frottis, celui-ci a peu de chance de retrouver des morulas.

Il est possible d'augmenter la sensibilité en examinant un frottis après leucoconcentration, de manière à augmenter le nombre de neutrophiles dans le frottis. La technique consiste en une double centrifugation permettant de récupérer la couche leucoplaquettaire (« buffy-coat ») et de l'étaler sur lame (Madigan, 1993).

- Réalisation d'un frottis avec leucoconcentration :

- prélever 5 ml de sang sur tube EDTA,
 - centrifuger 5 minutes à 3 000 tours par minute,
 - enlever le surnageant,
 - récupérer la couche intermédiaire (leucocytaire) dans un tube à hématocrite,
 - centrifuger 3 minutes à 12 000 tours par minute,
 - couper le tube au niveau de la couche intermédiaire,
 - étaler la couche intermédiaire ou « buffy coat » sur une lame porte objet,
 - colorer au May-Grünwald-Giemsa (MGG) ou au Diff Quick® (Rikihisa, 1991),
 - observer au microscope optique à l'objectif 100, avec de l'huile à immersion,
 - un maximum de champs doivent être observés pour optimiser la probabilité de trouver des morulas.
- } Leucoconcentration

- Spécificité :

Le risque de trouver des faux positifs n'est pas négligeable. Les morulas peuvent en effet être facilement confondues avec d'autres images en microscopie optique :

- images d'erythrophagocytose, notamment observées lors de babésioses,
- plaquettes phagocytées ou en superposition avec un leucocyte,
- corps lymphoglandulaires, qui sont des fragments de cytoplasme provenant de cellules fragiles écrasées lors de l'étalement,
- matériel nucléaire phagocyté,
- microscopiques bulles d'air...

Le diagnostic ne doit être considéré comme certain que si plus de trois neutrophiles contenant des inclusions caractéristiques sont observés, ce qui permet de limiter le nombre de faux positifs dus à un artéfact (Rikihisa, 1998 ; Madigan et Pusterla, 2000).

Par ailleurs, même si la technique est bien réalisée, la détection dans le sang des corps d'inclusion dépend du moment du prélèvement par rapport au stade de l'infection, de la technique de coloration et de l'habitude de l'opérateur à détecter ces inclusions (Van Andel *et al.*, 1998). C'est pourquoi, une recherche systématique d'inclusions devrait devenir un exercice de routine pour le vétérinaire, de manière à aiguïser son œil à la lecture.

Le frottis peut également mettre en évidence d'autres pathogènes entrant dans le diagnostic différentiel du syndrome « piro-like », comme les babesias, infectant les globules rouges.

2) Culture

Le « gold standard » pour le diagnostic microbien est la mise en évidence de la bactérie en culture. Or, *Anaplasma phagocytophilum* ne pousse pas sur un milieu gélosé (McDade *et al.*, 1969 ; Oaks *et al.*, 1977). Cependant, l'isolement et/ou la culture de la bactérie sont possibles *in vitro* avec : des granulocytes ou leurs précurseurs (Woldehiwet et Scott, 1982 ; Klein *et al.*, 1997), plusieurs lignées de cellules sanguines humaines - HL-60, KG-1, THP-1 - (Goodman *et al.*, 1996) et des lignées d'adhérence des tiques - IDE8, ISE6 - (Munderloh *et al.*, 1996). Mais, encore aujourd'hui, la culture reste difficile et peu de laboratoires possèdent l'équipement pour la réaliser (Goodman *et al.* 1996). De plus, il faut plusieurs jours, voire semaines, avant de pouvoir identifier la bactérie en culture avec la lignée HL-60 et une confirmation du diagnostic est nécessaire. Cette confirmation passe par une méthode de PCR et le séquençage de gènes spécifiques de la bactérie ou

la mise en évidence d'antigènes d'*Anaplasma phagocytophilum*. C'est pourquoi, jusqu'en 2004, seulement 50 isolats ont été cultivés, la plupart issus de malades humains américains, et un petit nombre provenant d'hommes européens ou d'animaux (Dumler et Brouqui, 2004).

Pour pallier cette difficulté, les chercheurs ont étudié la capacité que pourraient avoir certaines molécules pour stimuler la croissance d'*Anaplasma phagocytophilum* en culture. Ils ont ainsi trouvé que des inducteurs de la différenciation des promyélocytes de la lignée des granulocytes, comme le diméthylsulphoxide (DMSO) ou les acides rétinoïques, peuvent augmenter la propagation d'*Anaplasma phagocytophilum* dans les cellules HL-60 en culture. Zeman et ses collègues (2002) ont travaillé sur le sodium « valproate », un sel d'acide di-*n*-propylacétique (VPA), connu pour déclencher la différenciation cellulaire lors de maladies du système hématopoïétique. Ils ont pu mettre en évidence que le NaVPA, à des concentrations supérieures à 0.3 mM, facilite la croissance initiale de la bactérie dans les cellules HL-60. Cette molécule peut donc améliorer la culture de la bactérie, ce qui peut être utile en vue d'un diagnostic et faciliter sa survie en culture, permettant ainsi des études *in vitro*.

3) Sérologie

- Immunofluorescence indirecte (IFI)

L'IFI consiste à faire réagir le sérum du patient, après différentes dilutions, sur une préparation de cellules infectées par *Anaplasma phagocytophilum*. La fixation des anticorps spécifiques sur ces cellules est révélée par un conjugué marqué avec un fluorochrome. Celui-ci émet de la fluorescence sous un microscope adapté.

Cette technique a longtemps été utilisée pour le diagnostic des ehrlichioses et fait toujours référence (Dumler et Brouqui, 2004).

La lecture de la fluorescence n'est pas aisée et demande une certaine expérience et un équipement de laboratoire important. La sensibilité et la spécificité sont bonnes, mais dépendent donc du matériel et du lecteur. Par ailleurs, elle permet de réaliser assez rapidement un examen sur plusieurs échantillons à la fois.

Pour établir un diagnostic de certitude d'anaplasmose granulocytaire équine, il faut réaliser 2 sérologies à 2-3 semaines d'intervalle, la première étant faite au moment des symptômes. Si le taux d'anticorps est multiplié par 4 entre la 1^{re} et la 2^e sérologie, on peut affirmer que le cheval est bien atteint d'anaplasmose (Walker., 2000).

Si une seule sérologie est réalisée, le diagnostic ne peut pas être considéré comme certain. En effet, les anticorps persistant longtemps, la sérologie peut être positive alors que le cheval a été contaminé il y a plusieurs mois et que la bactérie n'est plus présente. Au contraire, un cheval peut avoir une sérologie négative alors qu'il est atteint d'anaplasmose, car il faut un certain temps pour qu'une réaction sérologique se mette en place.

- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

L'ELISA consiste à révéler la liaison antigène-anticorps en y attachant un marqueur, enzyme capable d'induire une réaction colorée.

Un test ELISA utilisant la protéine recombinante p44, très spécifique d'*Anaplasma phagocytophilum*, a été développé et évalué. Ce test a été comparé à l'IFI et présente une sensibilité et une spécificité globales identiques (Magnarelli *et al.*, 2001a).

Les résultats de cette étude comparative entre l'IFI et l'ELISA sont développés ci-après (Tableau 3 et 4).

- IFI versus ELISA

Tableau 3 : IFI versus ELISA

Titre en Anticorps	NOMBRE DE CHEVAUX	
	IFA	ELISA
80 -160	20	4
320 - 640	13	13
1 280 - 2 560	1	7
5 120 - 10 240	0	4
20 480 – 40 960	0	3

(d'après Magnarelli et al., 2001a)

Pourcentage de positifs en IFI : 79 %

Pourcentage de positifs en ELISA : 72 %

Tableau 4 : Titre en anticorps anti-P44 d'*Anaplasma phagocytophilum*

IFA	ELISA	POURCENTAGE DE CHEVAUX
+	+	63
+	-	16
-	+	9
-	-	12

(+ : résultat positif ; - : résultat négatif) (d'après Magnarelli et al., 2001a)

L'antigène utilisé pour l'ELISA est la protéine P44 de la souche NCH-1 d'*Anaplasma phagocytophilum*, qui permet d'établir un diagnostic très sensible et spécifique (Magnarelli et al., 1999a). La souche NCH-1 a été choisie, car elle est originaire du Nord des Etats-Unis et c'est à partir de cette souche qu'a été produite la protéine recombinante P44 utilisée pour la technique ELISA de cette étude.

L'intégralité de la paroi bactérienne a servi pour la détection par IFI.

Cette étude rétrospective, menée sur 43 chevaux, a montré une similitude significative entre les pourcentages obtenus par la méthode ELISA et l'IFI (75% des cas).

Par contre, il semblerait que l'ELISA permette de détecter des anticorps à des dilutions plus importantes que l'IFI et ainsi d'obtenir des titres en anticorps plus élevés. La sensibilité supérieure de l'ELISA peut être attribuée à l'utilisation d'une protéine hautement purifiée, qui permet la formation de complexes antigène-anticorps, sans interférence avec les autres composants de la membrane, qui pourraient limiter ou bloquer la formation du complexe.

Selon les résultats de cette étude, la méthode ELISA est sensible, spécifique et reproductible. De plus, c'est une méthode simple, automatisée et standardisée, permettant de tester de nombreux sérums simultanément ce qui est très intéressant pour les études épidémiologiques. Par contre, si le résultat n'est pas en adéquation avec la clinique, il faut utiliser une autre méthode pour avoir un diagnostic de certitude.

- Différencier une infection récente d'une infection précédente par sérologie ?

Sur quatre chevaux, des sérologies successives par ELISA ont mis en évidence 4 paliers de diminution du taux d'anticorps sur une période de 2 à 5 mois selon le cheval (Magnarelli *et al.*, 2001a). Ces chevaux avaient un diagnostic de certitude d'anaplasmose et ont été traités en conséquence (traitement antibiotique adapté). Ceci montre bien que les anticorps peuvent persister plusieurs semaines. Une autre étude de Van Andel *et al.* (1998) avait déjà montré des sérologies positives persistantes pendant plusieurs mois sur des poneys ayant reçu un traitement antibiotique.

En conséquence, il serait intéressant de disposer de techniques de laboratoire pouvant différencier les immunoglobulines. En particulier, la mise en évidence des IgM serait une aide pour l'identification des infections récentes et pourrait jouer un rôle dans le choix d'une autre méthode diagnostic pour vérifier l'hypothèse d'anaplasmose. Magnarelli *et al.* (2001b) ont voulu, dans une autre étude utilisant l'ELISA, différencier les IgG des IgM. Les résultats ont été décevants puisqu'ils n'ont trouvé que très peu de positifs pour les IgM alors que la détection des IgG a été beaucoup plus facile (Tableau 5). Ils n'ont pas pu valider leur méthode pour différencier une infection récente d'un contact ancien avec le pathogène.

Tableau 5 : Détection d'ADN d'*Anaplasma phagocytophilum* et d'anticorps spécifiques de P44 recombinante dans des sérums issus de chevaux malades du Connecticut et l'état de New York

Nombre de sérums testés	Nombre de PCR positives	ELISA, NOMBRE DE POSITIFS POUR :		
		Ensemble des Immunoglobulines	IgM	IgG
38	20	27	7	29

(d'après Magnarelli *et al.*, 2001b)

- Réactions croisées, faux positifs ?

Dans la bibliographie concernant l'homme, certains auteurs rapportent une possible réaction croisée entre *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi* (Wormser *et al.*, 1996 et 1997). Cependant, il peut s'agir également de co-infection ou de co-exposition compte tenu de l'épidémiologie très proche de ces deux bactéries (Brouqui, 1999).

- Sérologie : en pratique

Dans l'expérience de Franzén *et al.* (2005) sur 6 chevaux inoculés avec la bactérie, tous les chevaux ont eu des sérologies positives (IFI) dans les 12-16 jours après l'inoculation avec un taux maximal d'anticorps 3 à 7 jours après la séroconversion. Seulement 2 des 6 chevaux étaient encore fébriles ou exprimaient des signes cliniques après la séroconversion. Les titres en anticorps maximum furent de 1:1280 à 1:5120°.

4) PCR

- Principe et réalisation (Gresanleux, 2006) :

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR, Polymerase Chain Reaction, en anglais) est une technique de biologie moléculaire relativement récente, permettant une amplification génique. La biologie moléculaire, dont la PCR, s'est beaucoup développée à partir de la découverte de l'ADN en 1943, et a pris un réel essor depuis les années 1970-1980.

La réaction de polymérisation en chaîne a été mise au point en 1983 par Mullis, ce qui lui a valu le prix Nobel de chimie en 1993. Elle est désormais un outil diagnostique de choix, notamment pour les maladies dont le tableau clinique est peu spécifique comme l'anaplasmose.

La PCR est basée sur la détection et l'amplification de séquences génétiques spécifiques du pathogène recherché. Elle permet de multiplier un fragment d'ADN ciblé presque à l'infini, même s'il était initialement en quantité infime (quelques copies, voire une copie unique). Cette méthode utilise de manière cyclique les propriétés d'enzymes, les « ADN-polymérases », et plus précisément leur capacité à synthétiser un brin d'ADN complémentaire à partir d'un brin initial, la matrice, et d'une amorce fixée à celui-ci (Boucraut-Baralon, 2001 et 2002) .

Le prélèvement analysé doit donc contenir l'ADN de l'agent pathogène. *Anaplasma phagocytophilum* infectant les polynucléaires neutrophiles et un peu les éosinophiles, le prélèvement de choix est constitué par du sang. Le sang doit être prélevé sur tube EDTA pour éviter toute coagulation et doit être acheminé au laboratoire dans les plus brefs délais et sous couvert du froid pour éviter une dégradation des acides nucléiques. Une biopsie de rate est également envisageable, notamment pour un diagnostic *post mortem*.

- PCR : en pratique

La PCR devient positive à partir du 3-6^e jour après l'inoculation et reste positive jusqu'au 18-21^e jour. Dans l'étude de Franzén *et al.* (2005) la PCR s'est avérée positive, chez les 5 chevaux inoculés avec *Anaplasma phagocytophilum*, 2-3 jours avant l'apparition des symptômes et l'est restée 4 à 9 jours après que la température rectale est revenue dans les normes. La PCR serait donc plus précoce que la détection des inclusions neutrophiliques pour le diagnostic puisqu'elle est positive en moyenne 4 à 7 jours avant que les morulas ne soient visibles.

- Avantages :

- L'information génétique est présente dès le premier contact, même en l'absence de réaction immunitaire.
- La PCR permet un diagnostic plus précoce que le frottis et la sérologie.
- Elle permet la détection de la bactérie, même présente en quantité infime.
- Elle semble hautement spécifique et sensible (Madigan et Pusterla, 2000).
- Elle permet la confirmation d'une sérologie difficile à interpréter.
- Elle pourrait s'envisager avant d'arrêter un traitement pour vérifier que la bactérie a bien été éliminée de l'organisme.

- Inconvénients :

- Un coût non négligeable.
- Nécessité d'envoyer une prise de sang rapidement au laboratoire.
- Risque de faux positifs par contamination du prélèvement possible.
- Cette technique reste non standardisée et la sensibilité et la spécificité des tests peuvent beaucoup varier entre laboratoires.

Le coût non négligeable, le temps et le matériel nécessaires constituent la limite de cette technique qui n'est proposée que par quelques laboratoires spécialisés (Fio, 1996).

- Une technique en continuel essor

L'anaplasmose est une des rares maladies infectieuses qui a été confirmée pour la première fois chez l'homme par une technique moléculaire plutôt que par culture ou sérologie (Bakken *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1994). Les premiers essais étaient basés sur l'amplification par PCR d'un gène très conservé *rrs* codant l'ARNr 16S, le plus souvent suivi d'une analyse de la séquence pour confirmer la spécificité du gène. Depuis, la culture de la bactérie et les nombreuses recherches sur cet organisme et son génome ont apporté de nouvelles connaissances permettant une optimisation du diagnostic moléculaire.

Massung et Slater (2003) ont montré que la PCR basée sur l'amplification des gènes *rrs* et *msp2* peut détecter la bactérie avec jusqu'à moins de 1/4 de cellules infectées. Ils ont également constaté une différence significative de spécificité et de sensibilité selon le kit utilisé pour l'amplification des acides nucléiques. Leur étude a démontré qu'il vaut mieux préférer certains gènes à d'autres pour la détection de la bactérie et qu'un résultat exact et reproductible n'est pas toujours possible.

L'étude de Edelman et Dumler, en 1996, menée chez l'homme et basée sur une méthode d'amplification de *rrs*, a permis de détecter la bactérie pour moins d'une cellule infectée par millilitre de sang. 6 des 7 patients atteints ont effectivement eu une PCR positive, ce qui équivaut à une sensibilité de 86%. De plus, aucun des 10 patients séronégatifs avec une symptomatique similaire n'ont montré de PCR positive ce qui donne à leur méthode une spécificité de 100 %.

Cependant, d'autres études utilisant également l'amplification de ce gène ont donné des résultats plus variables et, sur l'ensemble des études, lorsque les résultats sérologiques et la PCR sont comparés, la sensibilité du diagnostic n'est que de 54%. La sensibilité la plus basse est surtout observée chez des patients européens, pour qui l'expression clinique est généralement plus faible et le nombre de cellules infectées moins important (Dumler et Brouqui, 2004).

Devant la variabilité de cette méthode, des investigations ont été développées sur d'autres gènes cibles. Ainsi, l'opéron *groESL*, initialement utilisé pour les comparaisons phylogénétiques, a aussi un intérêt pour le diagnostic (Sumner *et al.*, 1997). Bien que la sensibilité soit la même qu'avec l'amplification de *rrs*, la diversité de ce gène selon les souches pourrait permettre d'estimer la plus ou moins grande virulence ou pathogénicité de la souche isolée (Petrovec *et al.*, 2002).

D'autres recherches incluent l'amplification de *gltA* (citrate synthétase) (Inokuma *et al.*, 2001), *rpoB* (subunité de l'ARN polymérase β) (Taillardat *et al.*, 2003) et le gène *ftsZ* (Lee *et al.*, 2003) intervenant dans le cycle de la bactérie.

L'utilisation de l'amplification de *ankA*, gène codant une protéine cytoplasmique de 160 kDa, ou de *msp2*, aussi connue sous le nom de *p44*, codant pour une protéine de surface immunodominante de 40-49 kDa (Murphy *et al.*, 1998 ; Caturegli *et al.*, 2000) sont de plus en plus usitées. Ces 2 gènes existent en de nombreuses copies dans le génome de la bactérie. Une étude rétrospective comparant l'amplification de *ankA* et de *rrs* par PCR, à partir de patients ayant une sérologie et une culture positive, a montré une sensibilité de seulement 48 % avec *rrs* et de 95 %

avec *ankA*, la spécificité étant de 100 % dans les 2 cas. Les premiers essais avec *msh2* à partir de sang de cervidé ont eu une sensibilité deux fois plus importante qu'avec *rrs* (Magnarelli *et al.*, 1999b). Par contre, la même sensibilité est identique sur sang humain associé à une sérologie (Ijdo *et al.*, 2000).

Cependant, un problème récurrent des méthodes moléculaires est la comparaison avec un test de référence tel que la sérologie ou la culture. Ainsi, dans une étude sur l'amplification par PCR de *msh2*, 41 % des patients avec une PCR positive n'ont jamais développé d'anticorps contre l'*Anaplasma phagocytophilum* (Ijdo *et al.*, 2000). Ceci peut être expliqué par une faible spécificité, une contamination, un autre problème technique ou la mise en place d'un traitement précoce. Cette dernière hypothèse est peu probable, car une recherche a montré que même lors de la mise en place d'un traitement précoce, les patients développaient une sérologie positive (Bakken *et al.*, 2002 ; Lotric-Furlan *et al.*, 2001). C'est pourquoi, chez l'homme en tout cas, un résultat PCR positif seul ne suffit pas pour avoir un diagnostic de certitude. Il faut y associer une deuxième PCR avec un autre gène cible, une sérologie, une culture ou la visualisation de morulas dans le sang périphérique (Bakken et Dumler., 2000 ; Walke., 2000).

