



HAL
open science

Etude des cycles épidémiologiques d'*Anaplasma phagocytophilum* en France : apport des approches de caractérisation génétique

Amélie Pierrette Chastagner

► To cite this version:

Amélie Pierrette Chastagner. Etude des cycles épidémiologiques d'*Anaplasma phagocytophilum* en France : apport des approches de caractérisation génétique. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. NNT : 2014CLF22503 . tel-01154213

HAL Id: tel-01154213

<https://theses.hal.science/tel-01154213>

Submitted on 21 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D. U. 2503

UNIVERSITE D'Auvergne
ANNEE : 2013-2014

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***
N° d'ordre : 645

Thèse :

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(SPÉCIALITÉ : ECOLOGIE, ÉPIDÉMIOLOGIE)

soutenue le : 28 Octobre 2014

AMÉLIE P. CHASTAGNER :

**Etude des cycles épidémiologique d'*Anaplasma
phagocytophilum* en France :
Apport des approches de caractérisation génétique**

Président : M. DELBAC Frédéric (*Univ. Blaise Pascal, Clermont-Fd*)
Membres : Mme LEBLOND Agnès (*INRA, Vetagro Sup Lyon*)
Mme HADDAD Naddia (*ENVA-ANSES-INRA, Maison Alfort*)
M. BAILLY Xavier (*INRA, Clermont-Ferrand*)
Rapporteurs : Mme CHEVILLON Christine (*CNRS, Montpellier*)
Mme MALANDRIN Laurence (*INRA, Nantes*)

INRA - UR346 Epidémiologie Animale

**Etude des cycles épidémiologiques d'*Anaplasma phagocytophilum* en France :
Apport des approches de caractérisation génétique**

par

Amélie P. CHASTAGNER

Née le 09 mai 1988 à Roanne

Soutenue publiquement le 28 Octobre 2014,
à l'INRA de Clermont-Ferrand-Theix

Directrice de thèse : Agnès LEBLOND

Encadrants : Xavier BAILLY

Gwenaél VOURC'H

Avertissements

Pour tous ceux qui souhaiteraient s'engager dans une thèse, sachez qu'il ne s'agit pas d'un simple CDD, mais plutôt d'un cheminement long et difficile vers la recherche de belles découvertes. Pour les plus chanceux la thèse sera un chemin paisible, pour les autres -dont je fais partie - ce sera un chemin turbulent avec ses bons et ses mauvais moments.

Pour réussir cette aventure mieux vaut être préparé et bien entouré. Pour ma part, en première ligne, il y avait mes parents et ma sœur qui me rappelaient qu'on n'arrive pas en thèse pour rien et qu'on doit s'accrocher pour réussir. Ensuite, j'ai été épaulé par mes trois encadrants, qui ont eu la lourde tâche de me « supporter » (dans le bon sens du terme bien sûr) pendant ces trois ans. J'ai également pu compter sur le soutien des membres de l'unité EpiA, et surtout de celui de mes collègues de bureau Sylvain Coly le dernier arrivé mais pas le dernier pour assurer l'ambiance, et mes deux « co-burottes » Elise Vaumourin et Maude Jacquot, qui ont partagé l'aventure de la thèse avec moi.

Il en fallait pas moins pour survivre à la thèse, car si comme moi vous choisissez d'intégrer du terrain et du laboratoire dans votre thèse, sachez que tout peut arriver !

J'ai découvert le laboratoire à mon arrivée dans l'unité avec Françoise Rieu-Lesme qui m'a transmis son savoir-faire et son amour du labo. Malgré ses bons conseils et ceux de Sébastien Masségli, le laboratoire a été pour moi très explosif : explosion du gel d'agarose dans le micro-onde, explosion de tubes de sang sous la pression du rebouchage, ou encore, explosion d'un composant d'un néon créant un début d'incendie dans le labo. Le laboratoire aurait pu être un vrai calvaire, mais c'était sans compter sur l'aide de Valérie Poux et Angélique Pion, qui ont contribué chaque jour à la bonne humeur dans le laboratoire, et qui ont su tourner toutes ces mésaventures en vrais moments de joie.

L'échantillonnage, qui est la base de toute notre recherche, est également un moment important. Il faut savoir donner de sa personne et survivre à toutes les situations : climat hivernal, attaque d'insectes en tout genre et d'aoûtats. La capture des chevreuils dans le froid et l'humidité de l'hiver n'a pas été des plus facile. Heureusement qu'il y avait la chaleureuse équipe du CEFS de l'INRA de Toulouse pour réchauffer l'atmosphère grâce au partage et à leur bonne humeur. Il serait également difficile d'oublier les bons moments passés avec les membres du projet OSCAR (Karen McCoy, Elsa Léger, Valérie Noël, Suzanne Bastian,

Grégoire Perez, Hélène Verheyden, Denis Picot, Joël Merlet, et Nicolas Cèbe) pour les collectes de tiques et de rongeurs. Quelquefois notre échantillonnage s'appuie sur des personnes qu'on ne connaît pas personnellement. C'est ainsi grâce à la générosité et à la motivation de Véronique Bachy, Céline Richomme, Eve Alfonso, Nadia Haddad, Thibaud Dugat, Loïc Legrand, Pierre Tritz, et Luc Chabanne que j'ai pu obtenir de nombreux échantillons. Sans oublier Guy Joncour, l'homme que l'on pourrait définir comme mon sponsor officiel, et qui a fortement contribué à faire connaître mes travaux à chacune de ses interventions.

Sans toutes ces personnes, et j'en oublie sûrement, je n'aurais jamais pu mener à bien ma thèse. C'est pourquoi, je tiens à leur dire à tous un très grand merci !

TABLE DES MATIERES

AVERTISSEMENTS	1
INTRODUCTION	7
CHAPITRE 1 : CARACTERISATION DES CYCLES D’<i>A. PHAGOCYTOPHILUM</i>, SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1 La bactérie : mécanismes de transmission et facteurs déterminants pour l’infection ...	15
1.1 Description de la bactérie.....	15
1.2 Les facteurs déterminants pour l’infection des tiques et des hôtes vertébrés	16
2 Les vecteurs et les hôtes impliqués dans les cycles épidémiologiques d’ <i>A. phagocytophilum</i>	21
2.1 Les vecteurs	21
2.2 Les hôtes vertébrés.....	23
3 Outils et méthodes d’identification des cycles épidémiologiques.....	28
3.1 Les outils disponibles.....	28
3.2 Les loci séquencés.....	32
4 Conclusion de la synthèse bibliographique.....	33
CHAPITRE 2 : DIVERSITE DES SOUCHES CHEZ LES ANIMAUX CLINIQUEMENT ATTEINTS PAR <i>A. PHAGOCYTOPHILUM</i> A L’ECHELLE DE LA FRANCE.....	37
1 Matériels et méthodes.....	37
1.1 Echantillonnage des cas cliniques.....	37
1.2 Echantillonnage des chevreuils.....	38
1.3 Préparation des échantillons avant l’amplification pour le séquençage	38
2 Analyses : méthodes phylogénétiques et statistiques	46
2.1 Phylogénie.....	46
2.2 Analyse multi-locus	46
3 Résultats et discussion.....	47
3.1 Présence de 3 groupes génétiques d’ <i>A. phagocytophilum</i> chez les bovins cliniquement malades en France	47
3.2 Les génotypes issus des chevaux et des chiens sont regroupés dans un seul cluster proche des souches humaines.....	53

3.3	<i>Quid</i> des animaux domestiques ne présentant pas de symptômes ?	54
CHAPITRE 3 : HYPOTHESES SUR LES CYCLES EPIDEMIOLOGIQUES (RECHERCHE DES HOTES RESERVOIRS ET DES VECTEURS)		59
1	Recherche des hôtes réservoirs potentiels par l'étude des prévalences.....	59
1.1	Matériels et méthodes	60
1.2	Résultats	61
1.3	Discussion	63
2	Recherche des réservoirs potentiels à l'échelle d'un site : les Vallons de Gascogne. ..	65
2.1	Matériels et méthodes	65
2.2	Résultats	71
2.3	Discussion	78
3	Recherche des vecteurs potentiels lorsque <i>I. ricinus</i> est absente dans une zone d'endémie : la Camargue.....	82
3.1	Echantillonnage.....	83
3.2	Détection et de caractérisation des génotypes d' <i>A. phagocytophilum</i>	85
3.3	Résultats	86
3.4	Discussion	88
DISCUSSION GENERALE		91
	Synthèse des résultats.....	93
	Améliorer la stratégie d'échantillonnage	95
	Optimiser la caractérisation des génotypes	98
	La co-infection : problème technique et implications biologiques	100
	Quelles mesures de prévention et de lutte peuvent être mises en place pour contrôler la propagation de l'anaplasmose granulocytaire ?	101
	Conclusion.....	104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		107
ANNEXES		117
	ANNEXE 1 : Single genotype of <i>Anaplasma phagocytophilum</i> identified from ticks, Camargue, France <i>Emerging Infectious Diseases</i> 2013.....	119
	ANNEXE 2 : Article en révision dans "Veterinary Research"	127

INTRODUCTION

On estime que 61% des maladies infectieuses chez l'homme sont causées par des agents pathogènes multi-hôtes, autrement dit qui infectent plusieurs espèces d'hôtes vertébrés (Cleaveland, Laurenson et al. 2001; Woolhouse and Gowtage-Sequeria 2005). Parmi les maladies multi-hôtes émergentes, au cours de la dernière décennie, près de 23% étaient des maladies vectorielles (Jones, Patel et al. 2008). Ces maladies ont de fortes chances de figurer parmi les maladies émergentes, car elles sont très sensibles aux changements climatiques et environnementaux que subit notre planète, et sont favorisées par l'accroissement des échanges mondiaux (OMS). Ces changements entraînent la modification de la répartition des espèces vectrices et d'hôtes, résultant en de nouveaux contacts entre populations et favorisant ainsi l'émergence. Les maladies transmises par les tiques, notamment *Ixodes ricinus*, en sont une bonne illustration car ce vecteur ubiquiste peut transmettre des pathogènes à de multiples hôtes lors de ses repas sanguins. Les tiques sont de plus très sensibles au changement global car elles passent une majeure partie de leur vie dans l'environnement (Medlock, Hansford et al. 2013; Estrada-Peña and de la Fuente 2014). Le contrôle des maladies multi-hôtes vectorisées constitue aujourd'hui un enjeu majeur pour limiter leur impact.

Les maladies multi-hôtes vectorisées se caractérisent par des cycles épidémiologiques complexes, difficiles à appréhender et rendant d'autant plus difficile la mise en place de gestion sanitaire. L'acquisition de connaissances sur la dynamique de diffusion des agents pathogènes (bactériens ou viraux) est essentielle pour le contrôle et la maîtrise de ces maladies. A minima, il est essentiel de déterminer quelles espèces sont impliquées dans le maintien et la transmission de l'agent pathogène. L'étude de la circulation des agents pathogènes chez les différents hôtes a longtemps été basée seulement sur la prévalence, en considérant chaque agent pathogène comme une seule entité, sans tenir compte des variabilités intra-spécifiques. Or, nous savons maintenant que la diversité génétique observée chez un agent pathogène a des conséquences sur son cycle épidémiologique. Par exemple, la maladie de Lyme a longtemps été considérée comme induite par une seule espèce bactérienne. Aujourd'hui, la caractérisation génétique a démontré que cette maladie est causée par un complexe d'espèces de *Borrelia*. Dans ce complexe, la différenciation des génotypes entre les espèces d'hôtes vertébrés suggèrent la présence de plusieurs cycles épidémiologiques (Jacquot, Bisseux et al. 2014). La connaissance sur les relations entre les hôtes et les différents variants est donc essentielle pour décrypter les différents cycles.

Ces dernières années, la démocratisation des outils d'épidémiologie moléculaire permet d'obtenir facilement et rapidement une description de la variabilité génétique grâce au

séquençage ADN. L'arrivée du séquençage haut-débit rend notamment possible de caractériser des génomes totaux ou d'amplifier une multitude de loci pour plusieurs individus en un seul séquençage. Récemment l'agent étiologique responsable de la « maladie foudroyante de la pintade » a été identifié grâce à un génotypage par séquençage haut débit sans *a priori* (Liais, Croville et al. 2012). Le génotypage permet également de différencier les souches d'agent infectieux. Les méthodes de caractérisation génétique sont de plus en plus utilisées pour retracer l'origine d'une souche et déterminer plus précisément les facteurs de risque de transmission. Par exemple, la comparaison des données génomiques concernant *Clostridium difficile* a permis d'une part de dater l'importation du variant 027 en Allemagne à 2007, et d'autre part de mettre en évidence que la circulation de la bactérie est favorisée par le système de fonctionnement hospitalier (Brisse, Brehony et al. 2014). Pour les maladies multi-hôtes vectorisées, la caractérisation génétique permet d'identifier différents variants pouvant infecter différentes communautés d'hôtes. Ces informations permettent de reconstituer le cycle épidémiologique d'un agent pathogène et ouvrent de nouvelles perspectives pour la gestion des maladies multi-hôtes vectorisées.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse est de mieux comprendre le cycle épidémiologique d'une bactérie multi-hôtes transmises par des vecteurs à l'aide des outils de biologie moléculaire. J'ai appliqué cet objectif à une maladie émergente transmise par les tiques, l'anaplasmose granulocytaire causée par *Anaplasma phagocytophilum*. Le cycle épidémiologique de cette bactérie est très peu documenté malgré l'importance de la maladie qu'elle provoque. En effet, l'anaplasmose granulocytaire (anciennement ehrlichiose granulocytaire) est une maladie au potentiel zoonotique reconnu, avec une incidence forte et en constante augmentation dans les zones endémiques aux Etats-Unis (Woldehiwet 2010). Même si très peu de cas humains ont été déclarés en Europe (moins d'une dizaine de cas en France (Kobel, Kern et al. 2011)), la maladie a été observée dans les troupeaux de bovins et chez les chevaux dans tous les départements français (Joncour, Pouliquen et al. 2006). L'anaplasmose granulocytaire est considérée comme une des principales maladies transmises par les tiques en médecine vétérinaire. Elle engendre des pertes économiques considérables dans les élevages touchés, en provoquant de la mortalité, des avortements et de l'agalaxie (Stuen 2007).