Nous sommes donc en droit de nous demander dans quel cas utiliser la PCR :

- Peut-elle permettre une évaluation de l'efficacité d'un traitement ?
- Doit-on la réaliser sur des tiques retrouvées sur un cheval en région endémique ?

Sachant qu'il n'existe pas à ce jour de résistance au traitement à la doxycycline ou la rifampicine décrite chez l'homme pour *Anaplasma phagocytophilum* (Klein *et al.*, 1997 ; Maurin *et al.*, 2003), et qu'en moins de 48h après la mise en place du traitement il y a une amélioration clinique, l'usage d'un suivi PCR lors du traitement paraît peu intéressant (Bakken et Dumler, 2000 ; Agüero-Rosenfeld *et al.*, 1996).

Aucune étude sur l'intérêt d'une prophylaxie antibiotique suite à une morsure de tique n'a été réalisée. Les effets secondaires des tétracyclines ne sont pas négligeables et la possibilité de trouver une PCR négative sur une tique n'exclut pas que le cheval ait été piqué par une autre tique infectée. Une PCR systématique sur les tiques retrouvées sur un animal n'est, par conséquent, pas aussi intéressante qu'escompté (Dumler et Brouqui., 2004).

A l'heure actuelle, la PCR reste la méthode de choix pour le diagnostic précoce, mais doit être accompagnée d'une clinique évocatrice et/ou d'autres moyens diagnostics tels que la sérologie, le frottis sanguin, voire la culture. Chez le cheval, quelques jours après la phase aiguë, la probabilité de détection de la bactérie par frottis ou PCR diminue, mais la possibilité d'avoir une sérologie positive augmente (Franzén *et al.*, 2005 ; Pusterla *et al.*, 2002).

D) Conclusion

Sachant que la réussite du traitement dépend de sa rapidité de mise en place, les cliniciens ayant recours à des analyses de laboratoire attendent rarement d'avoir le résultat pour commencer le traitement. Il serait donc intéressant que les laboratoires développent des méthodes diagnostiques rapides, réalisables au chevet du malade. La sérologie simple n'étant pas un moyen diagnostique sûr lors de la phase aiguë d'expression clinique et les symptômes pouvant être peu évocateurs, une détection spécifique du pathogène, la plus précoce possible, doit être développée pour aider le clinicien dans son choix thérapeutique.

Par ailleurs, d'autres pathogènes transmis par les tiques peuvent provoquer un tableau clinique similaire à celui de l'anaplasmose. Ainsi, il faudrait des méthodes permettant de détecter et de distinguer à la fois *Anaplasma phagocytophilum* mais aussi *Babesia caballi* et *Theileria equi*, responsables des babésioses, et *Borrelia burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme. Il serait alors possible d'éviter une thérapeutique « diagnostique » et d'instaurer précocement et directement le traitement approprié, ce qui permettrait de minimiser le risque de complications et augmenterait la rapidité de guérison. Au-delà de l'intérêt pour le patient, cela aiderait le vétérinaire à évaluer la prévalence de ces pathogènes et ainsi à estimer le risque relatif de transmission pour chacun d'eux. De plus, le vétérinaire éviterait de donner des antibiotiques à l'aveugle, ce qui est important pour prévenir la survenue d'antibiorésistances, sans oublier les effets secondaires liés à l'usage de tétracyclines.

Ce raisonnement pourrait même aller plus loin : demander aux laboratoires de développer des techniques moléculaires pour déterminer la concentration minimale inhibitrice d'antibiotique nécessaire pour la souche isolée ou la présence de gènes participant à la résistance aux antibiotiques.

VI. EXEMPLE D'ETUDE CLINIQUE ET DIAGNOSTIQUE

Une étude de Pusterla et ses collègues (2002) sur 2 chevaux (A et B) infectés expérimentalement par des tiques a donné des résultats intéressants.

Le premier jour correspond à la fin de la période d'exposition aux tiques vectrices d'*Anaplasma phagocytophilum*.

A) Eléments symptomatiques

Les 2 chevaux sont restés asymptomatiques jusqu'au 10^e jour post exposition (j.p.e.) inclus, puis ont développé les premiers symptômes : abattement, anorexie et fièvre (A : 38.8°C ; B : 39.4°C). La fièvre a persisté 4 jours avec un pic d'hyperthermie à 40°C au 12^e j.p.e. pour le cheval A. Rapidement après, est apparu un ictère (durant 4 jours, uniquement chez le cheval A), des pétéchies sur les muqueuses orales et nasales et sur la membrane nictitante (durant 6 jours pour A et 3 jours pour B), un œdème distal des 4 membres (durant 5 jours pour A et 2 pour B) et une réticence à la marche (durant 3 jours, uniquement pour A). Les signes cliniques du cheval A se sont arrêtés au 18^e j.p.e., ceux du cheval B au 13^e j.p.e.. Les symptômes ont donc duré une semaine chez le premier cheval et 3 jours chez le second. La guérison clinique a été spontanée et rapide.

B) Signes biologiques

La variation hématologique la plus importante fut une sévère thrombocytopénie à 10 000 et 9 000 plaquettes/ μ L respectivement pour A et B (valeurs normales : 100 000-300 000/ μ L) à partir du 13^e j.p.e. jusqu'au 21^e j.p.e. pour A. Le nombre de leucocytes, neutrophiles, lymphocytes et érythrocytes diminuèrent considérablement à l'apparition de la fièvre et revinrent à la normale au 19^e et 16^e j.p.e. respectivement pour A et B.

C) Frottis sanguin

Les premières inclusions furent observées, pendant la période fébrile (14^e et 12^e j.p.e.), dans environ 2-3% des neutrophiles. Le taux de neutrophiles contenant des morulas visibles a augmenté progressivement jusqu'à atteindre 26 % au 20^e jour chez A et 14 % au 14^e j.p.e. chez B. Il a ensuite diminué très rapidement, n'étant que de 1 % au 21^e j.p.e. pour A et non visible au 16^e j.p.e. pour B.

Dans cette étude, les morulas sont visualisables dans peu de neutrophiles et seulement après 1 à 3 jours d'expression clinique.

D) PCR

La PCR fut positive du 8^e au 23^e pour A et 24^e j.p.e. pour B (PCR positive durant 16 et 17 jours respectivement). La détection de la bactérie par PCR a donc commencé 4-6 jours avant la visualisation des morulas dans le sang périphérique et s'est terminée 2-9 jours après. Ceci est en adéquation avec des études précédemment menées où la PCR était positive durant 11-17j (Richter *et al.*, 1996 ; Reubel *et al.*, 1998).

Ainsi la PCR permettrait de poser un diagnostic avant l'apparition des signes cliniques (3 jours avant) et plusieurs jours après leur régression (5 à 10 jours après).

E) Sérologie

Les chevaux ont tous les deux séroconvertis au 14^e j.p.e. Les titres ont augmenté progressivement et étaient de 320 à la fin de l'étude.

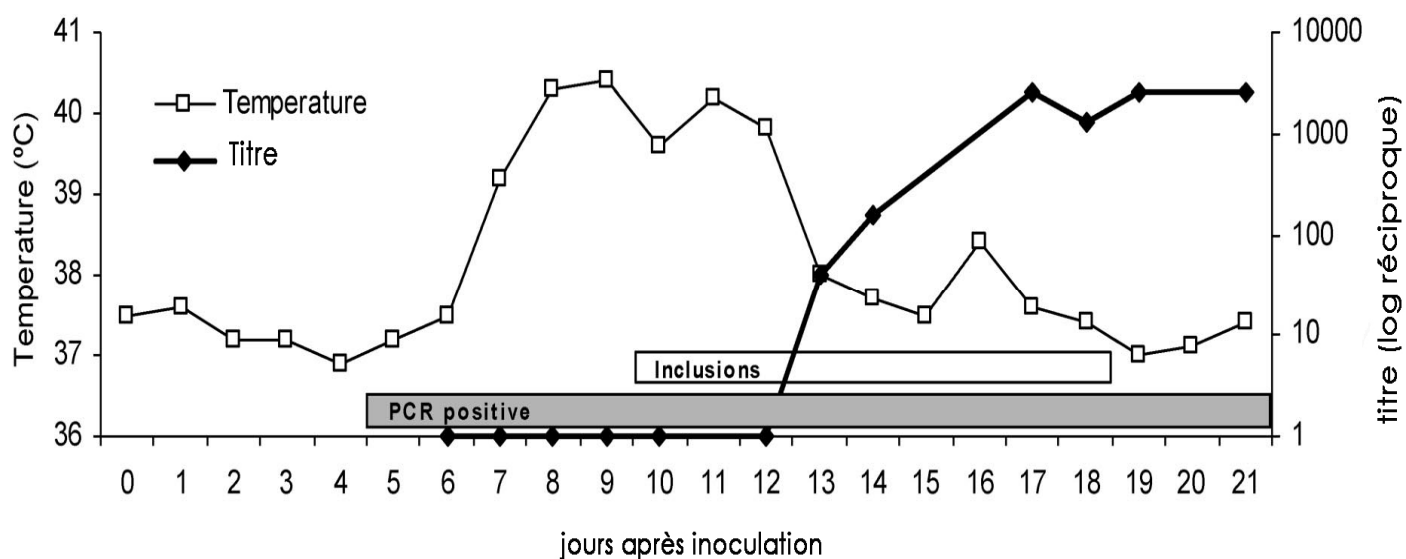
Pour ces 2 chevaux, la séroconversion a été rapide puisque la sérologie fut positive dès trois jours après le début de la phase clinique.

F) Conclusion

Cette étude, réalisée sur des chevaux naturellement infectés, donne des résultats équivalents à ceux obtenus lors d'expériences avec inoculation d'*Anaplasma phagocytophilum* (Franzén *et al.*, 2005), ce qui permet d'avancer les données suivantes :

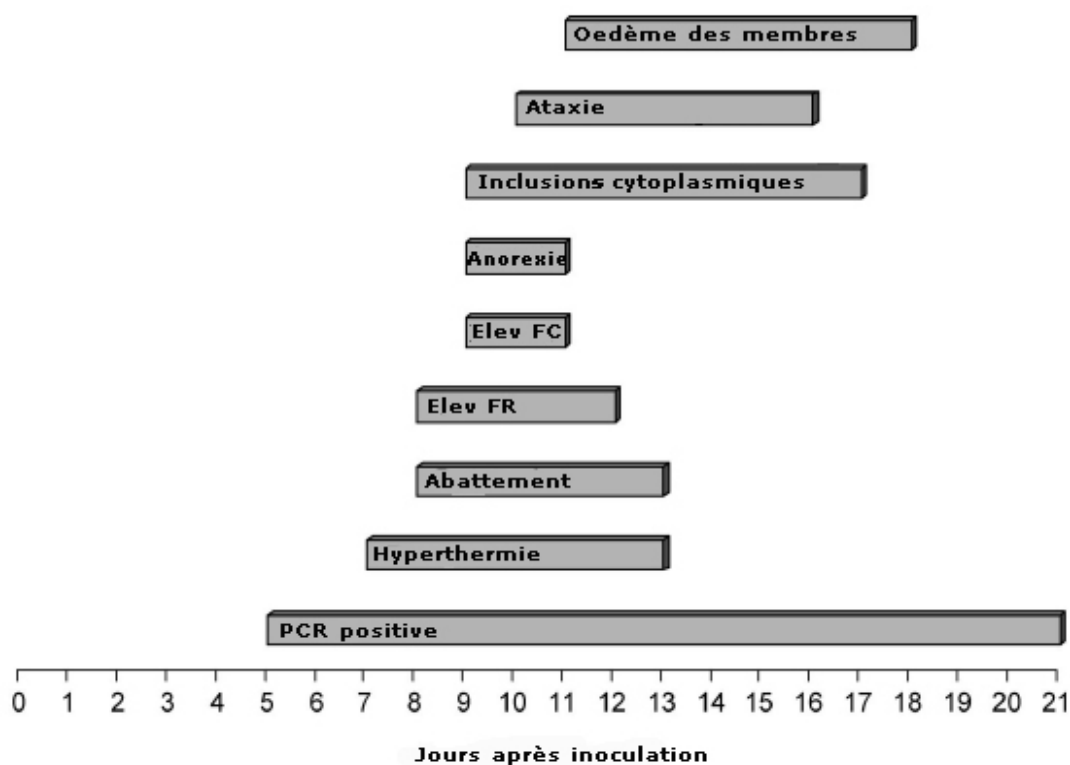
- durée d'incubation de 6-10 jours ;
- les symptômes comprennent notamment : hyperthermie, abattement, œdème distal des membres et dysorexie ;
- les signes hématologiques majeurs sont une thrombocytopénie marquée ainsi qu'une leucopénie, une neutropénie et une anémie ;
- la réalisation d'un frottis sanguin est assez décevante pour établir le diagnostic puisque peu de morulas sont visualisables et qu'elles n'apparaissent pas dès le premier jour d'expression clinique ;
- de même, les chevaux ne séroconvertissent qu'après plusieurs jours d'expression clinique, ce qui ne permet pas un diagnostic précoce. De plus, nous avons vu que des chevaux peuvent avoir une sérologie positive alors qu'ils ont été en contact avec la bactérie plusieurs semaines auparavant et qu'elle n'est donc pas à l'origine des symptômes.
- Par contre, la PCR semble être une technique de choix pour le diagnostic précoce puisqu'elle devient positive avant même l'expression clinique des symptômes et qu'elle le reste plusieurs jours (Figure 6 et 7).

Figure 6 : Suivi de paramètres diagnostiques d'anaplasmose équine après inoculation



(d'après Franzén et al., 2005)

Figure 7 : Suivi d'éléments diagnostiques et symptomatiques d'anaplasmose équine après inoculation



FR : fréquence respiratoire ; FC : Fréquence cardiaque

(d'après Franzén et al., 2005)

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

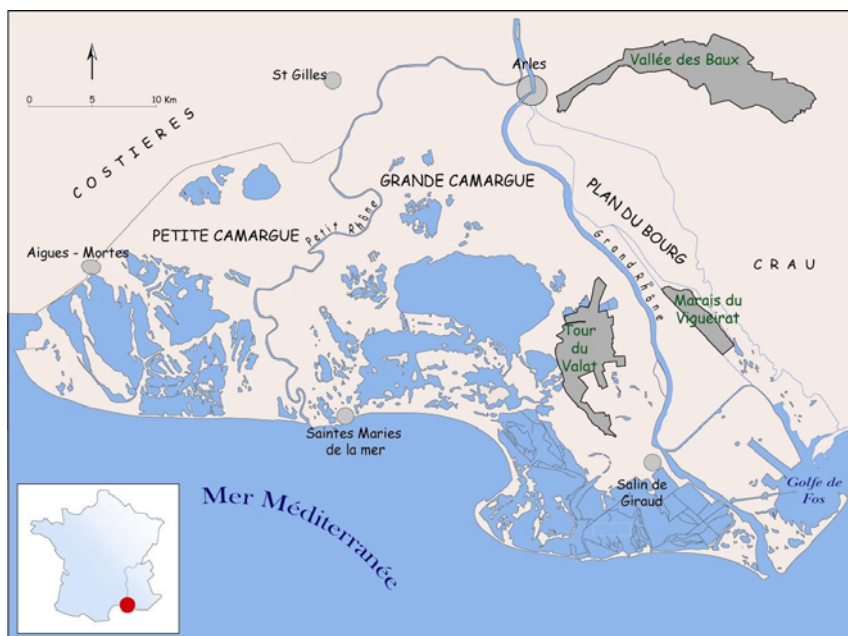
I. MATERIEL ET METHODES

A) Sélection de l'échantillon de chevaux

1) Zone géographique retenue

Il s'agit de la même zone d'étude que celle de S. Pradier, en 2001 (Pradier, 2003). Cette zone est délimitée par un périmètre défini par les villes de : Mauguio à l'Ouest, Tarascon et Beaucaire au Nord, Saint-Martin-de-Crau et Port-Saint-Louis à l'Est et la mer au Sud (Figure 8). Elle comprend ainsi les zones dites de la petite et de la grande Camargue, et recouvre 3 départements distincts : l'Hérault (34), le Gard (30), et les Bouches du Rhône (13). La surface de cette zone correspond à un carré d'environ 60 km de côté, allant de la garrigue au Nord à la Réserve Naturelle de Camargue au Sud. Bordée par la méditerranée, traversée par le Rhône, la région présente un profil mixte de zones humides et sèches, irriguées pour l'agriculture. Les zones humides, traversées de canaux, de roubines (fossés d'irrigation), d'étangs, et de marais, sont constituées de rizières, de roselières, de sansouires et de prairies humides qui sont d'excellents biotopes pour le développement de l'entomofaune. Ces zones marécageuses humides dans lesquelles évoluent quantité d'oiseaux, dont les oiseaux migrateurs, nous ont paru susceptibles d'héberger des chevaux au contact d'*Anaplasma phagocytophilum*.

Figure 8 : Carte de la Camargue



2) Population source

Le nombre de chevaux résidants dans la zone est estimé à 7 000 (données AFSSA et RGA 2000). La population cible était l'ensemble de ces chevaux. Cependant, du fait de l'existence de chevaux semi-sauvages, nous n'avons pu prélever qu'une partie de la population. Cette population source est définie par l'ensemble des chevaux nés, élevés et vivant toute l'année dans la zone définie précédemment, ou bien résidant en permanence dans la zone depuis au moins un an.

3) Sélection des écuries et des chevaux

Le terme d'écurie employé au sens large, regroupe en fait toutes les structures possédant des chevaux : particuliers, manades, centre équestres...

Les écuries ont été sélectionnées au hasard, parmi les clientèles des vétérinaires équins exerçant dans la zone d'étude, avec une répartition la plus homogène possible. Le facteur limitant a essentiellement été l'accord des propriétaires pour faire les analyses sérologiques de leur cheval. Dans la mesure du possible, tous les chevaux présents au moment de la visite ont été prélevés dans chaque écurie.

Les écuries sont géoréférencées (enregistrement de la position d'un site géographique d'après ses coordonnées) en coordonnées UTM WGS84 métriques à partir d'un appareil GPS. Pour tenter d'obtenir une répartition géographique homogène des écuries visitées, la zone d'étude a été divisée en mailles hexagonales d'un pas de 5 kilomètres. Finalement, des chevaux ont été prélevés dans 53 mailles.

Un questionnaire « site » permet de caractériser l'environnement, les bâtiments et les pâtures. Un questionnaire « cheval » rassemble les données individuelles relatives aux chevaux prélevés.

L'enquête de terrain effectuée de mai à juillet 2007, a permis de prélever des échantillons de sérum sur 643 chevaux dans 118 sites visités. Il été vérifié qu'aucun cheval n'était sous traitement médical ou ne l'avait été récemment. Bien que certains soient plus souvent à l'extérieur que d'autres, tous les équidés ont à un moment dans l'année eu accès aux pâtures.

B) Saisie des données et analyse statistique

Parmi les données recueillies, celles qui nous intéressent en tant que facteurs de risque potentiel de l'Anaplasmose sont : l'âge, la race, le sexe, l'utilisation des chevaux et leur date d'acquisition ainsi que les coordonnées géographiques des écuries, leur activité principale et le nombre de chevaux présents et prélevés.

Ces données ont été saisies dans un tableau Microsoft Excel ND et sous Access. Le logiciel Statview Abacus Concept ND a été utilisé pour l'analyse statistique.

II. ANALYSES DE LABORATOIRE

A) Collecte des sérums, acheminement et stockage

Le sang a été collecté sur tube sec et le sérum récupéré après centrifugation dans les 24h. Les tubes ont ensuite été conservés au froid à -12°C, après avoir été identifiés par un numéro.

A l'issue de l'enquête, les sérums ont été acheminés jusqu'à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort dans des containers, sous couvert du froid. Une fois sur place ils ont été stockés dans un des congélateurs du laboratoire, à -18°C.

B) Analyses sérologiques

Les analyses sérologiques ont été effectuées au laboratoire, de juin à novembre 2007. Tous les sérums ont tout d'abord été criblés à une dilution au 50^{ème}. Les sérums positifs à cette dilution ont ensuite été de nouveau testés à la même dilution et à des dilutions supérieures. Chaque lame d'IFI a été lue par deux opérateurs, en double aveugle.

1) *Immunofluorescence Indirecte : criblage*

- Matériel :

- 643 sérums de cheval ;
- Phosphate Buffered Saline (PBS) :
 - Tampon utilisé comme diluant et solution de lavage en immunofluorescence indirecte.
 - Composition : 7.650 g de chlorure de sodium, 0.724 g de phosphate disodique, 0.210g de phosphate monopotassique.
 - pH : 7,2
 - Sous forme de poudre à diluer dans 1L d'eau distillée ;
- Eau distillée ;
- Bleu d'Evans ;
- Fluoprep ;
- Microscope optique à fluorescence (olympus, 50 W);
- Micropipettes ;
- Incubateur à 37°C;
- 100 Plaques de 12 puits MegaScreen Fluoanaplasma ph. (MegaCor Diagnostik, Autriche).

- Méthode :

Les sérums sont décongelés à température ambiante. Une homogénéisation manuelle est réalisée pour chaque tube avant de prélever le sérum pour effectuer la dilution.

Prélèvement de 10µL de sérum à la micropipette pour une dilution au cinquantième avec 490 µL de PBS. Dépôt de la dilution dans un puits d'une plaque MegaScreen Fluoanaplasma ph. Un sérum par puits, soit 10 sérums par plaque plus un sérum témoin positif et un témoin négatif.

- Témoin positif : sérum de référence du laboratoire ;
- Témoin négatif : PBS seul.

Chaque plaque subit une incubation de 30 minutes à 37°C suivi de 2 rinçages de 5 minutes dans du PBS.

Le conjugué (sérum de chèvre, antiIgG (H+L) de cheval ; producteur : Bethyl), dilué au 50^{ème}, est préparé à partir d'une solution de bleu d'Evans dans du PBS et d'anti-immunoglobuline de cheval. 20 µL de conjugué est déposé sur chaque puits, et les plaques sont de nouveau incubées à 37°C pendant 30 minutes.

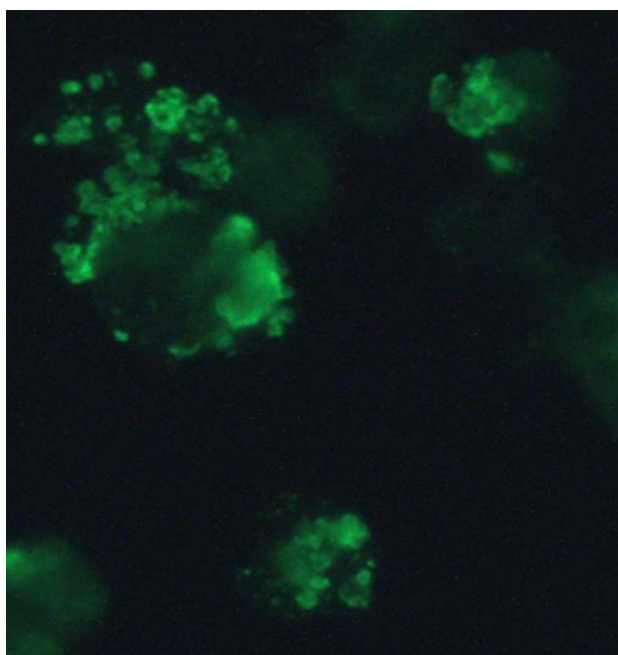
Deux rinçages de 5 minutes sont ensuite effectués puis du fluoprep ainsi qu'une lamelle par plaque sont déposés.

Une fois l'ensemble de ces manipulations effectuées, les lames pouvaient être lues à l'aide d'un microscope à fluorescence.

2) Lecture des lames

Chaque lame est lue par deux opérateurs, de manière indépendante (lecture en double aveugle). Une lame est considérée comme positive lorsque des morulas vertes fluorescentes sont observées en quantité significative (plusieurs par champs, 1 pour 10 cellules). Pour le criblage, les lames sont classées par catégories en fonction du nombre de morulas et de l'intensité de la fluorescence: négative, positive +, ++, +++ ou ++++ (Figure 9).

Figure 9 : Image d'IFI ,présence de nombreuses morulas



(Labaratoire de bactériologie ENVVA)

3) Immunofluorescence indirecte : dilution et détermination du taux d'anticorps :

Tous les sérums positifs au criblage (de 2 à 4 croix) ont été ré-analysés pour déterminer leur titre en anticorps. Des dilutions ont été effectuées du 50^{ème} au 1600^{ème}. La méthode d'Immunofluorescence est la même que précédemment décrite. Pour cette étape, les sérums sont considérés positifs s'ils sont vus à au moins 2 croix au 100^{ème}. En effet, le distributeur des plaques considère que le diagnostic est certain si les sérums sont positifs au 100^{ème}. Nous avons ainsi classé les sérums en 3 catégories :

- négatifs : aucune fluorescence au 100^{ème} ;
- positifs : fluorescence significative au 100^{ème}, au moins 2 croix ;
- douteux : quelques points de fluorescence, une croix au 100^{ème}.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

I. DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON

A) Description de l'échantillon de chevaux

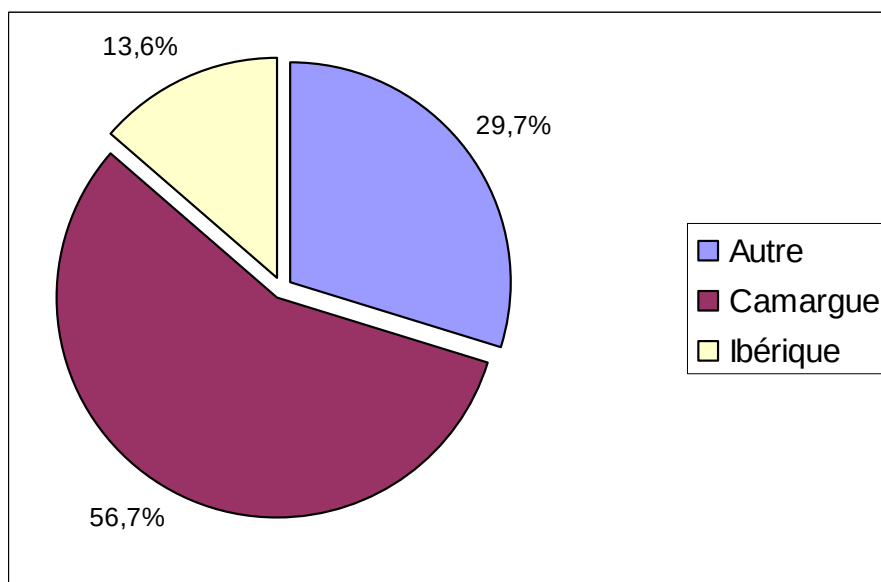
1) Races

643 chevaux sont inclus dans l'étude. Nous les avons classés selon leur race. Parmi les Camargue sont regroupés tous les chevaux de race Camargue ou croisés Camargue. Les Ibériques sont représentés par les chevaux de Pur Race Espagnole (PRE), les Lusitaniens (PSL) et les Portugais. La catégorie autres comprend : les chevaux et poneys de selle, les trotteurs, arabes, Quater Horse, les chevaux de trait et ceux d'origine inconnue (Tableau 6 et Figure 10).

Tableau 6 : Répartition des chevaux selon leur race

Race	Nombre de chevaux	Pourcentage sur l'ensemble des chevaux
Camargue	364	56,6%
Ibérique	88	13,6%
Autre	191	29,7%
Total	643	100%

Figure 10 : Distribution des races des 643 chevaux prélevés en 2007



Notre zone d'étude comprenant le berceau de la race Camargue, les chevaux de race Camargue et apparentées prédominent nettement (56,6% de notre échantillon).

Cependant, l'étude ne se limite pas à la Camargue *sensu stricto* et d'autres races de chevaux y sont représentées. Ainsi, il y a un certain nombre de chevaux ibériques ou apparentés (13,6%) et d'autres races (29,7%) représentées essentiellement par des chevaux et des poneys de selle.

2) Type d'activité

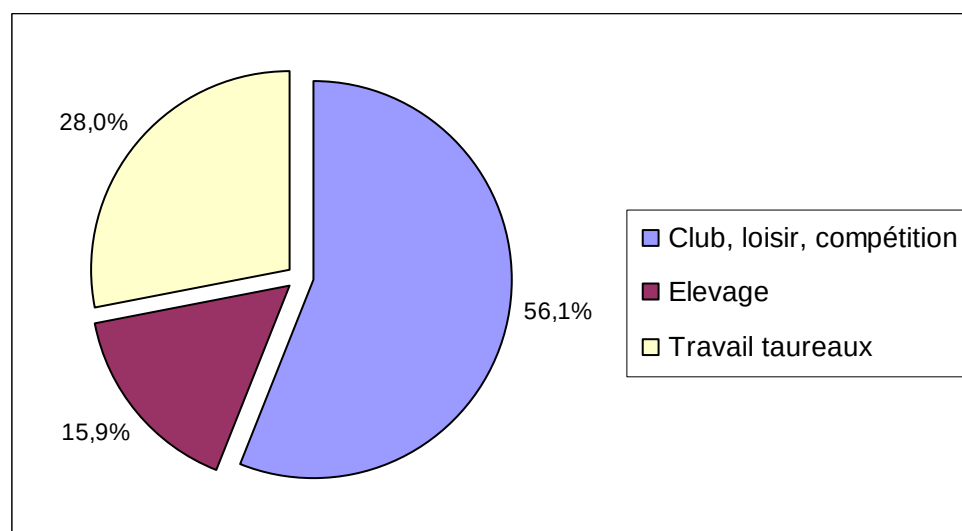
Les chevaux peuvent être classés en fonction de leur activité. Nous avons défini 3 catégories distinctes :

- Travail des taureaux (rassemblement, triage des taureaux, ferrades...),
- Elevage (reproduction, élevage de jeunes chevaux...),
- Club, loisir, compétition. Cette dernière catégorie regroupe l'ensemble des chevaux de centres équestres (cours collectifs, promenades, tourisme...), d'écurie de compétition et de particuliers (Tableau 7 et Figure 11).

Tableau 7 : Répartition des chevaux selon leur activité

Activité	Nombre de chevaux	Pourcentage sur l'ensemble des chevaux
Club, loisir, compétition	361	56,1%
Travail des taureaux	180	28%
Elevage	102	15,9%
Total	643	100%

Figure 11 : Pourcentage des chevaux par catégorie d'activité



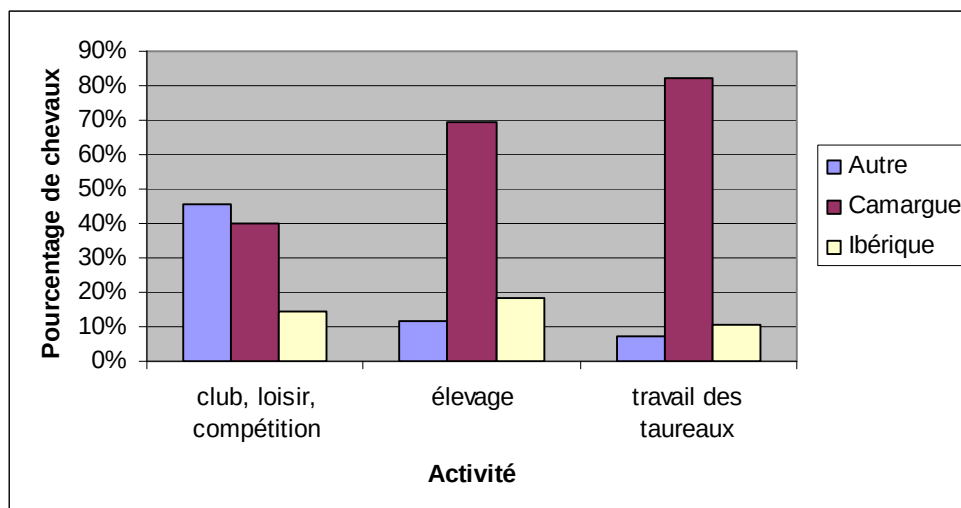
Plus de 50% des chevaux sont destinés à une activité de loisir, en centre équestre ou chez des particuliers.

L'élevage en général et celui du cheval Camargue en particulier, tient une place importante dans la région (15,9% des chevaux sont destinés à l'élevage).

Il est important de noter le fort pourcentage de chevaux servant au travail des taureaux (28%), ce qui est relativement spécifique de la région.

Une forte association est notée entre l'activité du cheval et sa race ($p < 1\%$). Notamment, les activités « travail des taureaux » et « élevage » sont très fortement liées à la race Camargue avec 40 % des Camargue destinés au travail des taureaux (Figure 12).

Figure 12 : Pourcentage de chevaux de chaque race selon l'activité



82,2 % des chevaux servant au travail des taureaux sont des camarguais et la grande majorité des chevaux mis à la reproduction sont des chevaux Camargue (69,6%). Par contre, les camarguais ne sont pas plus nombreux que les autres races pour l'activité « club, loisir, compétition ».

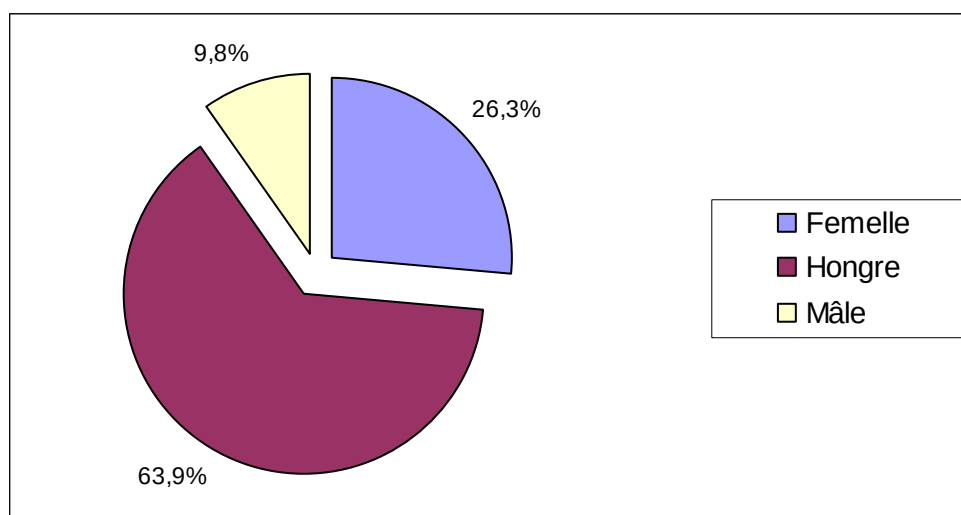
3) Sexe

Il y a 3 catégories de sexe : les femelles, les mâles et les hongres (Tableau 8 et Figure 13).

Tableau 8 : Proportion de chevaux de chaque sexe

Sexe	Nombre de chevaux	Pourcentage sur l'ensemble des chevaux
Hongre	411	63,9 %
Femelle	169	26,3 %
Mâle	63	9,8 %
Total	643	100 %

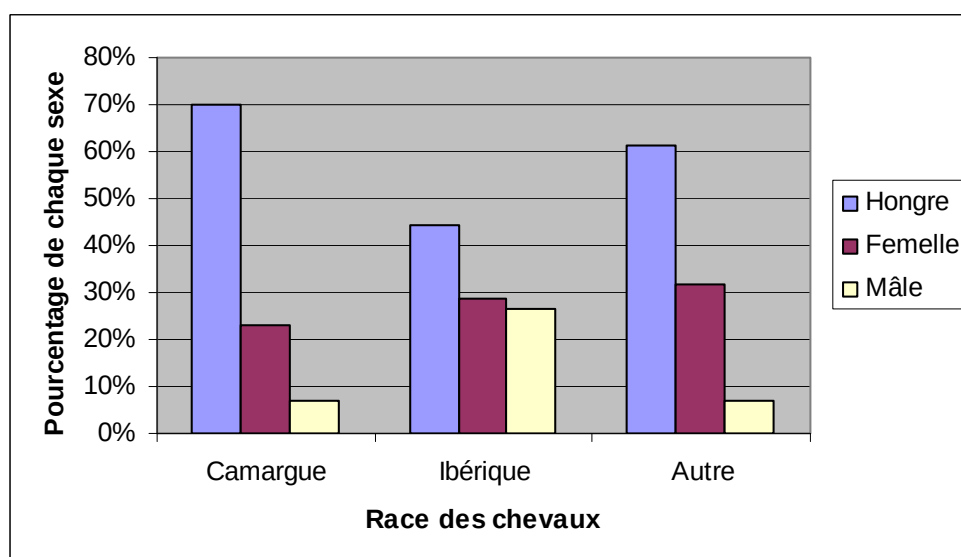
Figure 13 : Pourcentage des chevaux de chaque sexe



Les chevaux sont pour grande partie (63,9%) des hongres (mâles castrés). Les femelles représentent 26,3% de l'effectif et les mâles seulement 9,8%.

Un lien significatif ($p < 1 \text{ ‰}$) est observé entre la race des chevaux et leur sexe. Ainsi, la proportion de hongres est plus importante pour les chevaux Camargue prélevés (Figure 14).

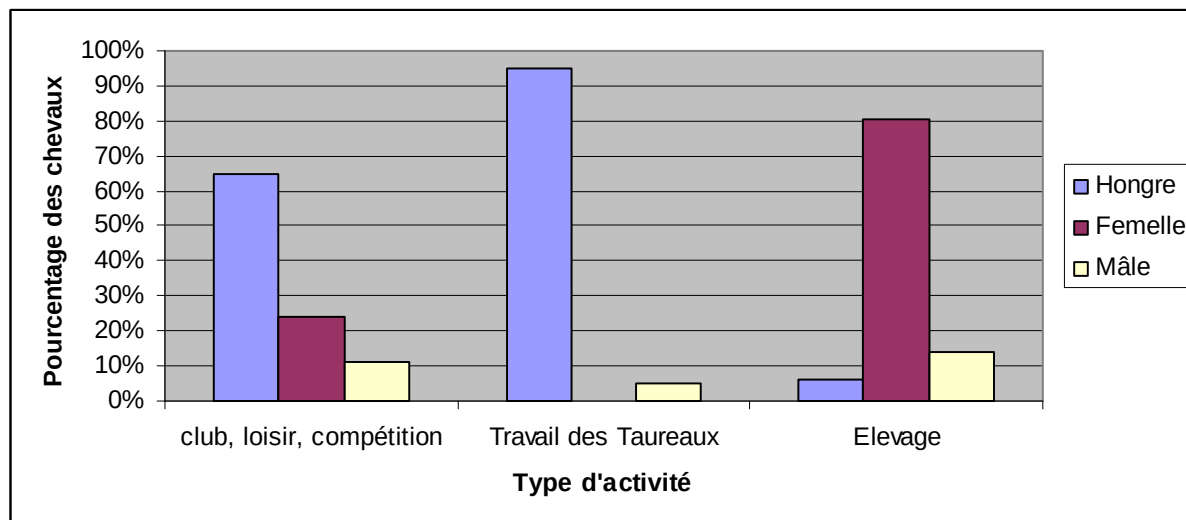
Figure 14 : Proportion des différents sexes dans chaque race



Nous avons prélevé proportionnellement beaucoup plus de hongres dans la race Camargue (70% d'hongres) que dans les autres races.