Actuellement, *A. phagocytophilum* a été détectée chez de nombreuses espèces de mammifères domestiques et sauvages (Stuen, Granquist et al. 2013). La contribution des mammifères sauvages à la propagation de la bactérie dans les troupeaux de mammifères domestiques n'a

pas encore été déterminée. Les premières études visant à caractériser cette bactérie ont mis en évidence la présence de plusieurs variants associés potentiellement à plusieurs cycles (Scharf, Schauer et al. 2011). Dans le cadre de ma thèse, de nouveaux marqueurs génétiques ont été développés afin de mieux caractériser la bactérie et décrire son cycle. Nous avons comparé la diversité génétique chez les hôtes domestiques, chez les hôtes sauvages suspectés d'être réservoirs et chez les tiques pour déterminer comment circulent les différents variants.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous explorons l'état des connaissances concernant le cycle épidémiologique d'*A. phagocytophilum* à travers une synthèse bibliographique. Nous présenterons les facteurs impliqués dans la transmission, l'implication des hôtes et des vecteurs connus de la bactérie et le bilan des techniques d'épidémiologie moléculaire utilisées pour l'étude d'*A. phagocytophilum*. Dans le second chapitre nous présenterons notre étude sur la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* chez les animaux domestiques présentant des symptômes cliniques. Enfin dans le dernier chapitre, nous dévoilerons les résultats de trois approches mises en place pour identifier les hôtes réservoirs et les vecteurs de la bactérie.

CHAPITRE 1 :

CARACTERISATION DES CYCLES

D'A. PHAGOCYTOPHILUM

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Caractérisation des cycles d'*A. phagocytophilum*, synthèse bibliographique

A. phagocytophilum est une bactérie intracellulaire à transmission non contagieuse, elle ne se transmet pas directement d'un hôte vertébré à un autre, à l'exception de rares cas de transmission lors de transfusions sanguines, ou par voie intra-utérine entre la vache et le veau (Pusterla, Braun et al. 1997; Jereb, Pecaver et al. 2012). La transmission entre les hôtes se fait essentiellement par l'intermédiaire d'un vecteur, principalement des tiques de la famille des *Ixodidae*. Dans la première partie de ce chapitre, nous verrons que le cycle de vie d'*A. phagocytophilum* dépend de sa survie dans les cellules de l'hôte vertébré et du vecteur, et de sa survie lors des passages entre la tique et l'hôte. Nous ferons ensuite un bilan des connaissances acquises sur les vecteurs et hôtes vertébrés identifiés comme porteurs de la bactérie, et de leurs implications dans le cycle. Enfin, nous présenterons les différents outils mis en place pour mieux comprendre la complexité du cycle d'*A. phagocytophilum*. Nous verrons quelles connaissances ils ont apportées et en quoi ces méthodes restent insuffisantes.

1 La bactérie : mécanismes de transmission et facteurs déterminants pour l'infection

1.1 Description de la bactérie

L'anaplasmose granulocytaire a été observée pour la première fois en 1932 dans un troupeau de moutons en Ecosse (Macleod and Gordon 1933). Cette maladie était caractérisée par une forte fièvre coïncidant avec la présence de tiques. Elle fut ainsi longtemps nommée la « *tick-borne fever* » (TBF ou fièvre à tique). Depuis sa découverte, des cas de TBF ont été rapportés dans tout le reste de l'Europe, principalement chez les ovins et les bovins. L'agent pathogène responsable de cette maladie a été identifié par Foggie en 1951 comme étant une bactérie de la famille des rickettsies, infectant les granulocytes, qu'il nomma alors *Rickettsia phagocytophila* (Foggie 1951). La maladie a ensuite été décrite aux USA chez le cheval en 1969 (Gribble 1969), chez le chien en 1982 (Madewell and Gribble 1982) et chez l'homme en 1994 (Chen, Dumler et al. 1994) sous trois appellations différentes : l'ehrlichiose granulocytaire équine, canine et humaine respectivement. Ce n'est qu'en 2001, lors de l'étude phylogénétique visant à réorganiser la classification de l'ordre des Rickettsiales (Dumler, Barbet et al. 2001), qu'il a été prouvé que les trois ehrlichioses granulocytaires étaient dûes à

une seule espèce bactérienne appartenant aux *Anaplasmataceae* et la bactérie a été renommée *Anaplasma phagocytophilum* (Figure 1).

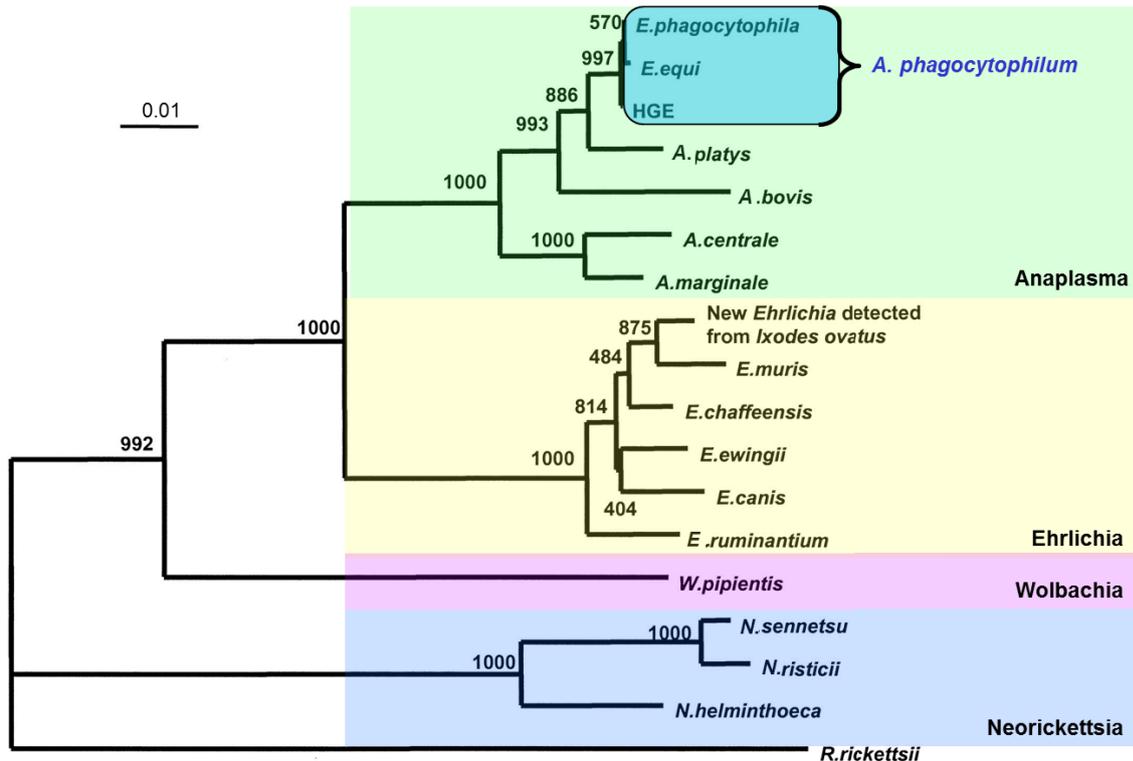


Figure 1 : Phylogénie des Anaplasmataceae basée sur l'ARNr 16S. (Figure adaptée de Inokuma H et al. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001 ;8 :241-244)

A. phagocytophilum est une bactérie intracellulaire stricte, gram négative, qui infecte les granulocytes neutrophiles. Elle vit et se réplique au sein de vacuoles, appelées morula, formées par les membranes des cellules infectées. Cette bactérie mesure entre 0,4 et 1,3 μm et présente deux morphotypes : réticulé (RC) et noyau dense (« *dense core* » ou DC). Le morphotype réticulé est la forme répliquative non infectieuse du cycle de développement d'*A. phagocytophilum*, alors que le morphotype en noyau dense est la forme infectieuse, résistant aux changements environnementaux, qui peut sortir de la cellule de l'hôte pour en infecter une autre (Woldehiwet and Scott 1982; Troese, Kahlon et al. 2011).

1.2 Les facteurs déterminants pour l'infection des tiques et des hôtes vertébrés

A. phagocytophilum circule entre les différents hôtes par l'intermédiaire des tiques (Figure 2). La tique acquiert la bactérie en prenant un repas de sang sur un hôte vertébré infecté, puis elle transmet la bactérie à un hôte vertébré sain lors du repas suivant. Le cycle de vie

d'*A. phagocytophilum* dépend donc de l'efficacité des transmissions de la tique vers l'hôte vertébré et *vice-versa*, mais également de sa survie dans la tique entre les différents repas et dans les cellules de l'hôte vertébré.

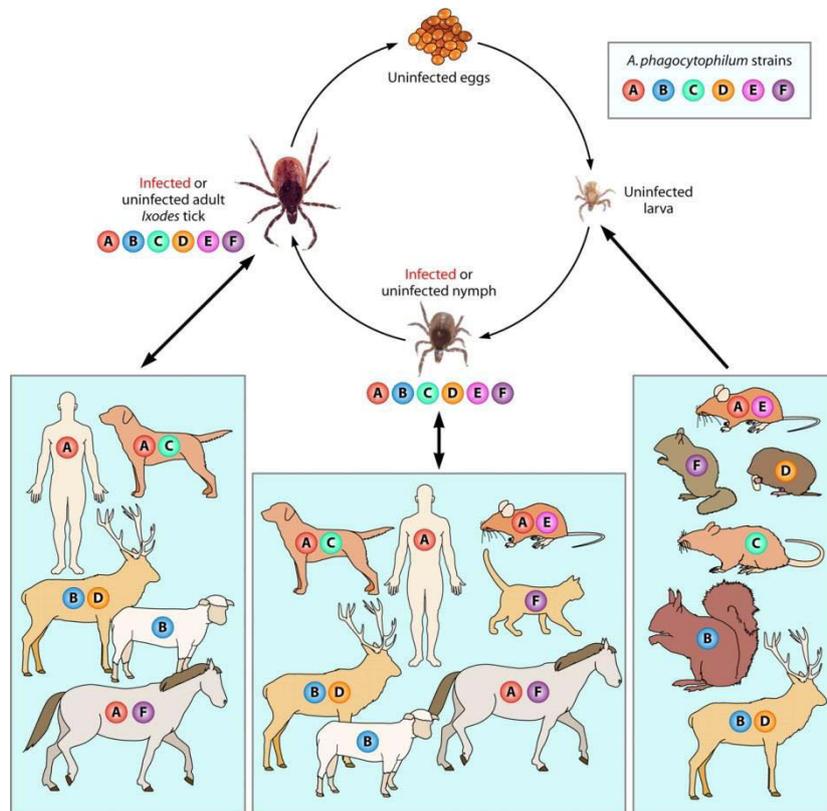


Figure 2 : Cycle de transmission d'*Anaplasma phagocytophilum*. Figure extraite de Rikihisa (2011)

1.2.1 Facteurs intervenants lors de la transmission d'un hôte vertébré infecté à une tique

Chez les tiques du genre *Ixodes*, il n'y a pas de transmission trans-ovarienne de la bactérie (de la tique femelle adulte aux œufs), les tiques sont donc non infectées à la naissance et acquièrent la bactérie en se gorgeant sur un hôte infecté (Macleod and Gordon 1933). Après la mue, la tique reste en général infectée par transmission transstadiale. Elle peut transmettre la bactérie à un hôte vertébré sain lors du repas sanguin suivant. Cependant, la réussite de la transmission transstadiale dépend fortement de la quantité de bactérie ingérée par la tique lors du repas précédent la mue (Ogden, Casey et al. 2002b).

Plusieurs facteurs entrent en jeu dans l'efficacité de la transmission entre l'hôte vertébré infecté et une tique saine :

- **le stade de développement de la tique et la durée de gorgement.** Plus la tique est à un stade développé, plus elle ingère de sang et donc de cellules infectées. La probabilité d'acquisition de la bactérie par une nymphe est ainsi plus forte que pour une larve. La durée de gorgement influe de la même façon sur la quantité de cellules infectées ingérée (Kocan, Busby et al. 2012).
- la **bactériémie chez l'hôte** affecte l'acquisition de la bactérie par la tique et la persistance de l'infection après la mue de la tique. En effet, chez tiques expérimentales infectées sur des moutons, une diminution du taux de transmission a été observée entre la phase d'infection aiguë et post-aiguë de l'hôte (Ogden, Casey et al. 2003).
- **le nombre de tiques en gorgement sur l'hôte infecté module également le taux de transmission.** Lors d'infections expérimentales de tiques par gorgement sur des moutons infectés, le taux d'infection des tiques dépendait fortement de la quantité de tiques adultes présentes sur l'hôte (Ogden, Casey et al. 2002a; Ogden, Casey et al. 2002b). Cette relation est non linéaire et dépend de plusieurs mécanismes : la transmission par « *co-feeding* », l'évitement des défenses immunitaire de l'hôte contre les tiques et l'attraction des cellules infectées. L'augmentation du nombre de tiques en gorgement sur un hôte, augmente l'occurrence de transmission par « *co-feeding* ». En effet, une tique infectée diffuse des bactéries au cours de son gorgement. Une tique non infectée peut alors acquérir la bactérie en se gorgeant à proximité d'une tique infectée, sans que l'hôte vertébré n'ait obligatoirement acquis l'infection (Ogden, Casey et al. 2002b). De plus, la présence de tiques adultes en *co-feeding* impacte le système immunitaire de l'hôte, d'une part en contrant les anticorps anti-tiques produits par l'hôte, et d'autre part en attirant des cellules inflammatoires vers les zones de morsures. Ces deux processus augmentent la probabilité de transmission de la bactérie (Ogden, Casey et al. 2002b). L'attraction des granulocytes près des lésions résulte d'une réponse immunitaire de l'hôte. Elle est d'autant plus importante que le nombre de tiques en gorgement est élevé, mais un excès de tiques peut inhiber cette réponse. Ainsi la relation entre le nombre de tiques en gorgement et le nombre de tiques qui acquièrent la bactérie est non linéaire. L'agrégation des granulocytes près des

morsures explique également la possibilité d'infection des tiques sur des hôtes malgré tout révélés PCR-négatif lors de prises de sang.

Le taux de transmission entre l'hôte et la tique dépend fortement de l'espèce de tique et de l'espèce d'hôte vertébré sur lequel elle s'est nourrie. Plusieurs espèces de tiques sont porteuses d'*A. phagocytophilum*, cependant le taux d'acquisition de la bactérie est très variable selon l'espèce. Par exemple, seulement 11% des nymphes *D. variabilis* résultant de larves gorgées sur des souris infectées expérimentalement étaient positives contre 26% des nymphes *I. scapularis* (Des Vignes, Levin et al. 1999). L'espèce d'hôte vertébré impacte également le taux de transmission vers la tique, car la bactériémie et la durée d'infection, qui ont un fort impact sur l'acquisition de la bactérie, dépendent des défenses immunitaires propres à chaque espèce d'hôtes vertébrés. De plus, il semblerait que les anticorps produits par les hôtes et ingérés par la tique peuvent détruire la bactérie dans la tique (Levin and Fish 2000).

1.2.2 Facteurs intervenants dans la survie d'*A. phagocytophilum* dans la tique

Lors du passage de l'hôte à la tique, la bactérie rencontre plusieurs barrières liées au changement de milieu et au système immunitaire de la tique. *A. phagocytophilum* manipule l'expression de plusieurs gènes chez la tique pour l'infecter et survivre (ex : ubiquitine, subolesin, XIAP, Salp16, P11...) (Hajdusek, Sima et al. 2013). Durant le repas de sang de la tique, la bactérie s'installe dans les cellules du tube digestif et migre vers les glandes salivaires. La protéine P11 produite par la tique facilite la migration d'*A. phagocytophilum* vers les glandes salivaires et la protéine Salp 16 permet sa survie dans les glandes salivaires (Sukumaran, Narasimhan et al. 2006). *A. phagocytophilum* agit également sur l'expression de gènes liés à la survie de son vecteur. En effet, sa présence favorise la survie de la tique en hiver en entraînant une augmentation de la production de glycoprotéines protectrices contre le gel (Neelakanta, Sultana et al. 2010).

1.2.3 Facteurs intervenants lors de la transmission d'une tique infectée à un hôte vertébré

Les mécanismes permettant à la bactérie de sortir des cellules des glandes salivaires de la tique pour infecter l'hôte sont encore peu connus. Comme pour la transmission de l'hôte vers la tique, plusieurs facteurs sont impliqués dans l'efficacité de la transmission de la bactérie à l'hôte. La réussite de la transmission de la tique infectée à un hôte sain nécessite une quantité de bactéries minimale. Les études expérimentales sur le mouton montrent qu'un seuil de 4,3 cellules hôtes infectées est nécessaire pour établir une infection (Stuen and Artursson 2000). Outre ce seuil, lié à la quantité de bactéries chez la tique, d'autres facteurs directement liés aux défenses immunitaires de l'hôte sont impliqués dans l'efficacité de la transmission de la tique à l'hôte vertébré. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les mammifères acquièrent une résistance aux tiques qui augmente avec la fréquence de morsures. Ainsi les moutons les plus jeunes sont plus sensibles aux tiques, la transmission d'*A. phagocytophilum* est donc plus efficace (Ogden, Casey et al. 2002b). De plus, les hôtes infectés par *A. phagocytophilum* développent des anticorps contre la bactérie et sont donc au moins partiellement protégés des réinfections. Cependant la diversité des souches et de leurs propriétés antigéniques permet la réinfection des hôtes malgré la présence d'anticorps.

1.2.4 Facteurs intervenants dans la survie d'*A. phagocytophilum* dans l'hôte

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

Pour détourner le système immunitaire et exploiter les cellules de l'hôte, *A. phagocytophilum* utilise un système de sécrétion de type IV. Deux molécules effectrices sécrétées par ce système ont été identifiées comme étant essentielles pour l'infection, *ankA* et *Ats-1*. *ankA* facilite l'infection intracellulaire par l'activation de la voie de signalisation *Abl-1* (Lin, Den Dulk-Ras et al. 2007) et par la manipulation des processus de la cellule hôte en interagissant avec la protéine *Ats-1* qui intervient notamment dans le blocage de l'apoptose (Niu, Kozjak-Pavlovic et al. 2010; Rikihisa, Lin et al. 2010). En outre, *ankA* interagit avec d'autres régions régulatrices du génome de l'hôte pour diminuer l'expression de gènes clés dans la défense de l'hôte comme CYBB (gp91phox) (Garcia-Garcia, Rennoll-Bankert et al. 2009).

Le génome d'*A. phagocytophilum* est composé de nombreux gènes impliqués dans les interactions avec les cellules hôtes. Il possède plus de 110 gènes codants des protéines majeures de surface permettant de reconnaître et d'adhérer aux cellules cibles, et de contrer les anticorps produits par l'hôte (Rikihisa 2010; Rejmanek, Foley et al. 2012a). Parmi ces gènes se trouvent les gènes *msp2/p44* dont l'expression évolue rapidement pour limiter la reconnaissance de la bactérie par les anticorps de l'hôte. Les études *in vitro* ont permis d'évaluer le taux d'évolution du site d'expression de *msp2* entre 1 et 2% par semaine chez la souris (Rejmanek, Foley et al. 2012b).

Enfin, *A. phagocytophilum* possède trois paires de gènes impliquées dans la synthèse de systèmes à deux composantes, *PleC/pleD*, *CckA/CtrA* et *NtrY/NtrX*. Ces gènes permettent de réguler l'infection selon les conditions environnementales (Rikihisa 2011).

Bilan

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

2 Les vecteurs et les hôtes impliqués dans les cycles épidémiologiques d'*A. phagocytophilum*

2.1 Les vecteurs

A. phagocytophilum est transmise entre les hôtes de façon indirecte par l'intermédiaire d'un vecteur. La participation d'une espèce donnée en tant que vecteur dans un cycle épidémiologique est définie par sa compétence et sa capacité vectorielle. La compétence vectorielle est déterminée par l'aptitude à s'infecter, à assurer le développement de l'agent infectieux et à le transmettre à un hôte réceptif. La compétence vectorielle ne peut être testée qu'expérimentalement. Pour les arthropodes qui transmettent les agents pathogènes par pique ou morsure, tels que les tiques, la compétence vectorielle peut être testée par xénodiagnose. La xénodiagnose consiste à mettre les arthropodes sains en contact avec des hôtes infectés pour vérifier leur capacité à s'infecter, puis de les mettre en contact avec des hôtes sains pour

vérifier leur capacité à transmettre. La capacité vectorielle est la résultante de la compétence vectorielle et de l'écologie du vecteur (abondance, longévité, préférences trophiques, *etc.*). La capacité vectorielle permet d'évaluer la contribution d'une espèce à la propagation de l'agent pathogène. A défaut de pouvoir déterminer expérimentalement la compétence et la capacité vectorielle, l'implication potentielle d'un invertébré comme vecteur est le plus souvent évaluée par la prévalence de l'agent pathogène chez celui-ci.

Pour *A. phagocytophilum* les principaux arthropodes porteurs de la bactérie sont les tiques de la famille des *Ixodidae*. La compétence vectorielle a été prouvée pour *I. scapularis* et *I. pacificus* aux Etats-Unis (Telford, Dawson et al. 1996; Teglas and Foley 2006), *I. ricinus* et *I. trianguliceps* en Europe (Macleod and Gordon 1933; Bown, Lambin et al. 2008). Les prévalences déterminées chez les tiques par détection d'ADN bactérien sont très variables selon les zones échantillonnées, le stade de développement de la tique et l'espèce testée. Par exemple, les taux d'infections observés chez les nymphes d'*I. ricinus* sont compris entre moins de 1% et 24%, chez *I. scapularis* de moins de 1% à 50% et chez *I. pacificus* de moins de 1% à 10% (Stuen, Granquist et al. 2013). La bactérie a été détectée chez d'autres espèces de tiques pour lesquelles la compétence vectorielle n'a pas été testée, en particulier chez des tiques du genre *Ixodes* (*I. dentatus*, *I. ovatus*, *I. nipponensis*, *I. ventralloi*), mais aussi chez des espèces du genre *Dermacentor* (*D. variabilis*, *D. occidentalis*, *D. silvarum*, *D. reticulatus*, *D. albipictus*), *Amblyomma* (*Amblyomma americanum*) ou *Haemaphysalis* (*H. megaspinosa*, *H. douglasii*, *H. longicornis*, *H. japonica*, *H. concinna*) (Stuen, Granquist et al. 2013). Peu d'études ont été menées sur d'autres arthropodes, cependant la présence d'*A. phagocytophilum* a été montrée chez les aoutats (Fernández-Soto, Perez-Sanchez et al. 2001) et chez un acarien qui vit dans le plumage des oiseaux, *Dermoglyphus passerinus* (Skoracki, Michalik et al. 2006).

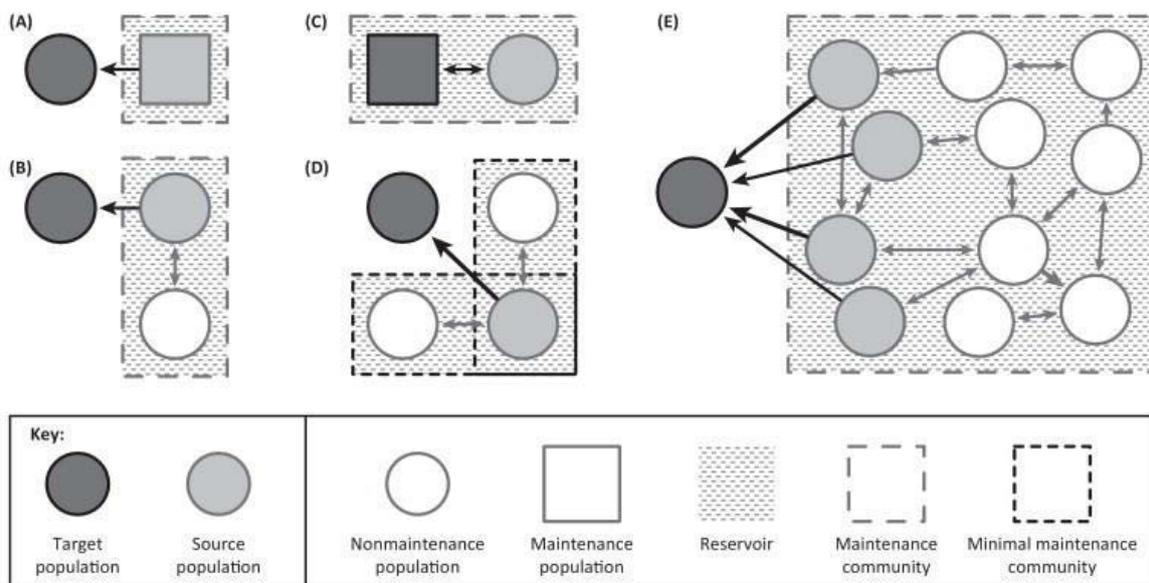
La diversité des espèces vectrices potentielles peut avoir des conséquences sur les cycles épidémiologiques de la bactérie, et peut expliquer en partie la diversité de souches d'*A. phagocytophilum* et de cycles observés. En effet, certaines tiques ont des niches écologiques spécifiques avec des préférences trophiques strictes, comme *D. albipictus* qui se nourrit exclusivement sur l'élan. Ces préférences trophiques peuvent induire un cycle bactérien spécifique à l'espèce vectrice et à certains hôtes. De plus, les différences de prévalence au sein des vecteurs et la différence d'efficacité de transmission peuvent favoriser la propagation de certaines souches. Ce phénomène a été démontré pour *I. scapularis* et *I. pacificus* pour lesquelles le différentiel de capacité vectorielle favorise une ségrégation Est-

Ouest des souches d'*A. phagocytophilum* aux Etats-Unis (Teglas and Foley 2006) ; et pour *I. ricinus* et *I. trianguliceps* pour lesquelles le différentiel a conduit à la coexistence de souches spécifiques à chacune des espèces (Bown, Lambin et al. 2008).