Une forte association ($p < 1 \text{ ‰}$) est également notée entre le sexe et l'activité du cheval (Figure 15). Le fait de travailler les taureaux est très fortement corrélé au sexe hongre ($p < 1 \text{ ‰}$) alors que l'activité de reproduction est associée au sexe femelle ($p < 1 \text{ ‰}$).

Figure 15 : Répartition des sexes selon le type d'activité



Ainsi, aucune femelle n'intervient dans le travail des taureaux. Cette activité est presque exclusivement réservée aux hongres qui constituent 95% de l'échantillon.

Les femelles sont pour une moitié dans l'équitation de loisir et pour l'autre dans la reproduction où elles représentent 80,4% des chevaux.

En élevage, les mâles reproducteurs ne constituent que 13,7% de l'effectif et ils sont minoritaires dans tous les types d'activité.

4) Age des chevaux

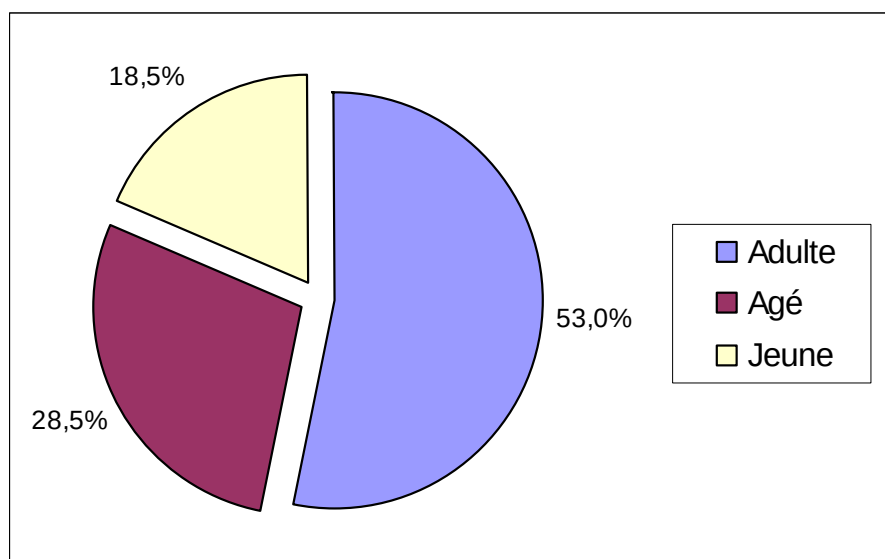
Selon son âge, un cheval est considéré comme :

- jeune : moins de 6 ans,
- adulte : de 6 à 15 ans,
- ou âgé : plus de 15 ans (Tableau 9 et Figure 16).

Tableau 9 : Répartition des chevaux selon leur âge

Age	Nombre de chevaux	Pourcentage sur l'ensemble des chevaux
Jeune	119	18,5 %
Adulte	341	53 %
Agé	183	28,5 %
Total	643	100 %

Figure 16 : Pourcentage de chevaux par catégorie d'âge



Plus de la moitié des chevaux de l'étude ont entre 6 et 15 ans. Près d'un tiers sont âgés de plus de 15 ans et seulement 18,5% sont des jeunes.

B) Description de l'échantillon d'écuries

1) *Activité des écuries*

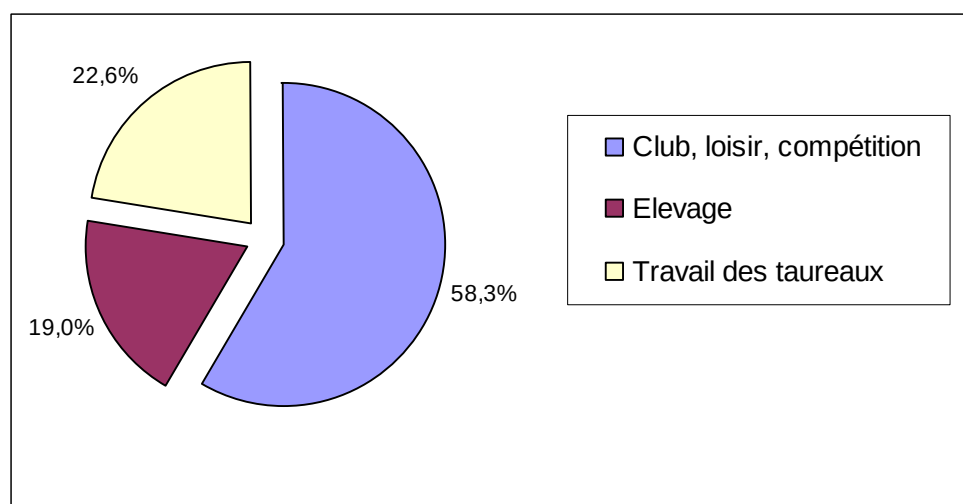
Au total, notre étude porte sur 84 écuries différentes, regroupées selon leur activité principale dans les 3 catégories déjà définies ci-dessus pour les chevaux :

- Club, loisir, compétition,
- Elevage,
- et travail des taureaux (Tableau 10 et Figure 17).

Tableau 10 : Répartition des écuries par catégorie d'activité

Activité de l'écurie	Nombre d'écuries	Pourcentage sur l'ensemble des écuries
Club, loisir, compétition	49	58,3 %
Elevage	16	19 %
Travail des taureaux	19	22,6 %
Total	84	100 %

Figure 17 : Pourcentage de chaque catégorie d'écurie



Comme pour les chevaux, la grande majorité des écuries rentre dans la catégorie « club, loisir, compétition ». Les 2 autres catégories sont pratiquement représentées à part égale.

2) Nombre moyen de chevaux prélevés par écurie

Sur les 84 écuries, le sang de 643 chevaux a été prélevé, ce qui fait en moyenne 7,65 chevaux prélevés par écurie (Tableau 11). Cependant, selon l'écurie, de 1 à 37 chevaux ont été inclus dans l'étude.

Tableau 11 : Nombre de chevaux prélevés selon l'activité de l'écurie

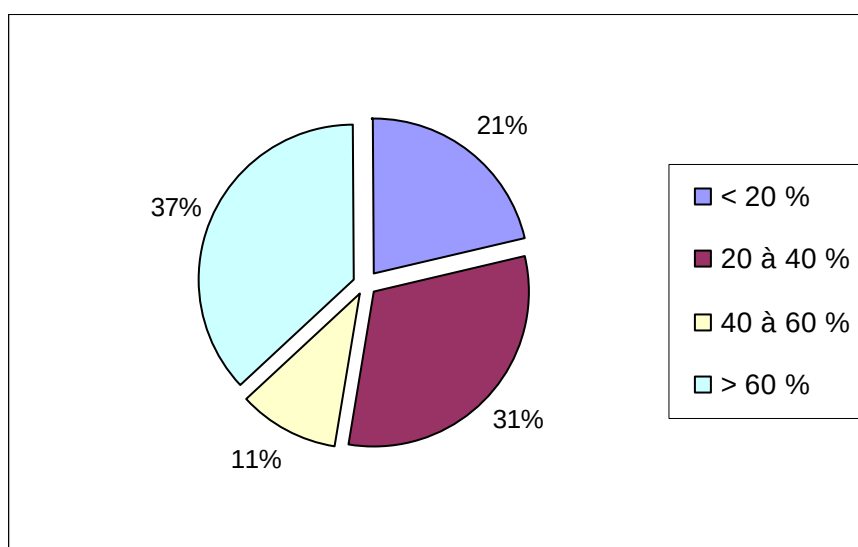
Activité	Nombre d'écuries	Nombre de chevaux prélevés par catégorie d'écurie	Nombre moyen de chevaux prélevés par écurie
Club, loisir, compétition	48	376	7,8
Elevage	17	151	8,9
Travail des taureaux	19	116	6,1
Total	84	643	

Proportionnellement, nous avons prélevé plus de chevaux en élevage (8,9 par écurie) que dans les écuries « club, loisir, compétition » (7,8) ou que pour le travail des taureaux (6,1) (Tableau 12 et Figure 18).

Tableau 12 : Proportion de chevaux prélevés par écurie

Pourcentage de chevaux prélevés par écurie	< 20 %	20 à 40 %	40 à 60 %	> 60 %
Pourcentage d'écuries concernées	21 %	31 %	11 %	37 %

Figure 18 : Pourcentage de chevaux prélevés par écurie



Dans 79 % des écuries nous avons prélevé plus de 20 % de l'effectif total.

16 écuries ont un nombre de chevaux restreint (moins de 5 chevaux), pour celles-ci nous avons prélevé l'ensemble de l'effectif. En ce qui concerne les autres écuries nous nous sommes efforcés de prélever un maximum de chevaux. Ainsi, pour 37 % des écuries, plus de 60 % de l'effectif a pu être inclus dans l'étude.

II. RESULTAT DES SEROLOGIES *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*

A) Séroprévalence au sein de l'ensemble de la population équine

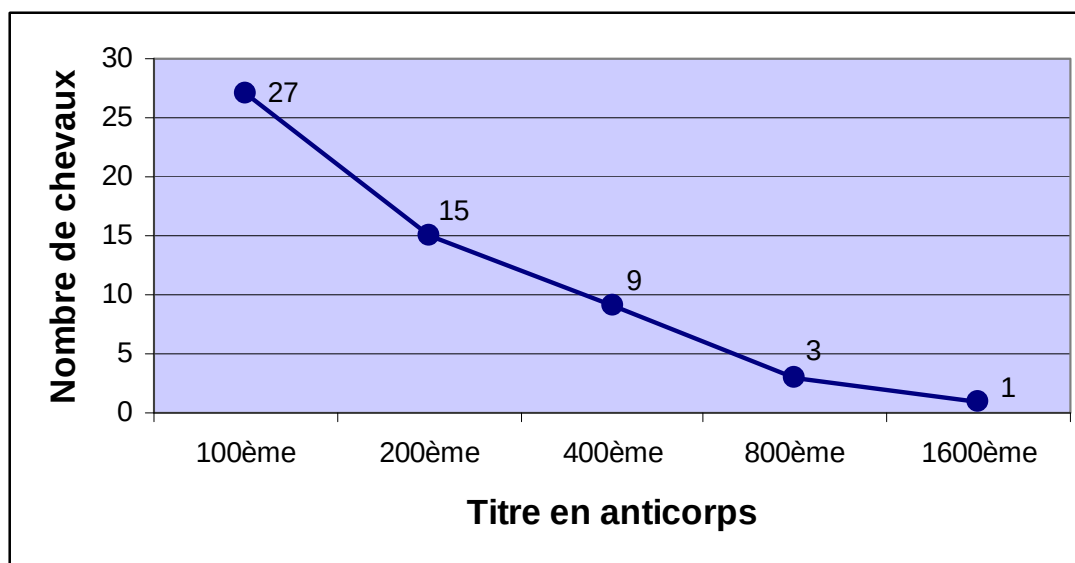
Sur les 643 chevaux prélevés, 91 sont positifs au criblage (dilution au 50^{ème}), soit une séroprévalence de 14,2%. Après dilution, seuls 55 sérums se sont avérés positifs au moins au 100^{ème}, ce qui donne une séroprévalence de 8,6% (IC_{95%} = 7,5 – 9,7). Le nombre de douteux s'élève à 8, soit 1,2% (Tableau 13).

Tableau 13 : Résultats des sérologies sur l'ensemble des chevaux

Statut sérologique du cheval	Négatif	Douteux	Positif au 100 ^{ème}	Positif au 200 ^{ème}	Positif au 400 ^{ème}	Positif au 800 ^{ème}	Positif au 1600 ^{ème}	Total
Nombre de chevaux concernés	580	8	27	15	9	3	1	643
Pourcentage dans la population de l'étude	90,2 %	1,2 %	4,2 %	2,3 %	1,4 %	0,5 %	0,2 %	100 %

Parmi les chevaux séropositifs, la moitié sont positifs au-delà du 100^{ème} et 23% sont très fortement positifs, avec des anticorps retrouvés à des dilutions allant du 400^{ème} au 1600^{ème} (Figure 19).

Figure 19 : Répartition des chevaux séropositifs en fonction de leur titre en anticorps



B) Séroprévalence des écuries

Une écurie est considérée comme positive vis-à-vis de l'anaplasmose si au moins un des chevaux de cette écurie est séropositif (Tableau 14 et Figure 20 et 21). Sur les 84 écuries de notre étude, 33 sont positives (39,3 %, IC_{95%} : 34-45%).

Tableau 14 : Résultats des écuries

Proportion de chevaux séropositifs par écurie <i>(nbre minimum et maximum de chevaux séropositifs par écurie)</i>	Aucun <i>(0)</i>	<10% <i>(1)</i>	De 10 à 19% <i>(1 à 2)</i>	De 20 à 30% <i>(1 à 8)</i>	> 30% <i>(1 à 6)</i>	Total
Nombre d'écuries concernées	51	2	14	10	7	84
Pourcentage sur l'ensemble des écuries	60,7 %	2,4 %	16,7 %	11,9 %	8,3 %	100 %

Figure 20 : Répartition des écuries selon le pourcentage de chevaux prélevés séropositifs

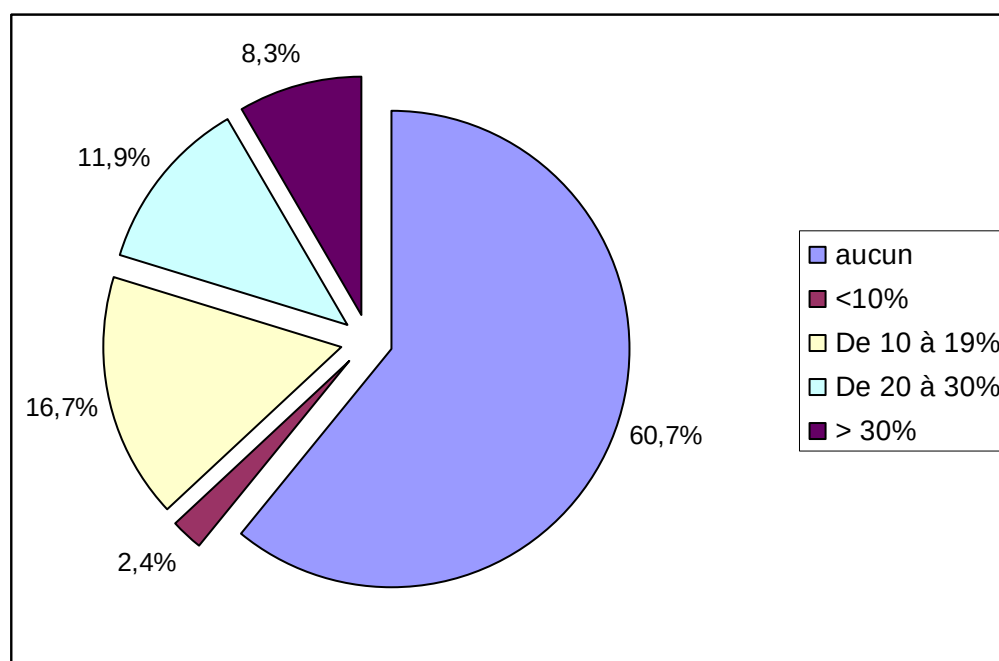
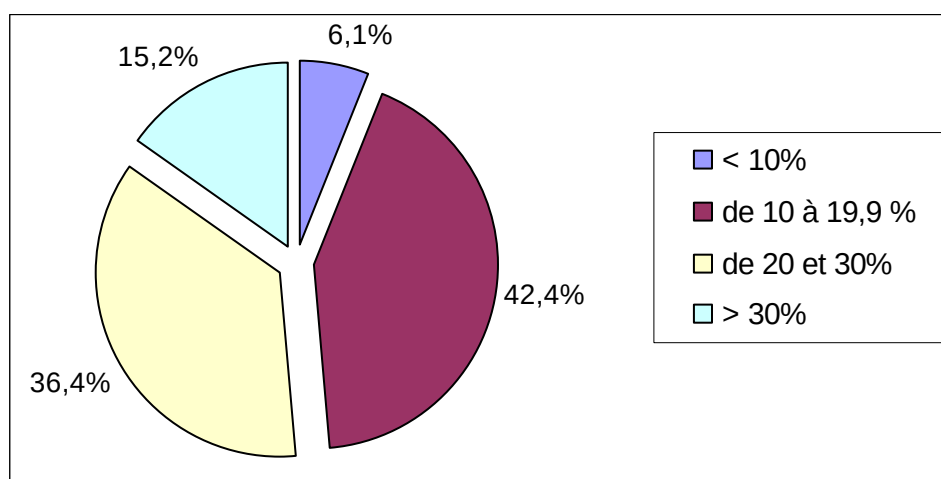


Figure 21 : Répartition des écuries positives en fonction de la proportion de chevaux séropositifs qu'elles contiennent



Parmi les 33 écuries positives, 93,9 % d'entre elles ont plus de 10% des chevaux prélevés ayant été infectés par *Anaplasma phagocytophilum*. Ceci est à nuancer car seules 12 des 33 écuries (soit 36 %) ont plus d'un cheval positif (de 2 à 8 chevaux positifs).

III. FACTEURS DE RISQUE

A) A l'échelle des chevaux

4 données concernant les chevaux ont été testées pour identifier un lien avec la réponse sérologique des chevaux pour l'anaplasmose.

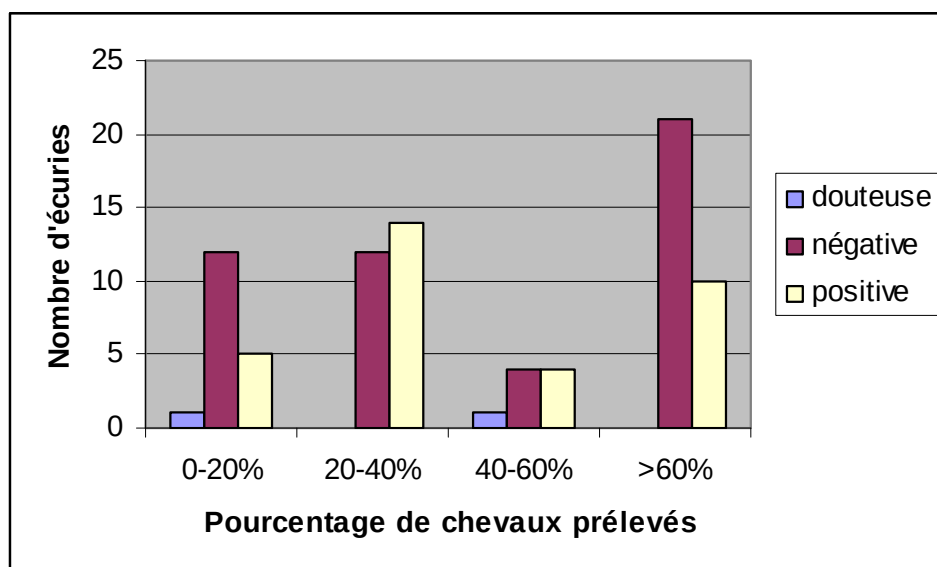
Aucune association significative n'a finalement été notée entre le statut sérologique anaplasmose et la race, le sexe, l'activité ou l'âge des chevaux.

B) A l'échelle des écuries

Comme pour les chevaux, aucun lien significatif n'est observé entre l'activité des écuries et leur statut vis-à-vis de l'anaplasmose.

Par ailleurs, nous avons vérifié que le pourcentage de chevaux prélevés par écurie n'influence pas la probabilité que l'écurie soit positive ($p \gg 0,05$). Ainsi, les écuries dans lesquelles plus de 60% de l'effectif a été prélevé, ne sont pas significativement plus positives que les autres (Figure 22).

Figure 22 : Statut sérologique des écuries en fonction du pourcentage de chevaux prélevés



IV. COMPARAISON 2001-2007

A) Anaplasmose granulocytaire équine : maladie émergente en Camargue ?