Le cycle d'*A. phagocytophilum* est fortement lié au cycle de vie de son vecteur. Cependant, en l'absence de transmission trans-ovarienne chez les tiques (à l'exception de *D. albipictus* (Baldrige, Scoles et al. 2009)), le maintien du cycle d'*A. phagocytophilum* n'est possible qu'en présence d'hôtes réservoirs vertébrés.

2.2 Les hôtes vertébrés

Dans le cycle épidémiologique des agents pathogènes, il est important d'identifier les hôtes réservoirs de ceux qui ne le sont pas. Une espèce est considérée comme réservoir lorsqu'elle présente un niveau et une durée infection suffisante pour maintenir l'agent pathogène dans l'écosystème et le retransmettre (Ashford 2003). Le concept de réservoir est actuellement controversé car le maintien de l'agent pathogène peut s'effectuer par l'interaction de plusieurs espèces, qui ne pourraient pas maintenir seules l'agent pathogène (Figure 3, Viana, Mancy et al. 2014).



TRENDS in Ecology & Evolution

Figure 3 : Représentation des différents types de réservoir du plus simple (A) composé d'une seule population de maintenance, au plus complexe (E) où le réservoir est composé d'un ensemble d'espèces qui ne maintiennent pas le pathogène lorsqu'elles sont indépendantes. Figure extraite de Viana, Mancy et al 2014.

L'implication d'une espèce en tant que réservoir est difficile à établir. La compétence d'une espèce à maintenir l'agent pathogène et son aptitude à le retransmettre peut être évaluée par des infections expérimentales (par xénodiagnose pour les pathogènes vectorisés) et par des suivis longitudinaux de la prévalence chez les populations d'hôtes testées. Cependant ces méthodes ne sont pas applicables à toutes les espèces, car la mise en place de suivis de populations et la manipulation des espèces sauvages est difficile. Le plus souvent les espèces sont décrites comme réservoir sur des indices de prévalence, telles qu'une forte prévalence associée à une forte probabilité de rencontre avec le vecteur.

Pour *A. phagocytophilum*, les recherches expérimentales menées aux Etats-Unis par xénodiagnose ont permis d'identifier la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) comme principal hôte réservoir dans l'Est et le rat des bois (*Neotoma fuscipes*) dans l'Ouest du continent (Telford, Dawson et al. 1996; Nicholson, Castro et al. 1999). La compétence de réservoir a été prouvée par xénodiagnose sur d'autres espèces de mammifères de petite et moyenne taille, parmi lesquelles les ratons laveurs (*Procyon lotor*), les opossums (*Didelphis sp.*), les tamias (*Tamias sp.*), les écureuils (*Sciurus griseus*, *Tamiasciurus douglasii* et *Glaucomys sabrinus*), et les mouffettes (*Mephitis mephitis*) (Levin, Nicholson et al. 2002; Foley, Nieto et al. 2008b). Le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) est quant à lui décrit comme réservoir aux Etats-Unis sur la base de la présence de fortes prévalences (Stuenkel, Granquist et al. 2013). En Europe, à notre connaissance peu d'études ont été réalisées pour vérifier la compétence des espèces infectées en tant que réservoir.

Les données sont difficilement comparables entre les deux continents, car les espèces touchées, les souches circulantes et leurs impacts sont très différentes. Aux Etats-Unis de nombreux cas humains sont déclarés chaque année (près de 1800 cas déclarés en 2010 d'après le CDC), alors que les animaux domestiques d'élevage sont très peu touchés par la bactérie. Au contraire en Europe, peu de cas humains ont été identifiés, mais l'anaplasmose entraîne de nombreuses pertes dans les élevages bovins et ovins. Par exemple, la mortalité due à *A. phagocytophilum* chez les ovins en Grande-Bretagne est estimée à 300 000 cas par an (Brodie, Holmes et al. 1986). Chez les bovins l'incidence n'a pas été évaluée, mais une étude de suivi sérologique menée sur sept troupeaux en Belgique montre qu'au cours d'une année plus de 55% des animaux deviennent séropositifs (Lempereur, Lebrun et al. 2012). Dans les paragraphes suivants nous proposons de faire le bilan des connaissances sur le statut des espèces infectées par la bactérie pour l'Europe seulement.

En Europe, depuis la découverte de la bactérie chez les moutons, l'anaplasmose granulocytaire a été détectée chez de nombreuses espèces domestiques (bovins, chevaux, chèvres, chiens et chats). Les symptômes sont très variables selon l'espèce, la sensibilité des individus et la souche d'*A. phagocytophilum* (Foggie 1951; Stuen, Grova et al. 2011). Les symptômes de l'anaplasmose granulocytaire ne sont pas spécifiques, les plus fréquents sont l'hyperthermie, l'abattement, l'inappétence et la présence d'œdème. Chez les chevaux, la maladie s'accompagne d'ictère, de tachycardie, de thrombocytopénie et éventuellement d'anémie et /ou leucopénie (Dzięgiel, Adaszek et al. 2013). Chez les chiens et les chats, la maladie est très peu décrite, les cas observés font état d'hyperthermie, de tachypnée, d'anorexie, de douleurs articulaires et de thrombocytopénie (Carrade, Foley et al. 2009; Heikkila, Bondarenko et al. 2010). Chez les ruminants, une agalaxie et des œdèmes des paturons sont observés. Des avortements ont été déclarés chez des brebis et des vaches infectées par *A. phagocytophilum*, mais l'implication de la bactérie n'a pas été prouvée. Lors de l'invasion des granulocytes par *A. phagocytophilum*, la bactérie bloque le système immunitaire pour survivre, créant ainsi une immunodépression. Chez le mouton 90% de la mortalité est due à une infection secondaire facilitée par cette immunodépression (Stuen, Nevland et al. 2003). La persistance de la bactérie varie selon la souche et la sensibilité des individus (Granquist, Bardsen et al. 2010). Les infections expérimentales montrent que la maladie se déclare par une phase aigüe en moins de 48h après la morsure par une tique infectée et dure en moyenne une semaine (Granquist, Stuen et al. 2008). Des cas d'infections chroniques ont été déclarés chez les chevaux, les bovins et les ovins (Thomas, Birtles et al. 2012; Dzięgiel, Adaszek et al. 2013). Deux hypothèses peuvent expliquer cette chronicité : la réinfection au contact de nouvelles tiques infectées, ou l'évolution de la souche infectante. Le suivi longitudinal d'agneaux naïfs installés en zone d'endémie, a mis en évidence la présence de 24 variants circulant dans le troupeau sur une période de 16 semaines. Chaque agneau a été porteur de plusieurs variants pendant cette période (Ladbury, Stuen et al. 2008). La réinfection est, dans ce cas, due à la fréquence des morsures par des tiques infectées. En outre, les infections expérimentales montrent que la variation des antigènes membranaires permet à la bactérie d'évoluer parallèlement à la mise en place de la défense immunitaire de l'hôte. Une infection chronique provenant d'une seule souche est alors observée (Granquist, Stuen et al. 2008). Chez le mouton, le premier pic infectieux s'accompagne de manifestations cliniques aigües qui ne sont pas observées lors des autres pics (Figure 4). De plus, il a été montré que les moutons pouvaient rester porteurs de la bactérie jusqu'à 25 mois (Foggie 1951) et que la bactérie pouvait persister dans les tissus internes sans être détectable dans le sang (Stuen,

Casey et al. 2006). C'est pourquoi les moutons sont considérés comme une espèce réservoir pour *A. phagocytophilum*.

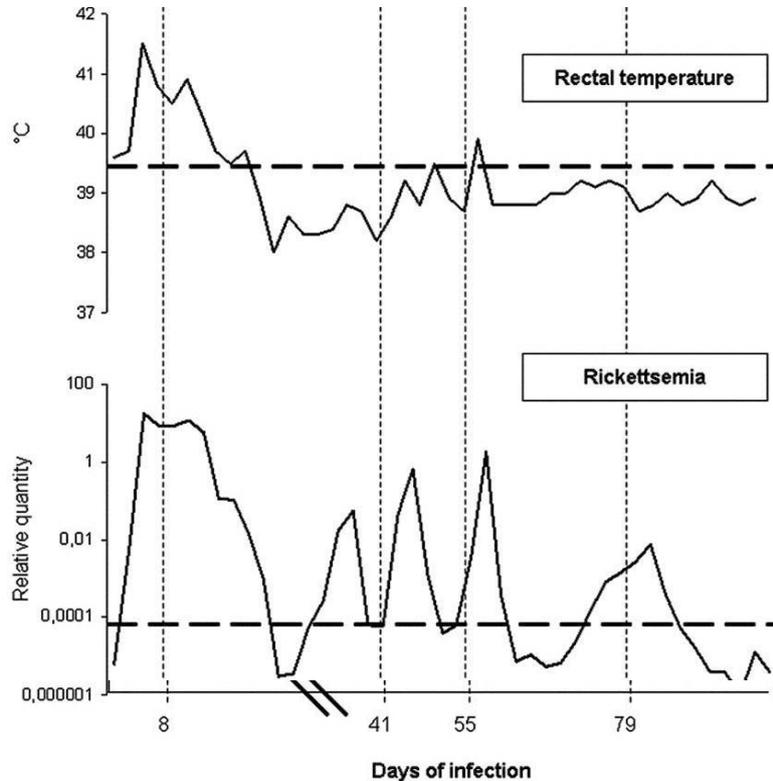


Figure 4 : Suivi longitudinal de la bactériémie et des manifestations cliniques (température) lors de l'infection expérimentale d'un mouton. Granquist et al, Infect Immun. Jan 2008 ; 76(1) : 120–126.

Le manque d'études expérimentales et de suivis longitudinaux des populations d'hôtes ne permettent pas de statuer sur l'implication des autres espèces de mammifères domestiques dans le cycle d'*A. phagocytophilum*. La plupart des hôtes domestiques sont considérés comme non réservoir car la bactérie est détectée dans le sang pendant de courtes périodes, mais, comme nous l'avons vu chez le mouton, ce raisonnement est discutable. En l'absence de mouton, et pour les souches n'infectant pas les moutons, les réservoirs principaux semblent se trouver parmi les espèces sauvages.

Chez les mammifères sauvages, les deux pistes les plus explorées sont les ongulés sauvages et les micromammifères, car ils sont à la fois des hôtes réservoirs pour d'autres bactéries transmises par les tiques, porteurs de beaucoup de tiques et proches des animaux domestiques. Nous savons par exemple, que le nombre d'*I. ricinus* et la prévalence d'*A. phagocytophilum*

chez les tiques sont corrélés à la présence de chevreuils, alors que le nombre d'*I. trianguliceps* dépend de la présence de rongeurs (Bown, Lambin et al. 2008; Rosef, Paulauskas et al. 2009).

Chez les ongulés sauvages, les chevreuils (*Capreolus capreolus*) et les cerfs (*Cervus elaphus*) présentent de fortes prévalences pour *A. phagocytophilum*, allant jusqu'à 90% (Stuen, Granquist et al. 2013). Ces deux espèces ont un fort potentiel comme hôte réservoir, mais elles semblent impliquées dans des cycles différents, car les souches portées par les cerfs sont plus proches de celles portées par les animaux domestiques que celles portées par les chevreuils. Les sangliers sont également porteurs de la bactérie avec des prévalences plus faibles (2- 12%) (Galindo, Ayllon et al. 2012; Michalik, Stanczak et al. 2012). Cependant, la présence de sangliers semble avoir un effet de dilution sur la prévalence *A. phagocytophilum* chez les cervidés. Cet effet serait expliqué par le fait que les sangliers éliminent la plupart des souches à l'exception de celles proches des souches humaines (Michalik, Stanczak et al. 2012) (Petrovec, Sixl et al. 2003). Les sangliers sont considérés comme des hôtes réservoirs peu probables, mais pourraient être impliqués dans la dispersion des souches potentiellement infectantes pour l'homme. Concernant les autres ongulés sauvages, tels que les chamois, isards, mouflons ou bisons, de fortes prévalences ont été détectées localement chez ces espèces, mais leurs répartitions géographiques très restreintes et leurs populations d'effectifs réduits en font des hôtes réservoirs peu probables pour les souches circulant chez les autres espèces (Silaghi, Hamel et al. 2011).

Chez les micromammifères, seule l'implication du campagnol agreste (*Microtus agrestis*) a été prouvée comme espèce réservoir d'*A. phagocytophilum* en Grande-Bretagne (Bown, Begon et al. 2006; Bown, Lambin et al. 2009). De nombreuses autres espèces de rongeurs sont infectées par la bactérie avec des prévalences très variables, comme le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*), le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*) ou le mulot à collier (*A. flavicolus*), mais leurs compétences en tant qu'hôte réservoir n'a pas été testée (Stuen, Granquist et al. 2013). Chez les insectivores, les fortes quantités de tiques et les prévalences allant de 20% à 25% de positifs chez les musaraignes communes (*Sorex araneus*) et les hérissons (*Erinaceus europaeus*) laissent penser que ces deux espèces sont fortement impliquées dans certains cycles (Bown, Lambin et al. 2011) (Silaghi, Skuballa et al. 2012).

Chez les espèces non mammifères, peu d'études ont été menées. Les oiseaux ont un rôle certain dans la dispersion des tiques et des bactéries. En Allemagne, 2,6% des *I. ricinus* récoltées au printemps sur les oiseaux étaient infectées par *A. phagocytophilum* (Hildebrandt,

Franke et al. 2010). Cependant très peu d'oiseaux ont été détectés positifs à *A. phagocytophilum* (De La Fuente, Naranjo et al. 2005). Le système immunitaire des oiseaux semble éliminer la bactérie (Paulauskas, Radzijeuskaja et al. 2009; Johnston, Tsao et al. 2013). Paradoxalement, les acariens *Dermoglyphus passerinus* qui parasitent exclusivement les oiseaux sont infectés par *A. phagocytophilum* (Skoracki, Michalik et al. 2006) et les expérimentations par xénodiagnose montrent que les tiques peuvent s'infecter sans que l'infection ne se déclare chez l'oiseau (Johnston, Tsao et al. 2013).

Enfin, aucune étude n'a été menée sur les reptiles en Europe. Aux Etats-Unis, des serpents et des lézards sont porteurs de la bactérie, mais les études par xénodiagnose montrent qu'ils ne sont pas compétents pour transmettre la bactérie aux tiques non infectées (Nieto, Foley et al. 2009).

Bilan

Les tiques du genre *Ixodes* sont considérées comme les vecteurs principaux de la bactérie en Europe du Nord, et de nombreuses espèces hôtes sont infectées par la bactérie mais leur implication dans les cycles, en tant qu'espèce réservoir ou sensible, reste indéterminée. Les études d'infections expérimentales et l'identification des souches d'*A. phagocytophilum* ont mis en évidence que plusieurs souches circulent et certaines sont spécifiques à leur(s) vecteur(s) ou à des espèces d'hôtes vertébrés. Pour mieux comprendre la contribution des espèces vertébrées et vectrices aux cycles épidémiologiques des différents variants d'*A. phagocytophilum*, des outils d'épidémiologie ont été développés.

3 Outils et méthodes d'identification des cycles épidémiologiques

3.1 Les outils disponibles

Pour déterminer les cycles épidémiologiques et la contribution des espèces de vecteurs et d'hôtes, de nombreux outils existent et plusieurs ont été testés sur *A. phagocytophilum* tel que la culture cellulaire, les infections expérimentales, la modélisation statistique ou mathématique, et les outils de biologie moléculaire.

Pour acquérir des connaissances sur les cycles bactériens, deux grandes approches sont possibles : l'étude expérimentale en environnement contrôlé ou l'étude à partir d'échantillonnage en milieu naturel.

Les études du développement et de la transmission de la bactérie en environnement contrôlé (ex : culture cellulaire, infection *in-vivo* contrôlée en laboratoire), permettent de mieux connaître le métabolisme de la bactérie, les interactions entre la bactérie et les cellules d'hôtes ou de tiques, et la sensibilité des hôtes aux différentes souches. Les infections expérimentales ont notamment mis en évidence que les différentes espèces d'hôtes ne présentent pas la même sensibilité selon les souches d'*A. phagocytophilum*. Par exemple, intra-espèce hôte, les différentes souches infectant les moutons induisent des symptômes différents (Stuen, Nevland et al. 2003). De même, inter-espèces hôtes, les bovins ne sont pas sensibles aux souches équine et humaine (Pusterla, Pusterla et al. 1999) et la souche Ap-V1 (identifiée chez le cerf de Virginie) n'infecte pas les souris contrairement à la souche humaine Ap-ha (Massung, Priestley et al. 2003). Les études expérimentales ont également montré que la bactérie circule dans différents tissus, tel que la rate, les poumons, le foie et les reins (Lepidi, Bunnell et al. 2000). De plus, elle persiste pendant plusieurs semaines chez les moutons dans certains organes comme la paroi intestinale et les ganglions lymphatiques, ou le thymus, la moelle osseuse, les reins et de la paroi de la vessie (Stuen, Casey et al. 2006). Un des principaux inconvénients de la culture *in vitro*, est sa difficulté de réalisation car *A. phagocytophilum* se développe dans les neutrophiles, or ces cellules ne survivent pas plus de 48 heures. La culture se fait donc sur des modèles cellulaires proches des neutrophiles, le plus souvent sur des cellules HL-60 (Goodmann, Nelson et al. 1996). Cependant le choix du modèle cellulaire peut biaiser la compréhension des mécanismes mis en jeu pour l'infection et la survie d'*A. phagocytophilum*, car il impacte le développement de la bactérie (Rennoll-Bankert, Sinclair et al. 2014). De plus, les infections expérimentales permettent de tester la capacité d'une espèce (vecteur ou hôte vertébré) à être infectée et à transmettre une souche, mais l'aspect quantitatif (taille de la population infectée), qui est un facteur important pour déterminer la capacité d'une espèce pour être réservoir, n'est pas pris en compte. Par exemple, la chèvre a expérimentalement les compétences pour être réservoir de la souche ap-V1 par xénodiagnose, mais la taille des populations et leurs répartitions mettent en doute la contribution de cette espèce à la propagation d'*A. phagocytophilum* (Massung, Mather et al. 2006).

Les études effectuées à partir de données récoltées en milieu naturel permettent d'évaluer la répartition des souches, celle des vecteurs et hôtes naturellement infectés à l'échelle de l'écosystème. Trois types d'études peuvent être réalisées à partir des données récoltées sur le terrain :

i) les études de prévalence, qui constituent la première étape pour identifier quantitativement dans quels vecteurs et quels hôtes la bactérie est présente. La compétence de réservoir du cerf de Virginie pour la souche Ap-V1 (et son incompétence pour Ap-ha) a été démontrée par la comparaison de la prévalence de ces deux souches chez les tiques et les cerfs (Massung, Courtney et al. 2005). Néanmoins, ces études nécessitent d'être couplées avec un typage pour tirer des informations pertinentes sur les cycles.

ii) la modélisation mathématique, qui permet de comprendre et prédire la circulation des souches à partir des données de prévalence, de typage des souches, et des données environnementales. Par exemple, en comparant une modélisation de la distribution des tiques à l'aide de variables environnementales et la distribution de génotypes bactériens chez des hôtes géolocalisés, un lien potentiel entre conditions environnementales, distribution des tiques et circulation de génotypes d'*Anaplasma sp.* a été proposé en Sicile (Torina, Alongi et al. 2008). Ces études nécessitent cependant une bonne connaissance des différents facteurs pour calibrer correctement les modèles.

iii) les outils moléculaires permettent quant à eux de typer les souches et comprendre les relations de parenté entre souches. Plusieurs outils existent :

- la PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) permet de discriminer des souches bactériennes par la taille des fragments d'ADN amplifiés. Cette technique, très peu précise, a été principalement utilisée pour discriminer *A. phagocytophilum* des autres espèces d'*Anaplasma* (Oporto, Gil et al. 2003; Alberti and Sparagano 2006), ou pour étudier des variations sur le gène *msp2/p44* (Barbet, Meeus et al. 2003), et plus rarement pour identifier des souches (Alberti, Zobba et al. 2005).
- la PFGE (électrophorèse par champ pulsé) qui permet de comparer des molécules d'ADN de grandes tailles, a été utilisé par Dumler et al. (Dumler, Asanovich et al. 2003) pour comparer 7 génomes d'*A. phagocytophilum*. Cette technique a été abandonnée car elle s'est révélée peu informative.

Les techniques de séquençage ADN, décrites ci-dessous sont beaucoup plus informatives car elles permettent de retracer les relations phylogénétiques.

- le séquençage total de souche (WGS), a été effectué actuellement sur 4 souches d'*A. phagocytophilum*, et a permis de comparer la structure du génome avec les autres *ehrlichia* et d'identifier les gènes d'intérêts pour l'étude des mécanismes d'infection et la caractérisation de la bactérie. Cette technique est coûteuse et nécessite la mise en culture des souches après isolement. Elle est délaissée au profit de séquençages partiels du génome.
- la MLVA (Multi locus VNTR analysis) est une technique très discriminante qui permet de tracer la dispersion d'une souche à petite échelle, à partir de l'analyse de motifs ADN répétés. Le premier schéma de MLVA développé sur des loci intergéniques s'est révélé trop discriminant et ne permettait pas de caractériser la dispersion des souches d'*A. phagocytophilum* (Bown, Lambin et al. 2007). Le nouveau schéma développé par Dugat et al (2014) sur des régions intragéniques a permis de tracer l'évolution des souches dans les troupeaux de bovins.
- le séquençage de loci d'intérêt a mis en évidence une forte diversité de souches chez les tiques à partir des gènes *16S*, *groESL*, *ankA* (von Loewenich, Baumgarten et al. 2003). Il a également permis de délimiter des groupes de génotypes circulant dans un même écosystème (Shukla, Aswani et al. 2007; Bown, Lambin et al. 2009), et d'identifier de nouveaux génotypes, comme un groupe sur le gène *ankA* qui infecte exclusivement les rongeurs (Majazki, Wuppenhorst et al. 2013) et une souche asiatique sur la base de l'*ARNr 16S* (Zhan, Cao et al. 2008). Cependant les études basées sur un ou deux loci présentent des incohérences entre loci et un manque de robustesse des phylogénies issues de chaque loci.
- le typage ou l'analyse multilocus (MLST/MLSA) permettent de discriminer des souches sur la base des informations provenant de plusieurs loci. La MLST permet de caractériser les souches par leurs profils alléliques, alors que la MLSA prend en compte la distance génétique entre génotypes et permet de reconstruire une phylogénie plus robuste que celles établies sur la base d'un seul locus. La première MLSA développée en 2014 (Huhn, Winter et al. 2014) met en évidence 3 trois groupes de

génotypes associés à des espèces d'hôtes différents suggérant, l'existence de différents cycles.

Bilan

La MLSA est l'outil le plus approprié pour caractériser de façon robuste la diversité des génotypes d'*A. phagocytophilum* circulant chez les mammifères et les vecteurs infectés. Le choix des loci utilisés pour composer le schéma de la MLSA doit être représentatif de la diversité moyenne observée sur tout le génome. Les études centrées sur un ou deux loci ne permettent pas de construire des phylogénies robustes mais elles ont apporté des connaissances indispensables pour la composition du schéma de la MLSA.

3.2 Les loci séquencés

Le premier locus séquencé pour *A. phagocytophilum* est l'*ARNr 16S* (Engvall, Pettersson et al. 1996). Ce locus très conservé, est traditionnellement utilisé pour la détection de variants génétiques chez les bactéries. A partir d'un fragment de 11 nucléotides présent à l'extrémité 5' du gène, 15 variants ont été identifiés chez *A. phagocytophilum* en 2002 (Massung, Mauel et al. 2002). Les 2/3 des séquences disponibles sur Genbank appartiennent aux variants 1 à 3. Les variants 1 et 2 semblent ubiquistes, alors que le variant 3 (auquel appartient la souche Ap-V1) infecte seulement les ruminants, et d'autres variants (4, 7, 8) ne sont présents qu'en Europe (Rar and Golovljova 2011). Les séquences de l'*ARNr 16S* permettent de caractériser de grands groupes de génotypes mais elles restent trop conservées pour discriminer efficacement les écotypes (Bown, Lambin et al. 2009).

Le deuxième locus le plus séquencé après l'*ARNr 16S* est *groESL*. Ce marqueur permet de discriminer plus de 50 variants qui se répartissent en 3 grands groupes (Rar and Golovljova 2011). Les phylogénies basées sur le locus *groESL* présentent une structuration continentale.

Le gène *ankA*, beaucoup plus variable, permet de discriminer les souches en 5 groupes phylogénétiques, qui semblent présenter une répartition hôte spécifique avec deux clusters associés aux ruminants, deux aux cervidés et un aux rongeurs. Les informations recueillies sur les loci *ankA* et *groESL* concordent sur 3 points. Les souches provenant des Etats-Unis sont distantes des souches provenant des autres continents. Les souches associées aux chevreuils diffèrent de celles associées aux autres hôtes. Et les clusters 1&2 identifiés sur la phylogénie de *groESL* sont similaires à ceux décrits sur *ankA* (Rar and Golovljova 2011).