Comme nous l'avons vu, une étude équivalente a déjà été menée en 2001 (Pradier, 2003). Elle regroupait 98 écuries de la même zone d'étude et leur 488 chevaux. Sur ces 98 écuries, près de la moitié sont communes (42 écuries) à notre étude (Tableau 15 et Figure 23).

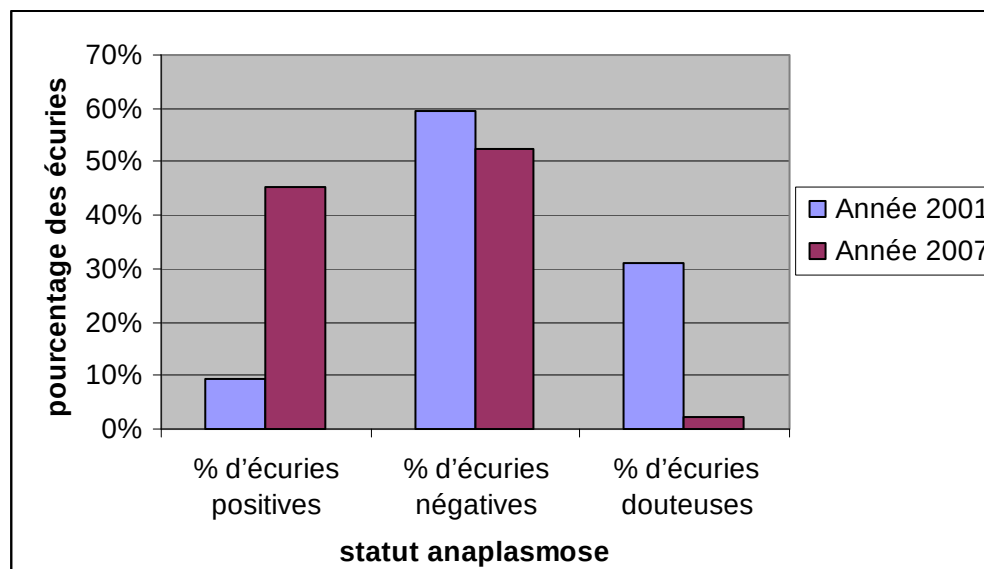
Il est donc intéressant de comparer les résultats de 2001 à ceux de 2007 à l'échelle de ces écuries :

- sur les 4 écuries positives de 2001, 2 le sont encore en 2007 ;
- parmi les 13 douteuses en 2001, 7 sont devenues positives, une est restée douteuse et 5 autres se sont négativées en 2007 ;
- enfin, 10 des écuries négatives en 2001 sont positives en 2007.

Tableau 15 : Statut vis-à-vis de l'anaplasmose des écuries communes en 2001 et 2007

STATUT ANAPLASMOSE DES ECURIES	2001	2007
% d'écuries positives	9,5 % (soit 4 écuries)	45,2 % (soit 19 écuries)
% d'écuries négatives	59,5 % (soit 25 écuries)	52,4 % (soit 23 écuries)
% d'écuries douteuses	31 % (soit 13 écuries)	2,4 % (soit 1 écurie)

Figure 23 : Répartition des écuries en fonction de leur statut en anaplasmose en 2001 et 2007



On constate qu'une majorité d'écuries est négative en 2001 et en 2007 avec un peu moins d'écuries négatives en 2007 (52,4 %) qu'en 2001 (59,5 %).

La proportion d'écuries positives augmente entre 2001 (9,5 %) et 2007 (45,2 %).

Les écuries douteuses sont, quant à elles, proportionnellement bien plus fréquentes en 2001 qu'en 2007.

B) Relation entre le statut sérologique des écuries en 2001 et 2007

Un test de Ki2 montre que les résultats obtenus en 2001 et 2007 sont indépendants.

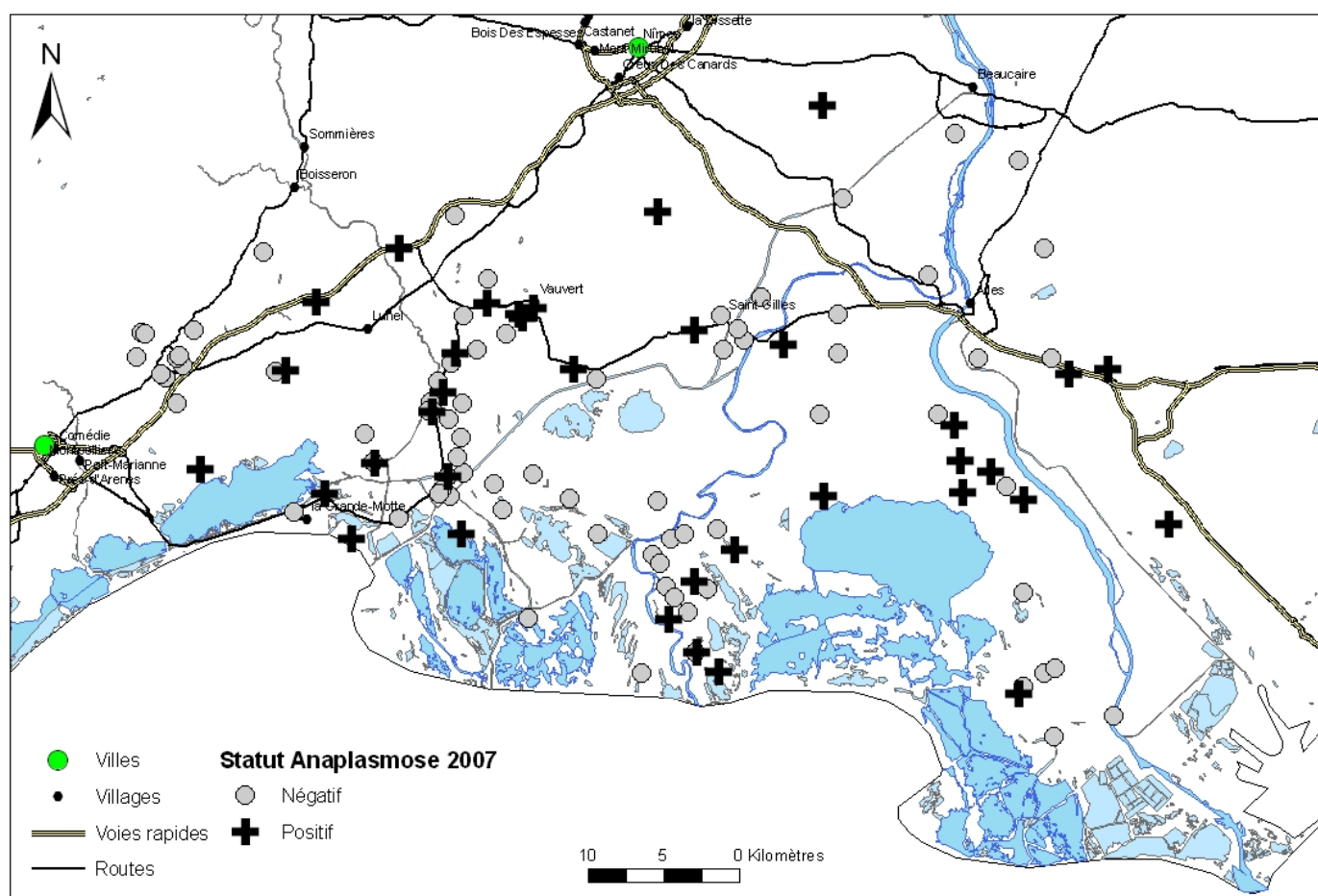
Le statut sérologique de 2007 ne dépend donc pas de celui de 2001. Ainsi, une écurie positive en 2001 n'a pas plus de risque qu'une autre d'être positive en 2007.

En 2001, le fait qu'un cheval était de sexe femelle était associé au risque de présence d'anticorps vis-à-vis de l'anaplasmose, ce n'est pas le cas en 2007.

C) Carte 2007 et comparaison avec 2001

Les coordonnées GPS et le lieu de géoréférencement de chaque site visité ont été saisis dans la base de donnée Access®. Puis, une analyse spatiale a permis de mettre en évidence (logiciel R®) une agrégation des sites positifs en établissant une carte de séroprévalence (Figure 24).

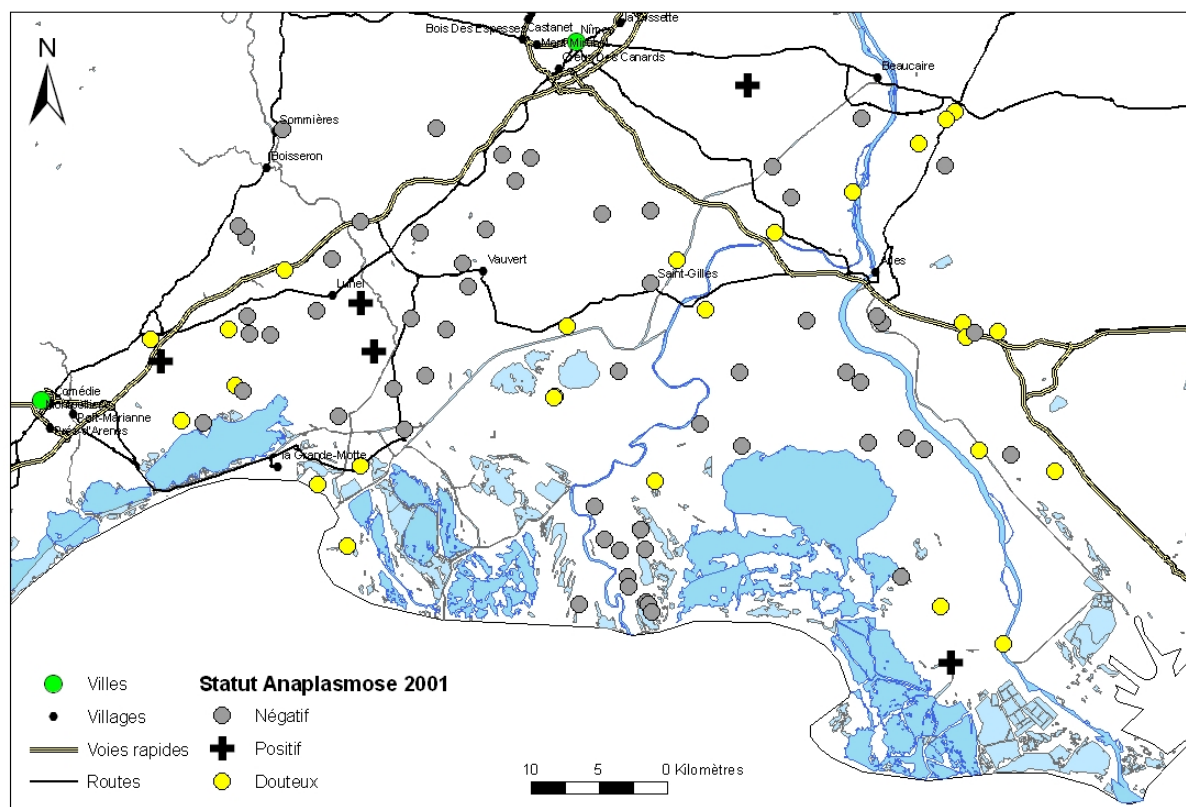
Figure 24 : Répartition géographique des écuries ayant fait l'objet de prélèvements dans la zone d'étude en 2007, selon leur statut sérologique



Les écuries positives sont situées essentiellement dans les zones humides, notamment autour de l'Etang de Vaccarès et le long des rivières et canaux de l'arrière pays gardois.

Une carte obtenue de manière similaire donnait les résultats suivants en 2001 (Figure 25).

Figure 25 : Répartition géographique des écuries ayant fait l'objet de prélèvements dans la zone d'étude en 2001, selon leur statut sérologique



En 2001, il y avait déjà des écuries positives dans l'arrière pays gardois mais très peu écuries douteuses n'avait été trouvées autour de l'Etang de Vaccarès et aucune n'était positive.

Si seules les écuries communes à 2001 et 2007 sont comparées, les cartes des Figures 26 et 27 sont obtenues :

Figure 26 : Carte de séroprévalence de 2007 des écuries communes à 2001 et 2007

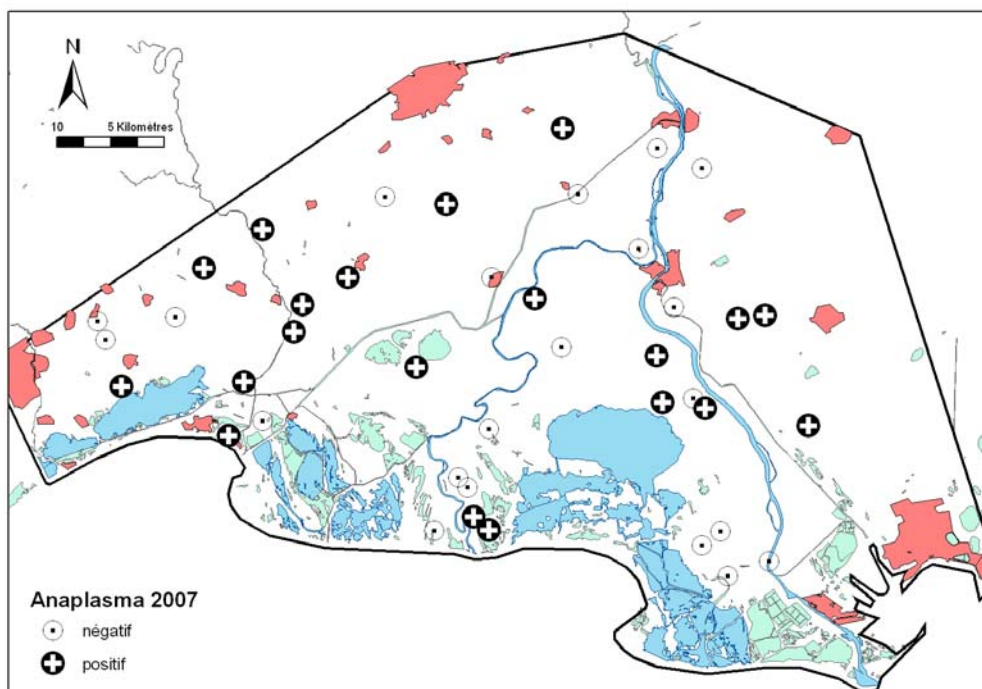
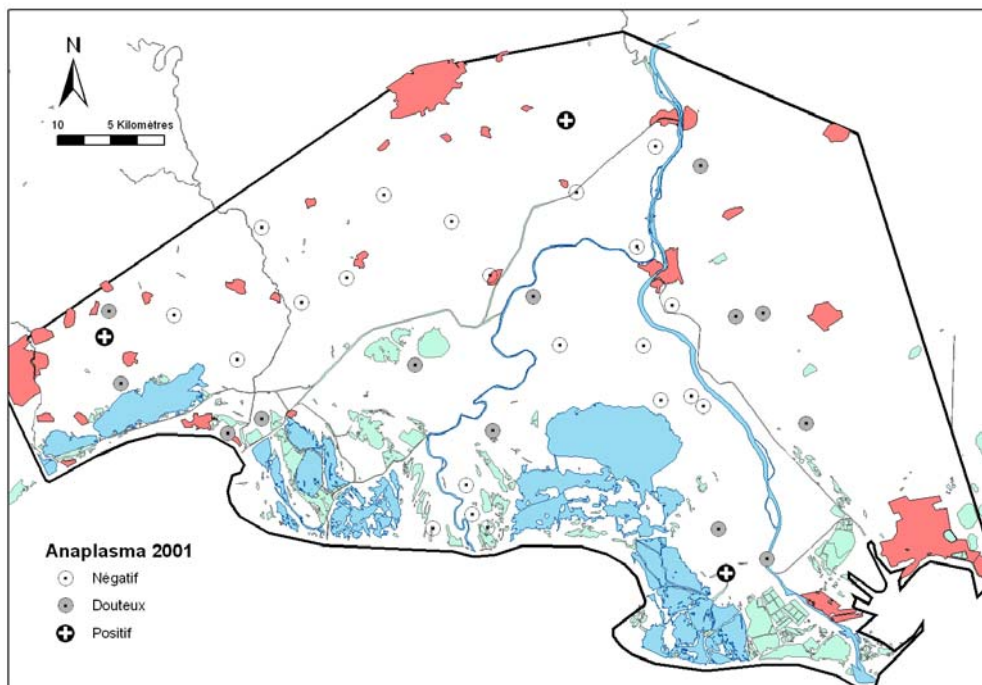


Figure 27 : Carte de séroprévalence de 2001 des écuries communes à 2001 et 2007



Comme nous l'avons déjà constaté, il y a davantage d'écuries positives en 2007 qu'en 2001. La carte de séroprévalence de 2007, confirme certaines données de 2001 avec la présence d'*Anaplasma phagocytophilum* dans l'arrière pays gardois, le long des rivières et canaux. Par contre, il semble y avoir une émergence de la bactérie autour de l'étang de Vaccarès.

V. L'ANAPLASMOSE S'EXPRIME T-ELLE MAJORITAIREMENT DE MANIERE SUBCLINIQUE ?

Une question qui revient souvent « dans la bouche des vétérinaires » lorsque nous parlons d'anaplasmose est : cette infection s'exprime t-elle vraiment ou est-elle majoritairement subclinique ?

Comme nous l'avons signalé, même lorsque l'infection s'exprime de manière clinique, le cheval peut ne montrer qu'une partie des symptômes, qui sont le plus souvent non spécifiques (abattement, hyperthermie, dysorexie...).

Lorsque nous avons prélevé les chevaux, nous avons demandé aux propriétaires les maladies que leur animal avait contractées ces dernières années (Tableau 16 et 16bis).

Tableau 16a et 16b : Maladies contractées par les chevaux et entrant dans le diagnostic différentiel de l'anaplasmose en fonction du statut sérologique

	ANAPLASMOSE +	ANAPLASMOSE - OU DOUTEUX	TOTAL
Maladie rapportée (épisode fébrile, piroplasmose,...)	4	21	25
Aucune maladie rapportée	51	567	618
TOTAL	55	588	643

Maladie rapportée	ANAPLASMOSE +	ANAPLASMOSE - OU DOUTEUX
Piroplasmose	4 chevaux dont : - 1 en 2004 - 1 en 2005 - 1 en été 2006 - 1 en janvier 2007	17 chevaux dont : - 1 en 2004 - 4 en 2005 - 2 en 2006 - 4 d'avril à juillet 2007 - 1 avec épisodes chroniques
Episode fébrile (abattement, hyperthermie...)		4 chevaux dont : - 1 en 2004 - 1 avec épisodes chroniques depuis 2005 - 2 en avril et mai 2007

La première constatation est qu'aucun diagnostic d'anaplasmose n'a été établi sur les chevaux de notre échantillon.

En tout, 25 chevaux (3,9 % des chevaux prélevés) ont développé un tableau clinique pouvant évoquer une anaplasmose. Sur ces 25 chevaux, 21 (soit 84 %), sont négatifs pour l'anaplasmose.

Ne sachant pas si les diagnostics de piroplasmose avaient été établis de manière certaine, nous avons voulu voir si un lien entre un tableau clinique de piroplasmose ou un syndrome fébrile et le statut sérologique des chevaux vis-à-vis de l'anaplasmose pouvait être observé.

Finalement, aucune relation n'a pu être démontrée entre le statut sérologique des chevaux et le fait qu'ils aient eu des symptômes pouvant évoquer l'anaplasmose.

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

I. PROTOCOLE

A) Période de collecte

1) Collecte sur 3 mois

La période de collecte s'étendant sur 3 mois, il est possible que le statut sérologique de certains chevaux ait changé entre le début et la fin des prélèvements. Cependant, la collecte s'est faite sur un temps relativement court étant donné le nombre important de chevaux inclus dans l'étude (214 chevaux prélevés par mois).