Le gène *gltA* codant la synthèse des citrates est plus rarement utilisé. Les relations phylogénétiques basées sur ce gène sont similaires à celles identifiées pour le gène *ankA* pour les chiens américains (Shukla, Aswani et al. 2007). De plus, l'analyse de ce gène *gltA* a permis de confirmer la proximité entre les souches d'*A. phagocytophilum* du Nord de la Chine et de la Russie déjà observée avec le gène *groESL* (Zhan, Cao et al. 2008; Zhan, Cao et al. 2010).

Enfin, les derniers marqueurs étudiés pour caractériser *A. phagocytophilum* sont les gènes codant les protéines de surface *msh2/p44* et *msh4*. Les protéines de surface *msh2/p44* sont codées par une centaine de gènes homologues. Ils sont caractérisés par des séquences ADN conservées aux extrémités 3' et 5' mais très variables en leur milieu. La variation des *p44* serait le reflet d'une adaptation rapide aux défenses immunitaires des vecteurs et des hôtes vertébrés. Ces gènes sont donc considérés comme de bons marqueurs pour tracer les adaptations (Casey, Birtles et al. 2004), mais leurs évolutions rapides rendent difficiles les études phylogénétiques. Le gène *msh4* est beaucoup plus adapté aux études phylogénétiques, car il évolue plus lentement (De La Fuente, Massung et al. 2005; Ladbury, Stuenkel et al. 2008). La fonction de ce gène n'est pas connue mais il s'est révélé être un bon marqueur pour l'étude phylogéographique d'*A. marginale* (De La Fuente, Van Den Bussche et al. 2002).

Bilan

Les études gène par gène tendent à indiquer l'existence d'une grande diversité de souches mais ne sont pas assez précises pour comprendre les cycles. Les phylogénies basées sur *ankA*, *groESL*, *gltA* présentent des groupements phylogénétiques assez similaires, mais très différents des loci codant les protéines de surface. Pour mieux comprendre les cycles d'*A. phagocytophilum*, il serait nécessaire de développer un schéma de caractérisation par MLSA permettant d'agréger l'information obtenue pour plusieurs gènes et de la synthétiser.

4 Conclusion de la synthèse bibliographique

Une diversité de souches d'*A. phagocytophilum* ayant des cycles différents semble coexister dans la nature. La contribution des différents hôtes et des vecteurs infectés par la bactérie reste à déterminer pour chacun des cycles. Bien qu'*A. phagocytophilum* provoque de fortes pertes économiques dans les élevages bovins et ovins en Europe, nous avons peu d'information sur la diversité des souches qui circulent dans ces populations. Des outils ont

été mis en place pour caractériser les différents variants bactériens, mais les informations qu'ils apportent sont encore trop peu résolutive. L'analyse multi-locus semble la méthode la plus adaptée pour comprendre comment se structure la diversité d'*A. phagocytophilum* et pour caractériser au mieux les cycles car elle permet de synthétiser l'information obtenue à partir de l'analyse de plusieurs gènes.

Dans le chapitre suivant, nous présentons les résultats obtenus grâce au développement d'un schéma de MLSA visant à améliorer la caractérisation génétique d'*A. phagocytophilum*. Cette technique nous a permis d'identifier les espèces d'hôtes qui participent au même cycle épidémiologique et les hôtes réservoirs potentiel pour chaque cycle.

CHAPITRE 2 :

DIVERSITE DES SOUCHES CHEZ LES ANIMAUX

CLINIQUEMENT ATTEINTS PAR

***A. PHAGOCYTOPHILUM* A L'ECHELLE DE LA**

FRANCE

Chapitre 2 : Diversité des souches chez les animaux cliniquement atteints par *A. phagocytophilum* à l'échelle de la France

Nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* chez les animaux domestiques cliniquement atteints. Cette catégorie d'animaux nous intéresse particulièrement car les symptômes provoqués par *A. phagocytophilum* provoquent d'importantes pertes dans les élevages et la proximité des animaux domestiques avec l'homme augmente le risque zoonotique. Pour prévenir et contrôler la propagation de la bactérie, une meilleure connaissance des variants génétiques qui sont pathogènes pour les animaux domestiques est nécessaire.

Actuellement, l'incidence de l'infection par *A. phagocytophilum* chez les animaux domestiques n'est pas estimable, car la variabilité et l'aspécificité des symptômes provoqués par la bactérie rendent la maladie difficile à diagnostiquer. Bien que des cas d'anaplasmose granulocytaire aient été diagnostiqués sur tout le territoire français chez les animaux domestiques, la prévalence de la bactérie est souvent sous-estimée et la répartition spatiale des zones d'endémie n'est pas connue. Par ailleurs, la bactérie n'est détectable par PCR chez les animaux malades que pendant les 15 à 20 jours post infection. La méconnaissance des zones géographiques et des périodes à risque rend donc délicate la mise en œuvre d'un échantillonnage aléatoire simple. Pour mener à bien notre étude, nous avons donc développé un réseau de collaborations pour collecter des échantillons d'animaux domestiques présentant des signes cliniques d'anaplasmose granulocytaire et sur lesquels la bactérie a pu être caractérisée. Les géotypes identifiés chez les animaux domestiques ont ensuite été comparés avec ceux portés par des chevreuils, mammifère considéré comme le principal réservoir d'*A. phagocytophilum*. Ce travail a fait l'objet d'une publication en révision dans « Veterinary Research » (annexe 1).

1 Matériels et méthodes

1.1 Echantillonnage des cas cliniques

Sachant qu'une partie des cas suspects d'anaplasmose granulocytaire diagnostiqués par les vétérinaires sont envoyés à des laboratoires d'analyses certifiés, nous avons choisi de recruter les échantillons auprès de ces laboratoires. Nous avons donc développé un réseau de

collaboration avec les vétérinaires et les laboratoires d'analyses pour collecter des prélèvements provenant d'animaux infectés par *A. phagocytophilum* sur l'ensemble du territoire métropolitain.

L'échantillonnage a ciblé trois espèces : les bovins, les chevaux et les chiens. Au total 235 échantillons ont été collectés. La présence d'ADN bactérien a été confirmée et des séquençages ont été effectués sur les prélèvements provenant de 104 bovins, 13 chevaux, 3 chiens (voir annexe 2).

Les échantillons de chevaux provenaient majoritairement d'Ile de France, du Rhône et de Saône-et-Loire, ceux de chiens provenaient du Rhône et de Saône-et-Loire, alors que les bovins étaient répartis sur toute la France.

1.2 Echantillonnage des chevreuils

En parallèle à l'échantillonnage des animaux domestiques, nous avons collecté auprès de nos collaborateurs, huit extraits d'ADN de chevreuils positifs à *A. phagocytophilum* abattus lors des plans de chasse de l'hiver 2011-2012. Trois de ces échantillons provenaient de Côte d'Armor et cinq de Franche-Comté. En plus de ces échantillons, nous avons obtenu 24 échantillons de sang de chevreuils positifs sur le site des Vallons de Gascogne et 8 échantillons de chevreuils positifs de l'élevage de Gardouch (Haute-Garonne). Ces deux sites sont des suites suivis par l'INRA de Toulouse et proviennent de chevreuils capturés en 2011-2012.

1.3 Préparation des échantillons avant l'amplification pour le séquençage

1.3.1 Extraction de l'ADN

L'ADN contenu dans le sang des animaux malades et des chevreuils a été extrait à l'aide du kit Nucleospin Blood QuickPure (Macherey-Nagel, Düren, Germany) selon les recommandations du fournisseur. L'extraction a été faite à partir de 200 µl de sang sur EDTA.

1.3.2 Détection d'*A. phagocytophilum*

La présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* dans les échantillons a été contrôlée par une détection par PCR en temps réel selon le protocole de Courtney 2004. Ce protocole utilise la méthode Taqman pour cibler les gènes *msp2/p44* présents en plus de 120 copies dans le

génomique d'*A. phagocytophilum*, cette PCR est donc très sensible. Nous avons utilisé 5 µl d'ADN, 10 µl de SsoFast Supermix (Biorad, Hercules, California), 2 µl de chaque primer ApMSP2f et ApMSP2r à 10 µM et 0,5 µL de sondes Taqman ApMSP2p-HEX à 10 µM dans un volume réactionnel total de 20 µl). Nous avons fait le choix de ne pas diluer les extraits d'ADN pour équilibrer les concentrations avant la détection, pour ne pas diluer la concentration d'ADN bactérien qui est très variable selon les échantillons.

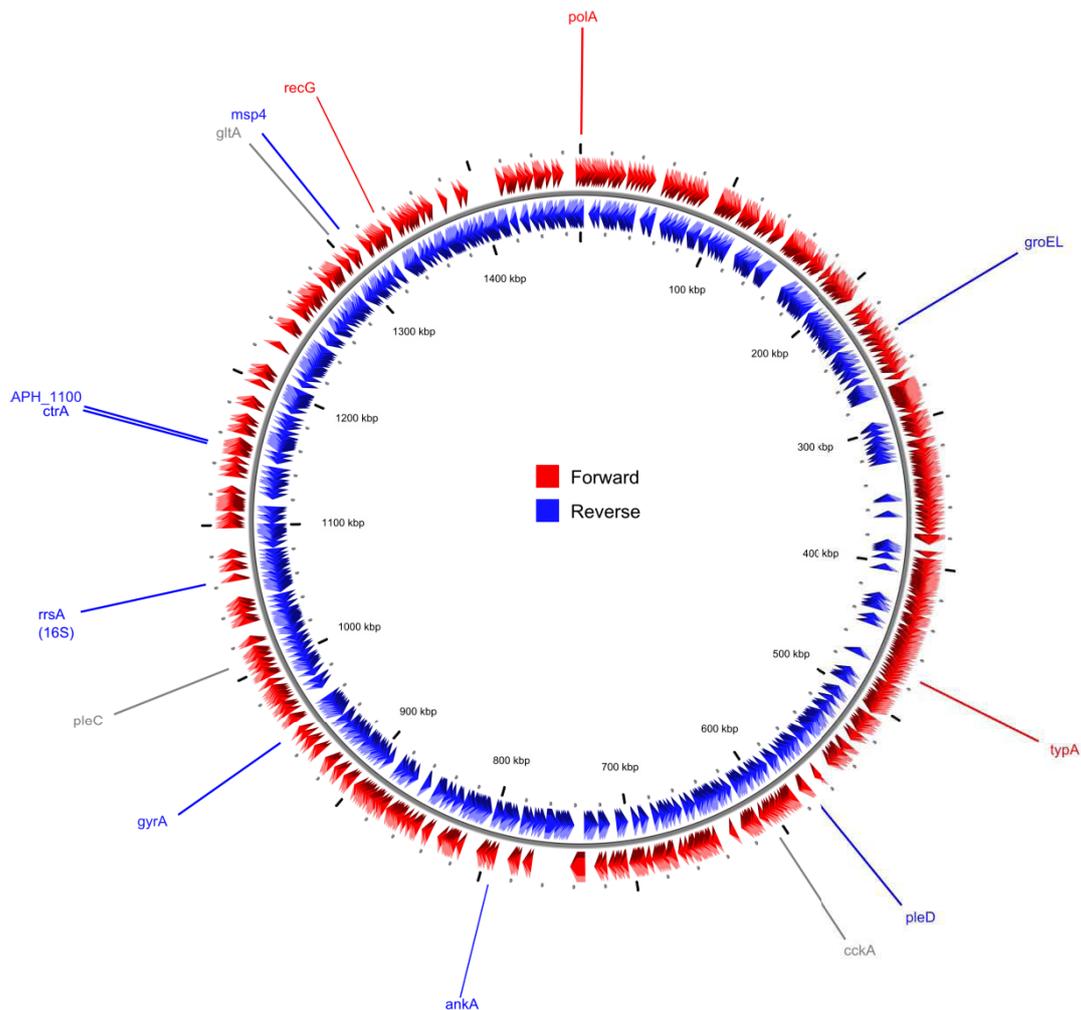
1.3.3 Mise au point de la caractérisation d'*A. phagocytophilum*

- MLSA & choix des gènes

Comme présenté dans le chapitre 1, le typage des souches par MLSA est de plus en plus utilisé pour caractériser *A. phagocytophilum*. Cependant les études sont restreintes à quelques gènes qui ont chacun leurs limites (*16S*, *AnkA*, *groESL*, *msp4*, *p44*) (Morissette, Massung et al. 2009; Silaghi, Liebisch et al. 2011; Rejmanek, Bradburd et al. 2012). Le gène *16S* est très peu variable, il ne permet pas de différencier correctement les souches. Le gène *ankA* semble spécifique à l'hôte (Scharf, Schauer et al. 2011), il est donc porteur d'une information importante pour la compréhension du cycle épidémiologique, mais les phylogénies basées sur ce gène présentent des distances génétiques trop fortes sur les branches internes et une résolution intra-groupe trop faible pour comprendre les relations phylogénétiques entre les souches étudiées. Les gènes *msp4* et *p44*, codant des protéines de surface, sont de bons marqueurs de diversité car ils sont très polymorphes, mais ils sont porteurs d'éléments recombinés limitant les études phylogénétiques. En dehors des gènes *msp4*, *ankA* et *groESL*, très peu de données de séquençage sont disponibles sur GenBank. Quelques données concernant le gène *gltA* sont disponibles, mais nous n'avons pas souhaité le conserver dans le schéma de notre MLSA car les phénomènes de sélection et de recombinaison pouvaient être dépendants de sa proximité avec le gène *msp4*. Il a donc été nécessaire de développer d'autres marqueurs.