2) La période de prélèvement

Le moment de la collecte n'est pas idéal car il se situe durant la période d'activité des tiques. Il aurait été préférable de réaliser les prélèvements pendant l'hiver. Cependant, dans cette région méditerranéenne qu'est la Camargue, le vecteur est observé pratiquement toute l'année. Les chevaux sont donc susceptibles d'être contaminés toute l'année.

B) Echantillon prélevé

Même si les écuries ont pu être tirées au sort, il nous fallait l'accord des propriétaires pour prélever leurs chevaux et certains n'ont pas souhaité participer à l'étude. Par conséquent, ceci crée un certain biais de sélection.

Malgré cela, notre étude rassemble 643 chevaux dans une zone qui en héberge environ 7 000 (données RGA 2000). Notre échantillon est donc important puisqu'il comprend près de 10% de la population générale équine de la région.

Nous avons vu qu'il s'agit d'une majorité de Camargue ou apparentés (56,6 %), essentiellement des hongres (63,9 %), d'âge adulte (53 %). Les activités principales des chevaux de la région sont le loisir, le travail en centre équestre et la compétition. Ces activités sont effectuées à la fois par des Camargue et des chevaux d'autres races.

Finalement, même s'il existe des biais liés aux réticences de quelques propriétaires, au mode d'élevage de certains chevaux et aux contraintes de l'étude, l'échantillon reste représentatif de la population des chevaux en Camargue.

C) Caractéristiques de l'échantillon relatives à la zone d'étude

1) *Prédominance des chevaux Camarguais*

Notre zone d'étude comprenant le berceau de la race Camargue, il est normal qu'une majorité de chevaux appartiennent à cette race (56,6 %). Pour qu'un cheval ait l'appellation « Camargue », il doit être issu de parents inscrits au *Stud Book*, être de robe grise, être né et identifié dans le « berceau de la race », appartenir à une manade et être marqué de son sceau. Le Parc Naturel de Camargue, en accord avec les services des Haras Nationaux, a défini une manade comme un élevage en liberté de chevaux camarguais, qui comprend au minimum 4 juments reproductrices stationnées toute l'année dans le berceau de la race, sur un territoire ne comprenant pas plus de 2 UGB (Unité Gros Bétail) par hectare, avec un minimum de 20 hectares en propriété ou en location. L'élevage du cheval de race Camargue est très particulier et original. Il se fait de manière uniquement extensive, traditionnelle et est très réglementé. Toutes les étapes de la reproduction, de la saillie au poulainage, doivent se dérouler en totale liberté. L'intervention humaine se résume à la sélection des reproducteurs (Figure 28).

Ainsi, les poulinières Camargue vivent à l'état semi-sauvage, en manade, et ne sont rassemblées qu'au moment du sevrage des poulains. Il a donc été très souvent impossible de prélever du sang sur ces juments. Ceci peut expliquer en partie que, dans l'échantillon retenu pour l'étude, les chevaux de race Camargue soient en majorité des hongres (70 % de hongres).

Figure 28 : Chevaux et bovins Camarguais



2) Activité des chevaux

La Camargue étant la patrie de la race bovine camarguaise, une proportion importante de chevaux sert au travail des taureaux (28 %).

Le mode d'élevage extensif du taureau camarguais, en semi liberté, lui confère un état quasiment sauvage et le cheval est alors un outil de travail indispensable. Le cheval participe à toutes les activités liées au taureau : rassemblement et triage des taureaux, la ferrade, l'abrivade (Figure 29) et la bandide... (Tomas-Roux, 1998).

Figure 29 : Abrivade à Arles



(Photo :Formica V.)

D) Méthode diagnostique employée

Le problème majeur de notre méthode diagnostique est que nous ne sommes pas capables d'estimer sa spécificité et sa sensibilité. En effet, il n'existe pas de méthode de référence pour le diagnostic d'Anaplasmosse, nous n'avons donc pas pu nous y référer pour évaluer la spécificité et la sensibilité de notre test. Cependant, pour l'homme, la méthode sérologique la plus usitée est l'IFI, qui sert de référence (Dumler et Brouqui, 2004).

Chez l'homme, il existe un certain nombre de réactions croisées, c'est pourquoi il faut faire attention à l'interprétation lors d'un simple criblage d'une population ou l'utilisation chez un patient avec une faible suspicion (Walls *et al.*, 1999 ; Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2002). Ces réactions croisées concernent essentiellement *Borrelia burgdorferi* (Worsmer *et al.*, 1996 et 1997), agent de la maladie de Lyme. Cependant, il peut s'agir également de co-infection ou de co-exposition compte tenu de l'épidémiologie très proche de ces deux bactéries (Brouqui, 1999).

Dans notre étude nous avons réalisé un premier criblage et chacun des sérums positifs au 50^{ème} a été réanalysé. En réalisant le criblage au 50^{ème}, nous avons augmenté la sensibilité de notre détection pour éviter d'avoir trop de faux négatifs. Puis, nous avons effectué des dilutions allant du 50^{ème} au 1600^{ème} et nous n'avons considéré comme réellement positifs uniquement les sérums possédant des anticorps au 100^{ème} et plus. Ce deuxième temps de « dilution » nous a permis d'augmenter la spécificité de la sélection. De plus, nous avons également pu déterminer les taux d'anticorps de chacun des chevaux ce qui est intéressant pour estimer, de manière empirique, le moment de l'infection du cheval.

Ainsi, si le sérum est positif au 100 ou 200^{ème}, il peut s'agir d'un cheval récemment infecté qui est en train de séroconvertir, ou d'un cheval anciennement contaminé (quelques semaines à quelques mois) et dont le taux d'anticorps est en train de diminuer. Si le sérum est positif au 400^{ème} et au-delà, on peut penser que le cheval a été infecté ou ré-infecté récemment.

Il aurait pu être intéressant de compléter nos analyses sérologiques avec des analyses moléculaires de type PCR pour augmenter la sensibilité de notre étude et avoir une meilleure idée du moment de l'infection. En effet, cela aurait pu nous permettre de détecter des chevaux très récemment infectés, qui n'auraient pas encore séroconverti. Cependant, nous avons vu que la PCR n'est positive que quelques semaines (Franzén *et al.*, 2005), alors que des anticorps peuvent être retrouvés plusieurs mois après l'infection. Des chevaux anciennement infectés peuvent donc avoir une sérologie positive et une PCR négative. Notre étude étant une étude de séroprévalence et non de diagnostic, la sérologie, même seule, est par conséquent la méthode la plus adaptée. Comme les anticorps peuvent persister plusieurs mois, nos résultats nous donnent une idée du nombre de chevaux et d'écuries infectés sur une période relativement longue.

Par ailleurs, dans la littérature il est clairement admis que la production d'anticorps est stoppée ou nettement retardée par un traitement précoce aux tétracyclines (Van Andel *et al.*, 1998). Nous nous sommes donc bien assuré qu'aucun cheval n'avait reçu de traitement antibiotique dans les mois précédant notre étude.

II. RESULTATS

A) Séroprévalence obtenue chez les chevaux

Au criblage (dilution au 50^{ème}) nous avons obtenu 14,2 % de chevaux ayant des anticorps contre la bactérie. Après des dilutions plus importantes de leur sérum, seuls 8,6 % des chevaux de l'échantillon se sont avérés réellement positifs et 1,2 % sont considérés comme douteux. Il était donc bien judicieux de réaliser ces 2 étapes d'IFI (criblage puis dilution) pour minimiser au maximum le risque de faux négatifs dans un premier temps puis de faux positifs dans un deuxième.

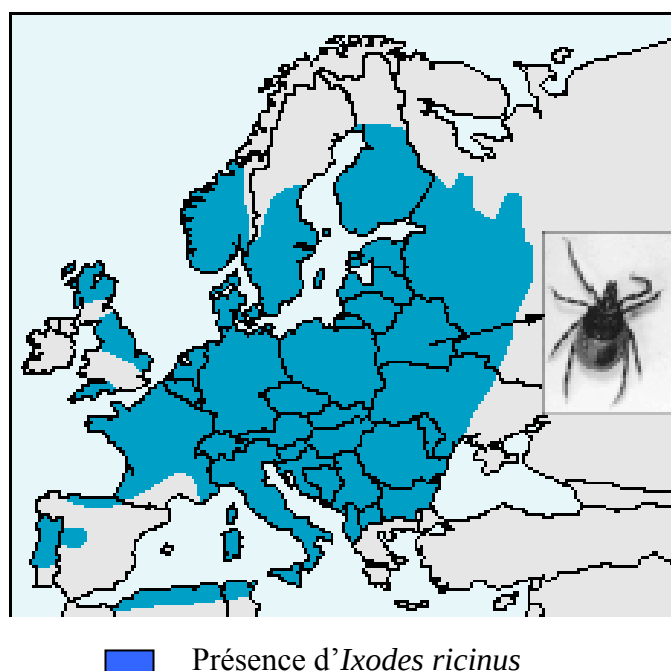
Le fait de retrouver des anticorps au 50^{ème} et non au-dessus peut s'expliquer de différentes manières :

- soit le cheval possède effectivement des anticorps contre *Anaplasma phagocytophilum* mais en très faible quantité. Il pourrait s'être contaminé il y a longtemps ou très récemment ;
- soit il s'agit de faux positifs par communauté antigénique. Des antigènes « non spécifiques » reconnaissent un épitope commun à *Anaplasma phagocytophilum* et à une autre bactérie. Ceux-ci, sans doute en faible quantité, sont présents au 50^{ème} mais ne se retrouvent pas à des dilutions supérieures.

Une donnée qui pourrait avoir modifié les résultats et que nous ne possédons pas est l'éventuelle réalisation de traitement antiparasitaire. La maladie étant vectorisée, si une lutte contre les tiques est entreprise pour certains chevaux, cela modifie leur risque d'infestation et donc d'infection. Une nouvelle enquête est en cours pour l'année 2008 et prend en compte cet élément.

Par ailleurs, le vecteur de l'anaplasmose en Camargue est toujours inconnu. D'après les données bibliographiques, *Ixodes ricinus* serait l'espèce la plus probable en France (Parola *et al.*, 1998). Pourtant cette tique semble absente du pourtour méditerranéen (Gilot *et al.*, 1994 ; Devers, 2002) (Figure 30). Ainsi il pourrait exister une autre espèce de tique impliquée dans la transmission de la maladie en Camargue et encore indéterminée à ce jour. Deux espèces de tiques se rencontrent principalement sur les chevaux en Europe : *Dermacentor reticulatus*, la plus fréquente, et *Dermacentor marginatus* (Guillot *et al.*, 2005). Ces deux tiques transmettent les agents des babésioses équine et sont abondantes en région méditerranéenne (Pérez-Eid, 2007), peut être pourraient-elles également transmettre *Anaplasma phagocytophilum*... Des tiques du genre *Rhipicephalus* sont également mais celles-ci infestent presque exclusivement les chiens (Pérez-Eid, 2007).

Figure 30 : Répartition d'*Ixodes ricinus* en Europe (d'après Parola et Raoult, 2001)



B) Séroprévalence obtenue pour les écuries

Nous avons obtenu près de la moitié (39,3 %, IC_{95%} : 34-45%.) d'écuries positives, c'est à dire hébergeant un ou plusieurs chevaux ayant contracté l'infection. Parmi ces écuries positives, 93,9 % d'entre elles ont plus de 10 % de chevaux prélevés contaminés. Cependant, presque 8 chevaux ont été prélevés en moyenne par écurie. Ainsi, il suffit d'un cheval contaminé parmi les 8 prélevés pour considérer que plus de 10 % de l'échantillon est positif. Sur les 33 écuries positives, seules 12 (36,4 % des écuries positives) ont plus d'un cheval atteint. Il faut donc regarder ces résultats avec prudence et ne pas considérer à tort que lorsqu'une écurie est infectée, elle l'est nécessairement de manière très importante.

Par ailleurs, il est difficile de caractériser le statut négatif d'une écurie. Il faudrait, dans l'idéal, que tous les chevaux soient prélevés pour pouvoir affirmer que l'écurie est négative. On aurait pu, par exemple, prélever le reste des chevaux dans les écuries négatives pour vérifier leur statut.

Cependant, pour 79% des écuries, nous avons prélevé plus de 20% de l'effectif total avec 37% des écuries pour lesquelles plus de 60% des chevaux sont inclus dans l'étude. De plus, il est important de rappeler que, dans la mesure du possible, tous les chevaux présents ont été prélevés et qu'il n'a pas été mis en évidence de lien significatif entre le statut sérologique des écuries et le pourcentage de chevaux prélevés. Les femelles, souvent non accessibles et difficilement manipulables, sont pour la plupart réparties dans des sites différents. On peut donc considérer que les résultats obtenus sont représentatifs à l'échelle des sites visités.

En revanche, le statut positif pose beaucoup moins de problème : si un cheval est positif, l'écurie devient positive, le statut du cheval voisin ayant alors une importance moindre.

C) Facteurs de risque

Même si cela n'était pas le but initial de l'étude, nous avons cherché à identifier certaines caractéristiques des chevaux ou des écuries pouvant avoir un lien avec le statut sérologique vis-à-vis de l'anaplasmose.

A l'échelle des chevaux aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre l'âge, le sexe, l'activité ou la race des chevaux et leur sérologie anaplasmose.

De même, pour les écuries, nous n'avons pas vu de lien entre la catégorie d'activité à laquelle elles appartiennent ou le pourcentage de chevaux prélevés et leur résultat anaplasmose.

D) Comparaison 2001-2007

1) ELISA versus IFI

Comme nous l'avons mentionné, les tests sérologiques employés en 2007 (IFI) diffèrent de ceux de 2001 (ELISA). Pour pouvoir comparer ces résultats nous avons envoyé 192 sérums de 2007 au laboratoire ayant réalisé l'analyse en 2001, pour qu'ils soient testés par la méthode ELISA. Parmi ces 192 sérums, 91 sont positifs au 50^{ème} dont 55 positifs au 100^{ème} et au-delà en IFI. Les 101 autres sérums ont été tirés au sort parmi l'ensemble des négatifs en IFI. De manière très surprenante, tous les sérums testés dans ce deuxième laboratoire par ELISA sont revenus négatifs. Nous avons interrogé ce laboratoire pour connaître la raison d'un tel résultat mais nos questions quant à leur kit ELISA et leur méthode de conservation des sérums sont restées sans réponse... Ceci remet fortement en cause la validité de ce travail et notamment la comparaison des sérologies entre 2001 et 2007. Cependant, il n'existe aucune étude Européenne publiée pour laquelle la séroprévalence de l'anaplasmose granulocytaire équine est nulle. Or, sur les 192 sérums aucun n'est positif en ELISA alors que selon les résultats de 2001, au moins 10% devrait l'être. De plus, la méthode d'IFI que nous avons employée utilise le variant équin d'*Anaplasma phagocytophilum* comme antigène, ce qui augmente la spécificité du test. Il paraît donc impossible que nous ayons un aussi grand nombre de faux positifs en IFI. Le plus probable est donc qu'il y ait eu une erreur dans les analyses sérologiques par ELISA (conservation, manipulation des sérums, kit ELISA défectueux). Nous prévoyons d'analyser les sérums de 2001, qui ont tous été conservés, par IFI au laboratoire de bactériologie de l'ENVA pour tenter d'élucider la question.

2) Si l'IFI et l'ELISA sont des tests sérologiques équivalents

En occultant ces données et en se référant uniquement à l'étude de Magnarelli *et al.* (2001a) qui a montré que l'IFI et l'ELISA avaient une sensibilité et une spécificité équivalente, une comparaison entre 2001 et 2007 peut être proposée.

La constatation principale est qu'il y a proportionnellement plus d'écuries positives en 2007 (45,2 %) qu'en 2001 (9,5 %). Par contre il y a plus d'écuries douteuses en 2001, ce qui explique qu'il n'y a pas beaucoup moins d'écuries négatives en 2007 qu'en 2001.

Ceci peut s'expliquer de 2 façons :

- la première est qu'il y a globalement plus d'écuries infectées en 2007 qu'en 2001, au quel cas on peut penser que l'anaplasmose est une maladie émergente dans notre zone d'étude ;
- la seconde explication vient du fait que les méthodes de diagnostic entre 2001 et 2007 ne sont pas les mêmes.

En 2001, les sérologies ont été réalisées par ELISA et les résultats à l'échelle des chevaux ont été interprétés de la façon suivante :

« L'interprétation des résultats est liée à l'absorbance à 450 nm du témoin négatif (TN) (la référence est de 630 nm). Les résultats sont de 4 types :

- Négatif : aucun anticorps n'est détecté,
- Douteux : ce seuil est égal à 2 TN. Le titre en anticorps est intermédiaire. Il peut s'agir d'anticorps résiduels et pour conclure quant à la contamination récente, il faudrait faire une cinétique d'anticorps, ce qui n'a pas été réalisé dans cette étude,
- Positif : ce seuil est égal à 3 TN ou plus » (Pradier, 2003)

Comme pour notre étude, une écurie est considérée positive dès lors qu'elle contient au moins un cheval positif, et douteuse si elle possède un ou plusieurs chevaux douteux, sans positif.

En 2007, nous avons utilisé l'immunofluorescence indirecte et nous avons considéré comme positif tout cheval possédant des anticorps contre *Anaplasma phagocytophilum* à une dilution au centième et au-delà.

Si nous considérons l'ensemble des animaux douteux et positifs en ELISA, 40,5 % des écuries de 2001 (9,5 % de positives + 31 % de douteuses) pourraient être considérées comme positives. Ce chiffre se rapproche davantage de celui de 2007 mais reste tout de même à plus de 5 points inférieur.

Par ailleurs, il semble qu'il n'y ait aucun lien entre le statut anaplasmose de 2001 et celui de 2007. Une écurie positive en 2001 n'a donc pas plus de risque qu'une autre d'être positive en 2007. Nous avons également fait les tests statistiques en considérant les écuries douteuses en 2001 comme positives. Cela ne change rien, les statuts sérologiques des écuries en 2007 restent indépendants de ceux obtenus en 2001.

Des cartes de séroprévalence ont été réalisées en 2001 et en 2007. En 2001, certaines écuries sont positives dans l'arrière pays gardois, le long des rivières et des cours d'eau. La même tendance est retrouvée en 2007 avec un nombre plus important d'écuries positives, ce qui confirme la présence d'*Anaplasma phagocytophilum* dans cette région. De plus, il semble y avoir une émergence de la bactérie autour de l'étang de Vaccarès. En effet, plusieurs écuries sont positives dans cette zone en 2007 alors qu'il n'y avait aucune écurie positive à cet endroit en 2001.

Pour conclure, bien que notre étude n'inclue pas toutes les écuries de 2001, une bonne proportion sont communes (43 % des écuries de 2001 ont été testées en 2007). De plus, il y a significativement plus d'écuries infectées en 2007. L'anaplasmose granulocytaire équine serait donc une maladie émergente en région Camargue.

E) Infection présente mais... inapparente !

Les vétérinaires ont raison de se poser des questions quant à l'expression clinique de la maladie. En effet, sur les 55 chevaux positifs en anaplasmose les propriétaires ne rapportent pas d'épisode fébrile. Même si certains (4 chevaux) ont contracté une maladie entrant dans le diagnostic différentiel de l'anaplasmose dans les mois à années précédant l'étude, cela ne peut pas être mis en relation avec le statut sérologique de l'animal. Ceci va dans le sens de l'étude de Madigan *et al.* (1990) qui avaient déjà constaté à l'époque qu'une large proportion de chevaux, dans une population en zone endémique, a des titres en anticorps significatifs sans jamais avoir présenté de signes cliniques.

Il existerait des souches plus ou moins pathogènes d'*Anaplasma phagocytophilum*. Il semble que les souches isolées en Europe soient moins virulentes qu'aux Etats-Unis avec des patients ayant des symptômes plus frustes en Europe (Loric-Furlan *et al.*, 2001). L'équipe de Portillo (2004) a trouvé des souches non pathogènes de la bactérie en Espagne chez *Ixodes ricinus*. Selon eux, cela expliquerait le faible taux de cas humains d'anaplasmose granulocytaire identifiés alors qu'il existe une forte prévalence de la bactérie chez *Ixodes ricinus* en Espagne. Ces souches peu pathogènes pourraient être à l'origine d'infections subcliniques chez le cheval.

CONCLUSION

L'anaplasmose granulocytaire équine est une maladie infectieuse, non contagieuse, due à la bactérie *Anaplasma phagocytophilum* et transmise par les tiques *Ixodes spp.* Chez le cheval, le tableau clinique de la maladie est généralement celui d'un syndrome fébrile avec peu de symptômes spécifiques. Son évolution à bas bruit rend difficile le diagnostic clinique et impose la mise en œuvre d'examens complémentaires qui se doivent d'être simples, économiques et fiables. C'est idéalement la place que devrait prendre la PCR afin de systématiser la recherche et l'identification de la bactérie.

L'anaplasmose est une zoonose. Ainsi, même si les répercussions directes semblent minimes pour les équadés, identifier et maîtriser la maladie chez le cheval semble nécessaire pour prévenir les infections humaines.

L'enquête séro-épidémiologique de 2007 repose sur la constitution d'un échantillon de 643 chevaux vivant dans le Sud-est de la France (Gard, Hérault et Bouches du Rhône). L'analyse sérologique par IFI de ces 643 sérums montre une prévalence pour l'anaplasmose équine de :

- 8,6% (IC_{95%} = 7,5 – 9,7) à l'échelle des chevaux,
- 39,3 % à l'échelle des écuries.

Parmi certaines informations recueillies sur les chevaux (âge, sexe, activité, race) et les écuries (activité principale), nous n'avons pas trouvé de facteur de risque associé à la séropositivité.

La comparaison des résultats obtenus pour 42 écuries incluses en 2001 et 2007 dans l'étude montre une augmentation importante du nombre d'écuries positives en 2007. Ainsi, il semblerait que l'infection soit émergente dans la Sud-Est de la France. Cependant, la comparaison de ces résultats reste délicate à interpréter car les tests sérologiques employés sont différents et que nous n'avons pas pu prouver leur équivalence.

Une nouvelle collecte de sérums a eu lieu de mai à juin 2008. Leur analyse sérologique fera certainement l'objet d'une autre thèse. Y a été associée la capture de tiques sur chacun des sites visités pour tenter d'identifier le vecteur d'*Anaplasma phagocytophilum* en Camargue.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS DH, LLOYD AR. (1997) Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*, **349**, 490-495.
- AGUERO-ROSENFELD ME, HOROWITZ HW, WORMSER GP, MC-KENNA DF, NOWAKOWSKI J, MUNOZ J, *et al.* (1996) Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. *Ann. Intern. Med.* **125**, 904-908.
- AGUERO-ROSENFELD ME, DONNARUMMA L, ZENTMAIER L. (2002) Seroprevalence of antibodies that react with *Anaplasma phagocytophila*, the agent of human granulocytic ehrlichiosis, in different populations in Westchester County, New York. *J. Clin. Microbiol.*, **40**(2), 612-615.
- AKGUL C, MOULDING DA, EDWARDS SW. (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis *FEBS Lett.*, **487**, 318-322
- AKKOYUNLU M, FIKRIG E. (2000) Gamma interferon dominates the murine cytokine response to the agent of human granulocytic ehrlichiosis and helps to control the degree of early rickettsemia. *Infect. Immun.*, **68**, 1827-1833.
- AKKOYUNLU M, MALAWISTA E, ANGUITA J, FIKRIG E. (2001) Exploitation of interleukine-8-induced neutrophil chemotaxis by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Infect. Immun.*, **69**, 5577-5588.
- ALEKSEEV AN, DUBININA HV, SEMENOV AV, BOLSHAKOV CV. (2001) Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. *J. Med. Entomol.*, **38**, 471-474.
- ALLEN JR (1994) Host resistance to ectoparasites. *Revue scientifique et technique de l'office international des épizooties*, **13**(4), 1287-1303.
- AMORY H, PITEL P-H. (2007) Le syndrome piro-like: diagnostic différentiel du syndrome piro-loke sur la base des symptômes et cas cliniques de cas de syndrome piro-like incluant les moyens de diagnostic. In : *Comptes rendu du congrès de l'AVEF*. Deauville, 18-20 octobre 2007. 248-256.
- ASANOVICH KM, BAKKEN JS, MADIGAN JE, AGUERO-ROSENFELD M, WORMSER GP, DUMLER JS. (1997) Antigenic diversity of granulocytic Ehrlichia isolates from humans in Wisconsin and New York and a horse in California. *J. Infect. Dis.*, **176**, 1029-1034.
- BABIOR BM. (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood*, **93**, 1464-1476.
- BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B. (1994) Interleukine-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.*, **55**, 97-179.
- BAKKEN JS, DUMLER JS. (2000) Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.*, **31**, 554-560.
- BAKKEN JS, DUMLER JS, CHEN SM, ECKMAN MR, VAN ETTA LL, WALKER DH. (1994). Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA*, **272**, 212-218.
- BAKKEN JS, KRUEH J, WILSON-NORDSKOG C, TILDREN RL, ASANOVICH K, DUMLER JS. (1996) Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA*, **275**, 199-205.
- BAKKEN JS, HALLER I, RIDDELL D, WALLS JJ, DUMLER JS. (2002) The serological response of patients infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.*, **34**, 22-27.
- BAKER JR, LEYLAND A. (1973) Diarrhoea in the horse associated with stress and tetracycline therapy. *Vet. Rec.*, **93**(22), 583-584.
- BANERJEE R, ANGUITA J, ROOS D, FIKRIG E. (2000) Cutting edge: infection by the agent of human granulocytic ehrlichiosis prevents the respiratory burst by downregulation gp91^{phox1}. *J. Immunol.*, **164**, 3946-3949

- BARBET AF, MEEUS PF, BELANGER M, BOWIE MV, YI J, LUNDGREN M, *et al.* (2003) Expression of multiple outer membrane protein sequence variants from a single genomic locus of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.*, **71**, 1706-1718.
- BARBET AF, LUNDGREN AM, RICK ALLEMAN AR, STUEN S, BJÖERSDORFF A, BROWN RN, *et al.* (2006) Structure of the expression site reveals global diversity in MSP2 (P44) variants in *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and immunity*, **74**(11), 6429-6437.
- BEHL R, KLEIN MB, DANDELET L, BACH RR, GOODMAN JL, KEY N. (2000) Induction of tissue factor procoagulant activity in myelomonocytic cells inoculated by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Thrombosis and Haemostasis*, **83**, 114-118.
- BJOERSDORFF A, SVENDENIUS L, OWENS JH. (1999) Feline granulocytic ehrlichiosis-a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. *J. Small Anim. Pract.*, **40**, 20-24.
- BJOERSDORFF A, BERGSTROM A, MASSUNG RF. (2001) *Ehrlichia*-infected ticks on migrating birds. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 877-879.
- BORJESSON DL, KOBAYASHI SD, WHITNEY AR, VOYICH JM, ARGUE CM, DELEO FR. (2005) Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *J. Immunol.*, **174**, 6364-6372.
- BOUCRAUT-BARALON C. (2001) PCR, un nouvel outil pour le diagnostic des maladies infectieuses chez le chien. *Prat Med Chir Anim Comp*, **36**, 515-521
- BOUCRAUT-BARALON C. (2002) La PCR: un nouvel outil diagnostique. *Prat Med Chir Anim Comp*, **37**(4), 15-18.
- BOWN K. J, BEGON M, BENNETT M, WOLDEHIWET Z, OGDEN NH. (2003) Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophilum* in rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**(1), 63-70.
- BOWN K. J, LAMBIN X, OGDEN N. H, PETROVEC M, SHAW SE, WOLDEHIVET Z *et al.* (2007) High resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* using multi-locus variable number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* **45**(6), 1771-1776.
- BROUQUI P. (1999) Ehrlichiosis in Europe. In: *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millennium*. Paris: Elsevier, 393-405.
- BROWNING M, GARYU JW, DUMLER JS, SCORPIO DG. (2006) Role of reactive nitrogen species in development of hepatic injury in a C57BL/6 mouse model of human granulocytic anaplasmosis. *Comp. Med.*, **56**, 55-62.
- CAMBIER J, MASSON M, DEHEN H, MASSON C. (2008) *Abrégé de neurologie*. 12^{ème} édition, Masson, Paris. 540p.
- CAO WC, ZHAN L, HE J, FOLEY JE, DE VLAS SJ, WU XM *et al.* (2006) Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 664-668.
- CARLYON JA, FIKRIG E. (2003) Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell. Microbiol.*, **5**, 743-754.
- CASPERSEN K, PARK J-H, PATIL S, DUMLER JS. (2002) Genetic variability and stability of *Anaplasma phagocytophilum* msp2 (p44). *Infect. Immun.*, **70**, 1230-1234.
- CASTRO MB, NICHOLSON WL, KRAMER VL, CHILDS JE. (2001) Persistent infection in *Neotoma fuscipes* (Muridae: Sigmodontinae) with *Ehrlichia phagocytophilum* sensu lato. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**, 261-267.
- CATUREGLI P, ASANOVICH KM, WALLS JJ, BAKKEN JS, MADIGAN JE, POPOV VL *et al.* (2000) *ankA*: an *Ehrlichia phagocytophilum* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. *Infect. Immun.*, **68**, 5277-5283.
- CHEN SM, DUMLER JS, BAKKEN JS, WALKER DH. (1994) Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 589-595.
- COLOTTA F, RE F, POLENTARUTTI N, SOZANNI S, MANTOVANI A. (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* **80**, 2012-2020.

- DANIELS TJ, BATTALY GR, LIVERIS D. (2002) Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 1524-1525.
- DE LA FUENTE J, GARCIA-GARCIA JC, BLOUIN EF. (2002) Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, **10**, 182-184.
- DE LA FUENTE J, NARANJO J, RUIZ-FONS F. (2004a) Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari : Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *Eur. J. Wild Res.*, **50**, 187-196.
- DE LA FUENTE J, VICENTE J, HOFLE U, RUIZ-FONS F, FERNANDEZ DE MERA RA, VAN DEN BUSSCHE RA *et al.* (2004b) *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. *Vet. Microbiol.*, **100**, 163-173.
- DE LA FUENTE J, NARANJO V, RUIZ-FONS F, HÖFLE U, FERNANDEZ DE MEAR IG, VILLANUA D *et al.* (2005,a). Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* in central Spain. *Vector-borne and zoonotic diseases.*, **5**(4), 390-402.
- DE LA FUENTE J, MASSUNG RF, WONG SJ, LUTZ H, MELI M, VON LOEWENICH FD, *et al.* (2005b) Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 1309-1317.
- DESJARDINS M. (2003) ER-mediated phagocytosis : a new membrane for new functions. *Nature Rev. Immunol.*, **3**, 280-291.
- DES VIGNES F, PIESMAN J, HEFFERNAN R. (2001) Effect of two tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J. Infect. Dis.*, **183**, 773-778.
- DEVERS P. (2002) *Enquête épidémiologique sur la babésiose bovine en France en 2002*. Thèse Méd. Vét., Nantes, n°178, 102 p.
- DUMLER JS. (2005) *Anaplasma* and *ehrlichia* infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1063**, 361-373
- DUMLER JS., BAKKEN JS. (1998) Human erlichioses: newly recognized infections transmitted by ticks. *Annu. Rev. Med.*, **49**, 201-213.
- DUMLER JS, BROUQUI P. (2004) Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **4**(4), 559-569.
- DUMLER JS, TRIGIANI ER, BAKKEN JS, AGUERO-ROSENFELD ME, WORMSER GP. (2000) Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7**, 6-8.
- DUMLER JS, BARBET AF, BEKKER PJ, DASCH GA, PALMER GH, RAY SC *et al.* (2001) Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 2145-2165.
- DUNNING HOTOPP JC, LIN M, MADUPU R, CRABTREE J, ANGIUOLI SV, EISEN J *et al.* (2006) Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLOS Genet.*, **2**, 208-223
- DURDEN LA, OLIVIER JH, BANKS CWJr, VOGEL GN (2002) Parasitism of lizards by immature stages of the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **26**, 257-266.
- EDELMAN DC, DUMLER JS. (1996) Evaluation of an improved PCR diagnostic assay for human granulocytic ehrlichiosis. *Mol. Diagn.*, **1**, 41-49.
- EGENVALL A, LILLIEHOOK I, BJOERSDORFF E, ENGVALL E, KARLSTAM E, ARTURSSON K *et al.* (2000) Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet. Rec.*, **146**, 186-190
- EUZEBY JP. Mise à jour le 4 février 2008. Dictionnaire de Bactériologie, *List of Prokariotic names with standing in Nomenclature* [en ligne], <http://www.bacterio.cict.fr>. (consulté le 20 nov. 2007).

- FRANZEN P, ASPAN A, EGENVALL A, GUNNARSSON A, ABERG L, PRINGLE J. (2005) Acute clinical, hematologic, serologic, and polymérase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European Strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Vet. Intern. Med.*, **19**, 232-239.
- FRANZEN P, BERG A-L, ASPAN A, GUNNARSSON A, PRINGLE J. (2007) Death of a horse infected experimentally with *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Record*, **160**, 122-125.
- FIO L. (1996) Mystery tick-borne disease of humans unmasked in horses. *J Equine Vet Sci*, **16**(3), 92-93.
- FOGGIE A. (1951) Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J. Pathol. Bacteriol.*, **63**, 1-15.
- FOLEY JE, KRAMER V, WEBER D. (2002) Experimental infection of dusky-footed wood rats (*Neotoma fuscipes*) with *Ehrlichia phagocytophila sensu lato*. *J. Wildl. Dis.*, **38**, 194-198.
- FRESNO M, KOPF M, RIVAS L (1997) Cytokines and infectious diseases. *Immunol. Today*, **18**, 56-58.
- FURMAN DP, LOOMIS EC (1984) The ticks of California (Acari: Ixodida). *Bull. Calif. Insect S Survv. University of California Press, Berkeley, CA*. **25**.
- GAGNON E, DUCLOS S, RONDEAU C, CHEVET E, CAMERON PH, STEELE-MORTIMER O. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*, **110**, 119-131.
- GARIN J, DIEZ R, KEIFFER S, DERMINE JF, DUCLOS S, GAGNON E. (2001) The phagosome proteome : insight into phagosome functions. *J. Cell. Biol.*, **152**, 165-180.
- GEORGE JC. Maladies a tiques [en ligne], mise à jour le 24 avril 2008, [www.maladies-a-tiques.com], (consulté le 21 mai 2008 à 10h30).
- GILOT B, GUIGEN C, DEGEILH B, DOCHE B, PICHOT J, BEAUCOURNU JC. (1994) Phytoecological mapping of *Ixodes ricinus* to the distribution of Kyme borreliosis in France. In: *Axford J. S. and Rees D. H. E. (eds), Lyme Borreliosis, Plenum Press, New York*. 105-112
- GOCKE HI, WOLDEHIWET Z. (1999) *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* predisposes to severe contagious ecthyma (Orf) in lambs. *J. Comp. Pathol.*, **121**, 227-240.
- GOCKE HI, ROSS G, WOLDEHIWET Z. (1999) Inhibiton of phagosome-lysosome fusion in ovine polymorphnucléar leucocytes by *Ehrlichia (Cytoectes) phagocytophila*. *J. Comp. Pathol.* **120**, 369-381
- GOETHERT HK, TELFORD 3rd SR. (2003) Enzootic transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis among cottontail rabbits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **68**, 633-637.
- GOODMAN JL, NELSON C, VITALE B, MADIGAN JE, DUMLER JS, KURTTI TJ, MUNDERLOH UG. (1996) Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.*, **334**, 209-215.
- GOODMAN JL, NELSON C, KLEIN MB, HAYES SF, WESTON BW. (1999) Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. *J. Clin. Invest.*, **103**, 407-412.
- GRESANLEUX M. (2006) *Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic et l'étude des maladies infectieuses chez les animaux de compagnie*. Thèse Méd. Vét., Nantes, n°127, 247p.
- GRIBBLE DH. (1969) Equine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **155**, 462-469
- GUILLOT J, BEUGNET F, FAYET G, GRANGE E, DANG H. (2005) Infestation par les tiques. In : *Parasitologie clinique des équidés*. Clichy : Kalianxis, **1**, 114-123.
- HARDALO CJ, QUAGLIARELLO V, DUMLER JS. (1995) Human granulocytic ehrlichiosis in Connecticut: report of a fatal case. *Clin. Infect. Dis.*, **21**, 910-914.
- HERRON MJ, NELSON CM, LARSON J, SNAPP KR, KANSAS GS, GOODMAN JL. (2000) Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. *Science*, **288**, 1653-1656.
- HOFMANN-LEHMANN R, MELI ML, DREHER UM. (2004) Concurrent infections with vector-borne pathogens as etiology of fatal haemolytic anemia in a cattle herd from Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3775-3780.

- HOMBURG CH, ROOS D. (1996) Apoptosis of neutrophils. *Curr. Opin. Hematol.*, **3**, 94-99.
- IJDO JW, MEEK JI, CARTTER ML. (2000) The emergence of another tickborne infection in the 12-twon area around Lyme, Connecticut: human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.*, **181**, 1388-1393.
- INOKUMA H, BROUQUI P, DRANCOURT M, RAOULT D. (2001) Citrate synthase gene sequence : a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3031-3039.
- INOKUMA H, BROUQUI P, DUMLER JS, RAOULT D. (2003) Serotyping isolates of *Anaplasma phagocytophilum* by using monoclonal antibodies. *Clin. And Diagn. Lab. Immunol.*, **10**(5), 969-972.
- JONCOUR G. (2003) Rickettsioses-zoonoses et autre arbo-bacterioses-zoonoses. Restitution des données (1999-2003). In : *Rickettsioses-zoonoses et autres arbo-bactérioses-zoonoses*, 11-12 sept. 2003, Ploufragan. I.S.P.A.I.A. Zoopôle Saint-Brieuc, Ploufragan. 58-100.
- KAWAHARA M, RIKIHISA Y, LIN Q, ISOGAI E, TAHARA K, ITAGAKI A, *et al.* (2006) Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and novel *Ehrlichia* sp.in wild deer end ticks on two major islands in Japan. *Applied and Environmental Microbiol.*, **72**(2), 1102-1109.
- KIM HY, RIKIHISA Y. (1998) Characterization of monoclonal antibodies to the 44-kilodalton major outer membrane protein of the human granulocytic ehrlichiosis agent. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 3278-3284.
- KIM HY, RIKIHISA Y. (2000) Expression of interleukin-1 β , tumor necrosis factor alpha, and interleukine-6 in human peripheral blood leukocytes exposed to human granulocytic ehrlichiosis agent or recombinant major surface protéine P44. *Infect. Immun.* **68**, 3394-3402.
- KIM CM, KIM MS, PARK MS, PARK JH, CHAE JS. (2003) Identification on *Ehrlichia chafeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *A.bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* ticks from Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **3**, 17-26.
- KLEIN MB, NELSON CM, GOODMAN JL. (1997) Antibiotic susceptibility of the newly cultivated agent of human granulocytic ehrlichiosis : promising activity of quinolones and rifamycins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 76-79.
- KLEIN MB, HU S, CHAO CC, GOODMAN JL. (2000) The agent of human granulocytic ehrlichiosis induces the production of myelosuppressing chemokines without induction of proinflammatory cytokines. *J. Infect. Dis.*, **182**, 200-205.
- KHON C.W., FENNER W.R. (1987) Equine Herpes myeloencephalopathy. *Vet. Clin. North Am, Equine Pract., neurologic diseases*, 405-421.
- LAPPIN MR, BREITSCHWERDT EB, JENSEN WA. (2004) Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in North America. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **225**, 893-896.
- LEBLOND A, PRADIER S, PITEL PH, FORTIER G, BOIREAU P, CHADOEUF J, SABATIER P. (2005a) Enquête épidémiologique sur l'anaplasmose équine (*Anaplasma phagocytophilum*) dans le Sud de la France. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **24**(3), 899-908.
- LEBLOND A, ZIENTARA S, CHADOEUF J, COMBY N, HENG MA, SABATIER P. (2005b) Prévalence de l'infection par le virus West Nile chez le cheval en Camargue en 2001. *Revue Med. Vet.*, **156**(2), 77-84.
- LEE KN, PADMALAYAM I, BAUMSTARK B, BAKER SL, MASSUNG RF. (2003) Characterization of the *ftsZ* gene from *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia rickettsii* and use as a differential PCR target. *DNA Cell. Biol.*, **22**, 3031-3039.
- LEPIDI H, BUNNELL JE, MARTIN ME, MADIGAN JE, STUEN S, DUMLER JS. (2000) Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-groupe infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **62**, 29-37.
- LEVI O, WANER T, BANETH G, KEYSARY A, BRUCHIM Y, SILVERMAN J, HARRUS S. (2006) Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophillum* among healthy dogs and horses in Israel. *J. Vet. Med.*, **53**, 78-80.