En 2011, une seule souche isolée chez un homme américain était séquencée complètement, la souche *A. phagocytophilum* HZ (GenBank : NC_007797.1). De ce fait, il était difficile de choisir efficacement les loci d'intérêt (marqueurs d'hôte, indicateurs de structure géographique ou marqueurs neutres). Pour pallier à cette difficulté, nous avons choisi des

régions du génome où l'ordre des gènes était conservé, des gènes présentant de faibles divergences avec *Anaplasma marginale* St Marie et St Florida (GenBank : NC_004842.2 et NC_012026.1) et *Anaplasma centrale* strain Israel (GenBank : NC_013532.1), et répartis tout le long du génome. Finalement, six nouveaux loci ont été choisis pour compléter notre MLSA : *typA*, *polA*, *gyrA*, *recG*, *pleD* et un inter-gène compris entre les loci *ctrA* et *APH_1100* (Figure 5). Les quatre premiers loci sont des gènes de ménage codant respectivement une protéine de liaison du GTP, l'ADN polymérase, l'ADN topoisomérase et l'ADN hélicase. Les gènes *pleD* et *ctrA* sont des régulateurs de réponse des gènes *pleC* et *cckA* impliquée dans le système à deux-composantes permettant à la bactérie de s'adapter aux conditions environnementales (« Two-Component System »).



Anaplasma phagocytophilum HZ, complete genome - 1..1471282

Figure 5 : Répartition des loci choisis pour la caractérisation d'*A. phagocytophilum* par MLSA. Les loci identifiés dans le sens forward sont inscrit en rouge, ceux en sens reverse sont en bleu. En gris sont indiqués les loci régulés par certains des loci sélectionnés pour la MLST (*pleC* régulé par *pleD*, et *cckA* régulé par *ctrA*)

- Conception des amorces de PCR

Pour l'amplification de chaque locus, nous avons choisi de développer plusieurs couples d'amorces. Dans un premier temps, nous avons dessiné des amorces permettant d'amplifier un fragment de 1000 à 1500 pb pour constituer une base de données permettant de repérer sur les séquences où se situent les zones conservées et celles présentant le plus de polymorphisme (portant le plus d'intérêt pour la caractérisation d'*A. phagocytophilum*). Chaque couple d'amorces a été dessiné à l'aide du logiciel Primer-BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>] (Ye, Coulouris et al. 2012). Ce logiciel utilise Primer3 pour concevoir des amorces PCR, puis utilise BLAST et un algorithme d'alignement global pour tester l'ensemble des amorces sur la base de données sélectionnée par l'utilisateur afin d'éviter les paires d'amorces qui peuvent provoquer des amplifications non spécifiques. Nous avons pu ainsi construire des couples d'amorces spécifiques à *A. phagocytophilum* en éliminant toutes les amorces susceptibles d'amplifier des fragments d'ADN des hôtes (grâce aux bases de données disponibles sur genbank) et spécifiques aux loci choisis en se basant sur le génome d'*A. phagocytophilum* HZ.

Les couples d'amorces ont d'abord été testés au laboratoire sur des extraits d'ADN des souches américaines Webster, HGE1 et CRT (mises à disposition par des collaborateurs) pour sélectionner les amorces avec le meilleur rendement et optimiser les cycles de PCR. Ensuite les amorces ont été testées sur un premier lot de nos échantillons. Les premiers résultats de séquençage ont mis en évidence une forte diversité génétique sur les loci ciblés. Les amorces construites étaient probablement trop spécifiques à la souche de référence HZ utilisée pour la conception et nous avons rencontré des difficultés à amplifier certains loci y compris sur des individus présentant une forte bactériémie (ou quantité d'ADN bactérien). Il a donc été nécessaire de dessiner de nouvelles amorces. Nous avons alors testé deux stratégies. Tout d'abord nous avons dessiné des amorces dégénérées en se basant sur les séquences protéiques. Une amorce dégénérée est un mélange d'amorces, de séquences similaires mais présentant des variations à une ou plusieurs positions. Une séquence protéique consensus a été établie pour chacun de nos loci d'intérêt à partir de l'alignement des génomes d'*A. phagocytophilum*, *A. marginale* et *A. centrale*. Puis nous avons calculé un score en mesurant le nombre de codons possibles sur une fenêtre glissante de 8 acides aminés à l'aide de commandes rédigées en langage de programmation Pascal. Ce score nous a permis d'identifier les zones les plus conservées dans lesquelles nous avons dessiné des amorces dégénérées (Figure 6).

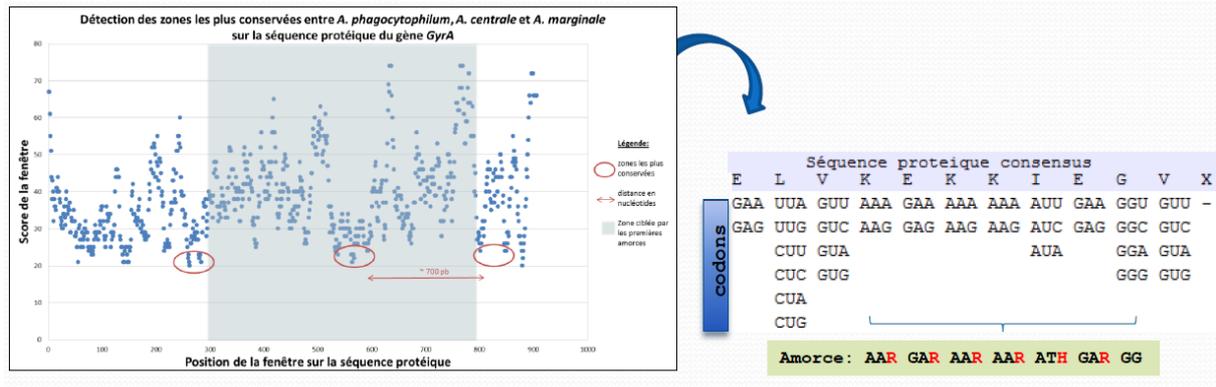


Figure 6 : construction d'amorces dégénérées à partir d'une séquence protéique

L'approche par l'utilisation d'amorces dégénérées permet d'amplifier potentiellement une plus grande diversité de séquences. Cependant les PCR menées au laboratoire avec ces amorces présentaient une efficacité d'amplification très faible par rapport aux PCR réalisées avec les amorces classiques, et amplifiaient beaucoup de fragments aspécifiques. Nous avons donc opté pour la seconde stratégie qui consistait à dessiner de nouvelles amorces à partir de l'alignement des séquences de notre base de données pour amplifier un fragment plus court de 500 à 800 pb.

- Optimisation des rendements de PCR

Pour l'amplification des loci choisis, nous avons procédé par PCR nichées. Malgré l'utilisation de PCR nichées qui permet d'augmenter considérablement la quantité d'ADN amplifiée, les rendements des PCR à partir des extraits d'ADN bruts n'étaient pas suffisants pour réaliser un séquençage en SANGER. Nous avons supposé que le faible rendement des PCR était dû à la faible quantité d'ADN d'*A. phagocytophilum* contenu dans nos extraits. Face à ce problème nous avons envisagé et testé trois solutions :

i) concentrer l'ADN bactérien contenu dans les 200 µl d'échantillon avant l'extraction. *A. phagocytophilum* étant une bactérie intracellulaire obligatoire infectant les neutrophiles, nous avons concentré et récupéré les globules blancs par précipitation du sang dans une solution de Percoll à 50%. Les mesures effectuées avec l'hématomètre montrent que cette technique permet de séparer et de concentrer efficacement les globules blancs contenus dans le sang total avant l'extraction de l'ADN. Mais la comparaison par qPCR de la quantité d'ADN bactérien contenu dans les extraits de sang total et de globules blancs isolés, a révélé que dans $\frac{3}{4}$ des cas la quantité d'ADN bactérien était diminuée voire complètement nulle. Cette technique n'a donc pas été retenue.

ii) éliminer l'ADN non bactérien contenu dans les extraits d'ADN avant d'effectuer les PCR. Pour augmenter la quantité d'ADN bactérien dans l'échantillon et éliminer les ADN non cibles, nous avons testé la capture d'ADN par l'utilisation de billes magnétiques (Dynabeads M280 streptavidin). Le principe de cette technique est d'hybrider les fragments d'ADN cible avec une sonde biotinée, puis de capter le complexe sonde/ADN à l'aide d'une bille magnétique streptavidinée (Figure 7). L'ADN non cible est alors éliminé par des lavages sur un support aimanté. Les mises au point effectuées n'ont pas permis d'améliorer l'amplification des gènes cibles. Cette technique nécessite encore beaucoup de mise au point et présente un coût élevé, c'est pourquoi nous avons choisi de ne pas continuer dans cette voie.

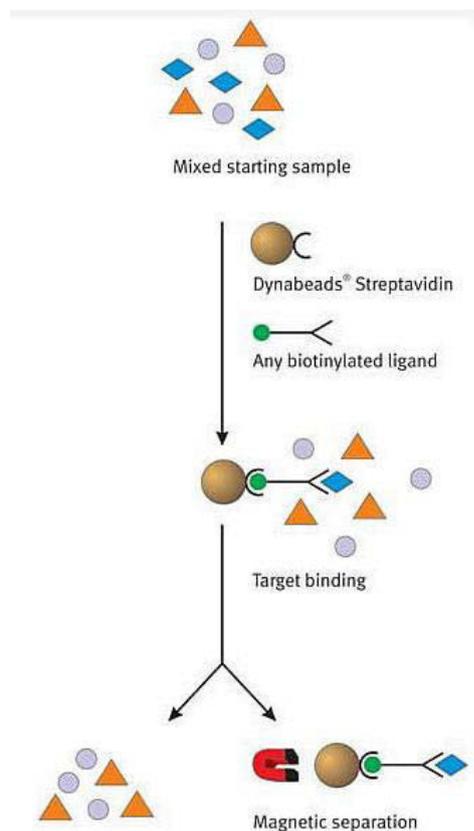


Figure 7 : Principe de la capture d'ADN par l'utilisation de billes magnétiques (extrait de la brochure du fabricant (Invitrogen™), <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11205D>)

iii) augmenter la quantité d'ADN total contenu dans les extraits avant les PCR par une amplification multiple par déplacement (MDA) (Dark, Lundgren et al. 2012). Cette technique permet d'amplifier facilement et rapidement (en moins de 2h) l'ADN total

contenu dans un échantillon (ADN de l'hôte et ADN bactérien), à l'aide d'amorces aléatoires. Nous avons testé le kit Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) en respectant les recommandations du fournisseur. Les résultats démontrent une amélioration entre l'amplification de nos loci sans MDA et après MDA. Cette solution a donc été validée pour solutionner au moins en partie le problème de la faible bactériémie dans la suite de notre étude.

- Amplification des loci

Avant l'amplification des loci d'intérêt par PCR nichées, nous avons donc au préalable pré-amplifié les échantillons par MDA avec le kit Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification. Les 20 µl de solution d'ADN obtenus ont été dilués dans 80 µl d'eau purifiée.

A partir de 5µl de cette solution d'ADN pré-amplifié, nous avons amplifié chaque loci par PCR niché dans un volume de réaction de 50µl en utilisant 4 µl de chaque amorce (Tableau1), 4 µl de dNTP à 25 mM, 10 µl de Q solution (Qiagen), 2µl de MgCl₂ à 25 mM et 2 unités de Taq polymerase (Qiagen, Venlo, Netherlands). Le programme utilisé pour l'ensemble des PCR est présenté Figure 8.

La PCR nichée a été effectuée avec 5 µl de produit de première PCR dans un volume total de 50 µl avec le même mélange et dans les mêmes conditions de cycle que pour l'amplification primaire. Seul le loci *pleD* a été amplifié par PCR simple car nous n'avons pas réussi à développer des amorces internes efficaces.