- LEVIN ML, NICHOLSON WL, MASSUNG RF. (2002) Comparison of the reservoir competence of medium-sized mammals and *Persulcatus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **2**, 125-136.
- LEWIS GE, HUXSOLL DL, RISTIC M, JOHNSON AJ. (1975) Experimentally induced infection of dogs, cats and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.* **36**(1), 85-88.
- LIN Q, RIKIHISA Y. (2005) Establishment of cloned *Anaplasma phagocytophilum* and analysis of p44 gene conversion within an infected horse and infected SCID mice. *Infection and Immunity*. **73**(8), 5106-5114.
- LIN Q, RIKIHISA Y, OHASHI N, ZHI N. (2003) Mechanisms of variable p44 recombination in *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.* **71**, 5650-5661.
- LIN Q, ZHI N, OHASHI N, HOROWITZ HW, AGUERO-ROSENFELD ME, RAFFALLI J, WORMSER GP, RIKIHISA Y. (2002) Analysis of sequences and loci of p44 homologs expressed by *Anaplasma phagocytophila* in acutely infected patients. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2981-2988.
- LIZ JS, ANDERES L, SUMNER JW. (2000) PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1002-1007.
- LIZ JS, SUMNER JW, PFISTER K, BROSSARD M. (2002) PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 892-897.
- LOTRIC-FURLAN S, AVSIC-ZUPANC T, PETROVEC M. (2001) Clinical and serological follow-up of patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 899-903.
- LOWE JB. (1997) Selectin ligands, leukocyte trafficking, and fucosyltransferase genes. *Kidney Int.*, **51**, 1418-1426.
- MADIGAN JE. (1993) Equine granulocytic ehrlichiosis. In: ROBISON NE editor. *Current therapy in equine medicine*. Philadelphia: WB Saunders Company, 78-80.
- MADIGAN JE, GRIBBLE DH. (1987) Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**, 445-448.
- MADIGAN JE, PUSTERLA N. (2000) Ehrlichial diseases. *Vet. Clin. North. Am. Equine. Pract.*, **16**(3), 487-499
- MADIGAN J.E., HIETALA S., CHAJMERS S., DEROCK E. (1990) Seroepidemiological survey of antibodies to *Ehrlichia equi* in horses of Northern California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **196**(12), 1962-1964.
- MAGNARELLI LA, VAN ANDEL AE, IJDO JW (1999a) Serologic testing of horses for granulocytic ehrlichiosis, using indirect fluorescent antibody staining and immunoblot analysis. *Am. J. Vet. Res.*, **60**, 631-635.
- MAGNARELLI LA, IJDO JW, STAFFORD KC III, FIKRIG E. (1999b) Infections of granulocytic *Ehrlichiae* and *Borrelia burgdorferi* in white-tailed deer in Connecticut. *J. Wildl. Dis.*, **35**, 266-274.
- MAGNARELLI LA, IJDO JW, VAN ANDEL AE, WU C, FIKRIG E. (2001a) Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses. *AJVR*. **62**(1), 29-32.
- MAGNARELLI LA, IJDO JW, VAN ANDEL AE, WU C, OLIVIER JH, FIKRIG E (2001b) Reactivity of serum samples of dogs and horses tested by use of class-specific recombinant-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of granulocytic ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **62**(9), 1365-1369.
- MARTIN H. (1998) *Les tiques chez les ovins en France métropolitaine: rôle pathogène et moyens de lutte*. Thèse Méd. Vét., Nantes, n°5, 101p.
- MARTIN ME, BUNNELL JE, DUMLER JS. (2000) Pathology, immunohistology, and cytokine responses in early phases of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model. *J. Infect. Dis.*, **181**, 374-378.
- MARTIN ME, CASPERSEN K, DUMLER JS. (2001) Immunopathology and ehrlichia propagation are regulated by interferon_γ and interleukine-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis. *Am. J. Pathol.* **158**, 1881-1888.

- MASSUNG RF, SLATER KG. (2003) Comparison PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 717-722.
- MASSUNG RF, OWENS JH, ROSS D, REED KD, PETROVEC M, BJOERSDORFF A, *et al.* (2000) Sequence analysis of the *ank* gene of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2917-2922.
- MASSUNG RF, PRIESTLEY RA, MILLER NJ. (2003) Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *J. Infect. Dis.*, **188**, 1757-1763.
- MAURIN M, BAKKEN JS, DUMLER JS. (2003) Antibiotic susceptibilities of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* strains from various geographic areas in the United States. *Agents Chemother*, **47**, 413-415.
- MCDADE JE, STAKEBAKE JR, GERONE PJ. (1969) Plaque assay system for several species of *Rickettsia*. *J. Bacteriol.* **99**, 910-912.
- MCEVER RP. (2002) Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **14**, 581-586.
- MCQUISTON JH, PADDOK CD, HOLMAN RC, CHILDS JE. (1999) The human ehrlichioses in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, **5**, 635-642.
- MOTT J, RIKIHISA Y. (2000) Human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits superoxide anion generation by human neutrophils. *Infect. Immun.*, **68**, 6697-6703.
- MUNDERLOH UG, MADIGAN JE, DUMLER JS, GOODMAN JL, HAYES SF, BARLOUGH JE *et al.* (1996) Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 664-670.
- MUNDERLOH UG, LYNCH MJ, HERRON MJ, PALMER AT, KURTTI TJ, NELSON R D, GOODMAN JL. (2004) Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Microbiol.*, **101**, 53-64.
- MURPHY CI, STOREY JR, RECCHIA J. (1998) Major antigenic proteins of the agent of human granulocytic ehrlichiosis are encoded by members of a multigene family. *Infect. Immun.*, **66**, 3711-3718.
- NOLEN-WALSTON RD, D'OENCH SM, HANELT LM, SHARKEY LC, PARADIS MR. (2004) Acute recumbency associated with *Anaplasma phagocytophilum* infection in a horse. *JAVMA*, **224**(12), 1964-1966.
- OAKS SC, OSTERMAN JV, HETRICK FM. (1977) Plaque assay and cloning of scrub typhus rickettsia in irradiated L-929 cells. *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 76-80.
- OGDEN NH, WOLDEHIWET Z, HART A. (1998a) Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease? *J. Med. Microbiol.* **47**, 475-482
- OGDEN NH, BOWN K, HORROCKS BK, WOLDEHIWET Z, BENNETT M. (1998b) Granulocytic Ehrlichia infection in Ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med. Vet. Entomol.* **12**, 423-429
- OGDEN NH, CASEY ANJ, WOLDEHIWET Z, FRENCH NP, BOWN KJ, ADAMS JDW, WOLDEHIWET Z. (2002) Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep « carriers » to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks. *Parasitology*, **124**, 127-136.
- OGDEN NH, CASEY ANJ, WOLDEHIWET Z, FRENCH NP. (2003) Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection. *Infection and Immunity*, **74**(4), 2071-2078.
- OHASHI N, ZHI N, LIN Q, RIKIHISA Y. (2002) Characterization and transcriptional analysis of genes clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. *Infect. Immun.*, **70**, 2128-2138.
- OHASHI N, INAYOSHI M, KITAMURA K, KAWAMORI F, KAWAGUCHI D, NISHIMURA Y, *et al.* (2005) *Anaplasma phagocytophila*-infected ticks, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1780-1783.
- OPORTO B, GIL H, BARRAL A, HURTADO A, JUSTE RA, GARCIA-PEREZ AL. (2003) A survey on *Anaplasma phagocytophila* in wild small mammals and roe deer (*Capreolus capreolus*) in northern Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **990**, 98-102.
- PARK J, CHOI KS, DUMLER JS. (2003) Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. *Infect. Immun.*, **71**, 4018-4025.

- PARK J, KIM KJ, CHOI K-S, GRAB DJ, DUMLER S. (2004) *Anaplasma phagocytophilum* AnkA binds to granulocyte DNA and nuclear proteins. *Cell. Microbiol.*, **6**(8), 743-751.
- PAROLA P, RAOULT D. (2001) Approche moléculaire de l'épidémiologie des maladies bactériennes transmises par les tiques. *Annales de biologie clinique*, **59**(2), 177-182.
- PAROLA P, BEATI L, CAMBON M, BROUQUI P, RAOULT D. (1998) Ehrlichial DNA amplification from *Ixodes ricinus* (Acari : Ixodae) in France. *J. Med. Entomol.*, **35**, 180-183.
- PAROLA P, CORNET JP, SANOGO YO, MILLER RS, THIEN HV, GONZALEZ JP *et al.* (2003) Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1600-1608.
- PALMER GH, KNOWLES Jr. DP, RODRIGUEZ JL. (2004) Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5381-5384.
- PEREZ-EID C. (2007) *Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*. 1^{ère} ed., Paris : Lavoisier, 314p.
- PETROVEC M, BIDOVEC A, SUMNER JW. (2002) Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. *Wien. Klin. Wochenschr.*, **114**, 641-647.
- PITT A, MAYORGA LS, STAHL PD, SCHAWRTZ AL. (1992) Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J. Clin. Invest.* **90**, 1978-1983.
- POBER JS. (1999) Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol. Res.*, **19**, 225-232.
- POLLOCK JD, WILLIAMS DA, GIFFORD MA, LI LL, DU X, FISHERMAN J *et al.* (1995) Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat. Genet.* **9**, 202-209.
- PORTILLO A, SANTOS AS, SANTIBANEZ S, BLANCO JR, IBARRA V, BACELLAR F *et al.* (2004) Deteccion de variants no patogenas de *Anaplasma phagocytophilum* en *Ixodes ricinus* de la peninsula ibérica. *Enferm. Infecc. Microbiol.*, **22**(supl.1), 151.
- PRADIER S. (2003) *Contribution à l'étude de l'ehrlichiose équine dans le Sud-est de la France*. Thèse Méd. Vét., Lyon, n°156, 130p.
- PUSTERLA N, CHAE J-S, KIMSEY RB, BERGER PUSTERLA J, DEROCK E, DUMLER JS *et al.* (2002) Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in horses using experimentally infected ticks (*Ixodes scapularis*). *J. Vet. Med.*, **49**, 484-488.
- RAOULT D, BROUQUI P. (1998) *Les rickettsioses*. Editions Elsevier, Paris, 190 p.
- REEVES EP, LU H, JACOBS HL, MESSINA CG, BOLSOVER S, GABELLA G *et al.* (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*, **416**, 291-297.
- REUBEL GH, KIMSEY RB, BARLOUGH JE, MADIGAN JE. (1998) Experimental transmission of *Ehrlichia equi* to horses through naturally infected ticks (*Ixodes pacificus*) from Northern California. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2131-2134.
- RICHTER PJ, KIMSEY RB, MADIGAN JE, BARLOUGH JE, DUMLER JS, BROOKS DL. (1996) *Ixodes pacificus* (Acari : Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae). *J. Med. Entomol.*, **33**, 1-5.
- RIKIHISA Y. (1991)
The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases.
Clin. Microbiol. Rev., **4**, 286-308.
- RIKIHISA Y. (1998) Rickettsial diseases. In: REED SM, BAYLY WM editors. *Equine Internal Medecine*, Philadelphia: WB Saunders Company, 112-123.
- RIKIHISA Y. (1999) Ehrlichiae of veterinary importance. In: BROUQUI P editor. *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millennium*. Paris: Elsevier, 393-405.

- SCAIFE H, WOLDEHIWET Z, ANTHONY HART C, EDWARDS S. W. (2003) *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. *Infect. Immun.*, **71**, 1995-2001.
- SCORPIO DG, AKKOYUNLU M, FIKRIG E, DUMLER JS. (2004) CXCR2 blockage influences *Anaplasma phagocytophilum* propagation but not histopathology in the mouse model of human granulocytic anaplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 963-968.
- SCORPIO DG, VON LOEWENICH FD, GÖBEL H, BOGDAN C, DUMLER JS. (2006) Innate immune response to *Anaplasma phagocytophilum* contributes to hepatic injury. *Clinical and vaccine immunology*, **13**(7), 806-809.
- SNAPP KR, HEITZIG CE, KANSAS GS. (2002) Attachment of the PGSL-1 cytoplasmic domain to the actin cytoskeleton is essential for leucocyte rolling on P-selectin. *Blood*, **99**, 4494-4502.
- STAYKOVA M, MAXWELL L, WILLENBORG D. (2000) Kinetics and polarization of the membrane expression of cytokine-induced ICAM-1 on rat brain endothelial cells. *J. Neuropathol. Exp. Neuro.*, **59**, 120-128.
- STUEN S, BERGSTROM K. (2001) Persistence of *Ehrlichia phagocytophila* infection in two age groups of lambs. *Acta. Vet. Scand.*, **42**, 453-458.
- STUEN SA, CASEY AN, WOLDEHIWET Z, FRENCH NP, OGDEN NH. (2006) Detection by the polymerase chain reaction of *Anaplasma phagocytophilum* in tissues of persistently infected sheep. *J. Comp. Pathol.* **134**, 101-104.
- SUMNER JW, NICHOLSON WL, MASSUNG RF. (1997) PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2087-2092.
- TAILLARDAT-BISCH AV, RAOULT D, DRANCONURT M. (2003) RNA polymerase β -subunit-based phylogeny of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. and *Wolbachia pipientis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 455-458.
- TATCHELL RJ, MOORHOUSE DE. (1970) Neutrophils: their role in the formation of a tick feeding lesion. *Science*, **167**, 1002-1003.
- TEGLAS M. B., FOLEY J. (2006) Differences in the transmissibility of two *Anaplasma phagocytophilum* strains by the North American tick vector species, *Ixodes pacificus* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **38**(1), 47-58.
- TELFORD SR, DAWSON JE, KATAVLOS P, WARNER CK, KOLBERT CP, PERSING DH. (1996) Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6209-6214
- TOMAS-ROUX C. (1998) Le cheval de race Camargue: présentation générale de la race. Etude démographique et dominantes pathologiques. » Thèse Méd. Vét., Lyon, n°47, 99p.
- VAN ANDEL AE, MAGNARELLI LA, HEIMER R, WILSON ML. (1998) Development and duration of antibody response against *Ehrlichia* species resembling the agent that causes human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *Acta Vet Scand*, **39**(4), 491-497
- VON LOEWENICH FD, BAUMGARTEN BU, SCHRÖPPEL K, GEIDÖRFER W, ROLLINGHOFF M, BOGDAN C. (2003). High diversity of *ankA* sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5033-5040.
- VON LOEWENICH FD, SCORPIO DG, REISCHL U, DUMLER JS, BOGDAN C. (2004) Frontline: control of *Anaplasma phagocytophilum*, an obligate intracellular pathogen, in the absence of inducible nitric oxide synthase, phagocyte NADPH oxidase, tumor necrosis factor, Toll-like receptor (TLR2) and TLR4, or the TLR adaptor molecule MyD88. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1789-1797.
- VRINS A. (1990) *Neurologie équine*. Cours de médecine interne. Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St Hyacinthe, Canada, 80p.
- WALKER DH. (2000) Diagnosing human ehrlichiosis: current status and recommendations. *ASM News*, **66**, 287-290.
- WALKER DH, DUMLER JS. (1997) Human granulocytic ehrlichiosis. Discovery and diagnosis of emerging tick-borne infections and the critical role of the pathologist. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **121**, 785-791.

- WALLS JJ, AGUERO-ROSENFELD M, BAKKEN JS. (1999) Inter- and intralaboratory comparison of *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent strains for serodiagnosis of HE by the immunofluorescence assay. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2968-2973.
- WANG T, MALAWISTA SE, PAL U, GREY M, MEEK J, AKKOYUNLU M. (2002) Superoxide anion production during *Anaplasma phagocytophila* infection. *J. Infect. Dis.*, **186**, 275-280.
- WANG X, RIKIHISA Y, LAI TH, KUMAGAI Y, ZHI N, REED SM. (2004) Rapid sequential changeover of expressed p44 genes during the acute phase of *Anaplasma phagocytophilum* infection in horses. *Infect. Immun.*, **72**, 6852-6859.
- WEBSTER P, CHICOINE LM, FIKRIG E. (1998) The agent of human granulocytic ehrlichiosis resides in an endosomal compartment. *J. Clin. Invest.*, **101**, 1932-1941.
- WEISBURG WG, BARNS SM, PELLETIER DA, LANE DJ. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697-703.
- WHITE G, PRIOR SD. (1982) Comparative effects of oral administration of thrimethoprim/sulphadiazine or tetracycline on the fecal flora of horses. *Vet. Rec.*, **111**, 316-318.
- WIKEL SK. (1999) Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int. J. parasitol.* **29**, 851-859.
- WOLDEHIWET Z, SCOTT GR. (1982) *In vitro* propagation of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever. *Vet. Microbiol.* **7**, 127-133.
- WORSMER GP, HOROWITZ HW, DUMLER JS, SCHARTZLAND J, AGUERO-ROSENFELD M. (1996) False-positive Lyme disease serology in human granulocytic ehrlichiosis (letter). *Lancet*, **347**, 209-215.
- WORSMER GP, HOROWITZ HW, NOWAKOWSKI J, McKENNA D, DUMLER JS, WARD *et al.* (1997) Positive Lyme disease serology in patients with clinical and laboratory evidence of human granulocytic ehrlichiosis (see comments). *Am. J. Clin. Pathol.*, **107**, 142-147.
- XU W, RAOULT D. (1998) Taxonomic relationships among spotted fever group rickettsiae as revealed by antigenic analysis with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 887-896.
- YAGO T, LEPPANEN A, CARLYON JA, AKKOYUNLU M, KARMAKAR S, FIGRIG E. (2003) Structurally distinct requirements for binding of PSGL-1 and sialyl lewis x to *Anaplasma phagocytophilum* and P-selectin. *J. Biol. Chem.*, **278**(39), 37987-37997.
- YOSHIE K, KIM H-Y, MOTT J, RIKIHISA Y. (2000) Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. *Infect. Immun.* **68**, 1125-1133.
- YU X, JIN Y, FAN M, XU G, LIU Q, RAOULT D. (1993) Genotypic and antigenic identification of two new strains of spotted fever group rickettsiae isolated from China. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 83-88.
- ZEMAN P, CINATL J, KABICKOVA H. (2002) Sodium valproate facilitates the propagation of granulocytic ehrlichiae (*Anaplasma phagocytophilum*) in HL-60 cells. *Experimental and Applied Acarology*, **28**, 203-208.
- ZHI N, OHASHI N, RIKIHISA Y. (1999) Multiple p44 genes encoding major outer membrane proteins are expressed in the human granulocytic ehrlichiosis agent. *J. Biol. Chem.* **274**, 17828-17836.