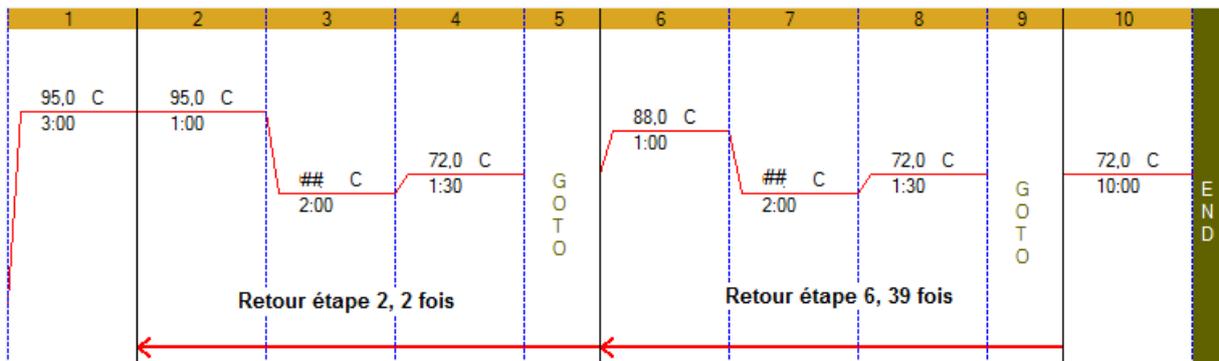


Figure 8 : Cycles des PCR nichées. ## température d'hybridation spécifiques aux amorces (cf table 1 ci-dessous)

Tableau 1 : Informations concernant les amorces utilisées pour les PCR nichées

Locus	Amorce	Séquence en 3'→ 5'	Température d'hybridation
ankA externe	Fi_ankA Ri_ankA	ATRTTACGCTGTRRTRGCAT CATCTRCHGGTGTTYTTCCTC	58 °C
ankA interne	Fe_ankA Re2_ankA	TATGCGRTTCGTGAAGCA TTAAAAAGCATYTTTCTGWAAC	58 °C
msp4 externe	msp4_Fb1 msp4_Rb1	ATAATGATGCGTCTGATGTTAGCG CCTTTCCTCTATAAGCCAACCTT	59 °C
msp4 interne	msp4_Fb1 msp4_Rb2	ATAATGATGCGTCTGATGTTAGCG CAGGCAAGTCAGTATGCATAAC	59 °C
<i>groEL</i> externe *	HS1a HS6a	AZTGGGCTGGTAZTGAAT CCZCCZGGZACZAZACCTTC	48 °C
<i>groEL</i> interne *	HS43 HSVR	ATWGCWAARGAAGCATAGTC CTCAACAGCAGCTCTAGTAGC	48 °C
polA externe	F1_pola_deg R3_pola_deg	GCAGATTAYTCVCARATGGARC GCVGTACCYTGKATTGGWG	57 °C
polA interne	F1_pola_deg R4_pola_deg	GCAGATTAYTCVCARATGGARC GTACCYTGKATTGGWGCRTT	57 °C
typA externe	E2_typA_F E2_typA_R	CCTGGACATGCTGACTTCGG CGGCGGAACCTAACCTCACAG	66 °C
typA interne	F-typA R-typA	TGCCTCTGAGGGCCCTATGCC AGCCCTTCCAGCCCTGCAAC	69 °C
recG externe	recG_degF1 recG_degR2	CGRCTTG TAGTYATAGATG TCRATGACAATKATSGTWGC	57 °C
recG interne	recG_degF2 recG_degR2	GATGARCARCARMGSTTYGG TCRATGACAATKATSGTWGC	57 °C
pleD externe **	E2_pleD_R R_pleD	ACAAGTGGCCCTGAAGCAAT TGCGTCGTAGCCTGTCTGCA	66 °C
gyrA externe	Fint-gyrA Rext-gyrA	GATAGTCAGGGAACTTCGG GGCATGACACTAGTAATGGTC	61 °C
gyrA interne	Fint-gyrA Rint-gyrA	GATAGTCAGGGAACTTCGG CATGTACGCTCCCTAAGCG	64 °C
CtrA-APH_1100 externe	E1_aph1099-1100_F E1_aph1099-1100_R	ACAGTGCCCAACCTAGACGA TGGAAGAACACGGTGGTTGC	64 °C
CtrA-APH_1100 interne	f_aph1099-1100 r_aph1099-1100	GTTGCACATCCTGCTGGGGTGT GCCCCTCTGCAGACAAAGAAGC	69 °C

* développé par Lotrič-Furlan, Petrovec et al. (1998)

** PCR simple pour pleD

- Séquençage

Le séquençage a été réalisé par la méthode SANGER par une entreprise extérieure (Beckman Coulter Genomic, Essex, UK).

2 Analyses : méthodes phylogénétiques et statistiques

2.1 Phylogénie

- Alignement des séquences

Lorsque l'amplification par PCR a été suffisante avec les amorces externes, le fragment le plus long a été séquencé. Le séquençage a été effectué sur les deux brins de fragments d'ADN de plus de 1000 pb. Chaque séquence a été vérifiée manuellement dans ChromasLite version 2.1 et le code de l'IUPAC a été utilisé pour indiquer les sites ambigus. Les séquences d'ADN ont été alignées avec l'algorithme 'Clustal Omega' sous Seaview version 4. Les séquences analysées dans cette étude sont disponibles dans GenBank avec les numéros d'accès KJ832158-KJ833031.

- Construction des phylogénies gène par gène

Pour chaque locus, une première matrice de distance entre paires de séquences a été construite à partir des alignements, avec un algorithme implémenté dans bio++ intégrant les paramètres du meilleur modèle d'évolution choisi avec le critère d'Akaike (AIC) calculé avec la fonction phymtest (package 'ape') sous R 2.15.1. A partir de cette matrice de distance de l'ADN, un arbre phylogénétique a été construit pour chaque loci avec l'algorithme BioNJ (package 'ape').

2.2 Analyse multi-locus

- Construction du super-arbre

Pour chaque locus de la MLSA (sauf *ankA*), les échantillons séquencés sur au moins 5 des 8 loci ont été sélectionnés pour construire un arbre de consensus, ou super-arbre. Le meilleur modèle d'évolution de séquences a été sélectionné pour chaque locus avec l'AIC. Ensuite, les alignements ont été concaténés dans un alignement unique. A partir de l'alignement concaténé, un super-arbre a été construit avec le logiciel MrBayes 3.2 en utilisant une méthode de construction bayésienne, qui a été développée pour mettre en évidence les informations fournies par les différents marqueurs tout en optimisant une structure arborescente (Crisuolo, Berry et al. 2006). Cette méthode est robuste même si plus de 50% des données sont manquantes (Philippe, Snell et al. 2004).

Dans MrBayes les données ont été segmentées en 8 partitions correspondant chacune à un locus, et le meilleur modèle d'évolution a été appliqué sur chaque partition. Trois séries de 500 000 itérations ont été effectuées en utilisant six chaînes de Markov dans le cadre d'une approche de Monte Carlo en parallèle (MCMCMC). Au cours de chaque itération, la valeur des paramètres est réévaluée pour vérifier si la vraisemblance du modèle total est améliorée. Les arbres ont été échantillonnés à partir de la chaîne principale toutes les 500 générations. Vingt-cinq pourcent des premiers arbres ont été retirés de l'échantillonnage, car nous supposons que la convergence des chaînes n'a pas encore été atteinte. Puis, nous avons conservé les 25 % d'arbres ayant les probabilités *a posteriori* les plus élevées parmi les trois séries générées pour construire le super-arbre. La robustesse des relations phylogénétiques entre les génotypes a été évaluée à l'aide de la probabilité bayésienne *a posteriori* de chaque branche.

- Analyse des phylogénies

La présence de groupes dans l'arborescence du superarbre a été testée par une méthode de *clustering* hiérarchique avec la fonction de *hclust* sous R. Le nombre de clusters a été déterminé par la méthode des moindres carrés et confirmé par les fonctions *pamk* et *kmeans* 'fpc'. Chaque échantillon présent dans l'arbre de consensus a été affecté à un cluster.

3 Résultats et discussion

3.1 Présence de 3 groupes génétiques d'*A. phagocytophilum* chez les bovins cliniquement malades en France

Malgré les données manquantes et les incongruences entre les phylogénies construites à partir d'un seul gène, le super-arbre présente une phylogénie relativement robuste. L'analyse du super-arbre met en évidence trois groupes de génotypes dans les échantillons de cas cliniques de bovins (Figure 9). Le cluster A contient des génotypes d'*A. phagocytophilum* échantillonnés sur des chevreuils et des bovins, le cluster B contient seulement des génotypes associés aux bovins et le cluster C contient des génotypes associés aux bovins, chevaux et chiens. Cette répartition est cohérente avec les clusters identifiés dans l'arbre phylogénétique d'*ankA* (Figure 9). Sur la phylogénie d'*ankA*, nous retrouvons dans notre échantillonnage des génotypes appartenant aux quatre clusters décrits dans la littérature (Scharf, Schauer et al.

2011). Comme attendu, les génotypes portés par les chevreuils sont regroupés dans les clusters II et III d'*ankA*, et les génotypes issus d'animaux domestiques se retrouvent dans les clusters I et IV. Nous avons cependant identifié deux génotypes de bovins dans le cluster II d'*ankA* qui était décrit jusqu'à présent comme exclusivement lié aux cervidés.

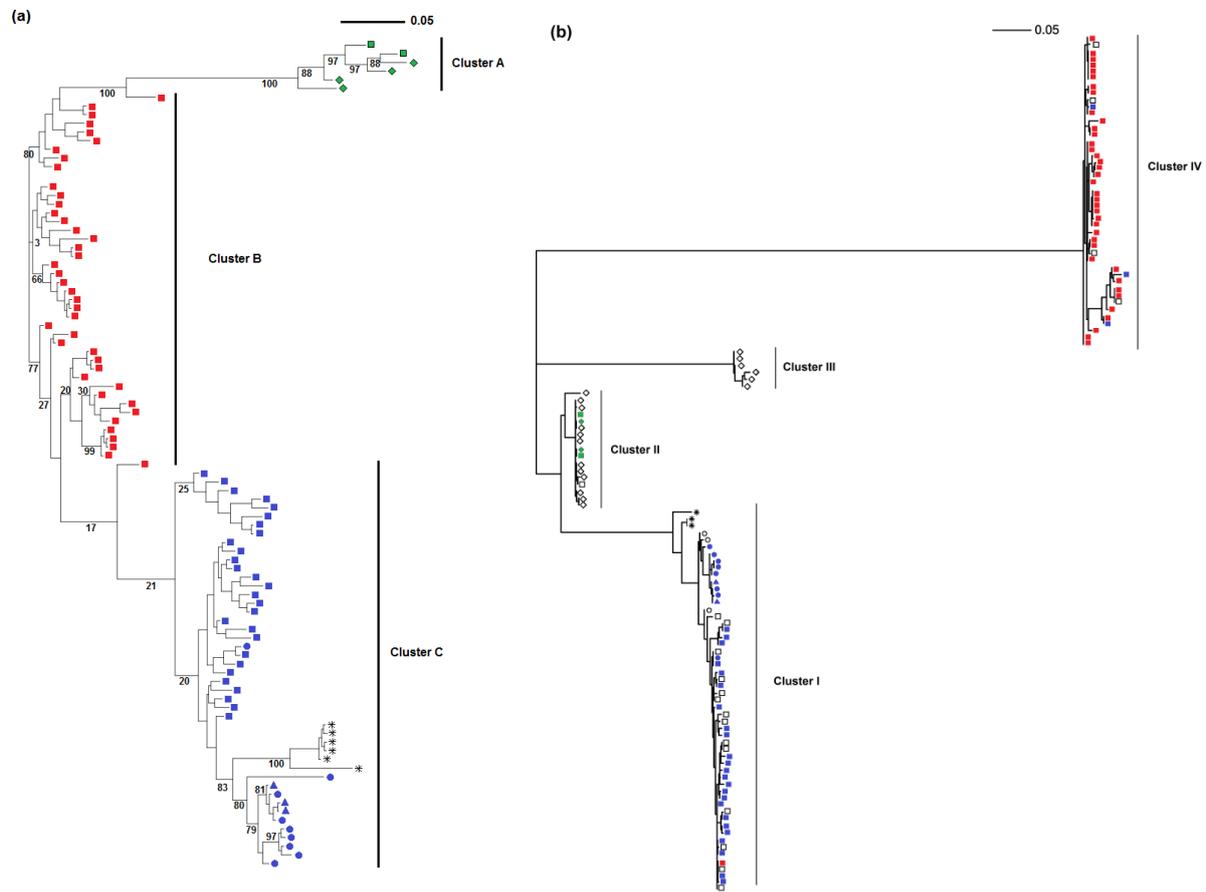


Figure 9 : (a) Super-arbre construit avec Mr Bayes sur la base des séquences ADN de 8 loci et (b) arbre phylogénétique d'*ankA* non raciné construit par maximum de vraisemblance. La numérotation des clusters pour *ankA* respecte celle proposée par Scharf *et al* 2011. Chaque forme représente l'espèce d'hôte chez laquelle le génotype d'*A. phagocytophilum* a été caractérisé : □ pour les bovins, ○ pour les chevaux, Δ pour les chiens, ◇ pour les chevreuils et * indique les souches de références américaines. Une couleur a été attribuée à chaque échantillon présent sur le super-arbre selon le cluster auquel il appartient.

La structuration des génotypes d'*A. phagocytophilum* en groupes génétiques divergents peut être expliquée par trois facteurs (Figure 11) : 1) une différenciation liée à des cycles épidémiologiques distincts (par exemple une différence d'espèce de tiques vectrices ou une différence d'espèces d'hôtes vertébrés réservoirs) (Bown, Lambin et al. 2009; Rejmanek, Bradburd et al. 2012; Rejmanek, Freycon et al. 2013) ; 2) une différence de sensibilité des hôtes vertébrés face à la bactérie qui a pu laisser émerger des variants présentant des niveaux de virulences différents (André and Gandon 2006) ; 3) une émergence ou une évolution de

différentes lignées séparées par des barrières géographiques ou environnementales (Zhaoqing, Miao et al. 2006).

L'hypothèse de la co-existence de plusieurs cycles épidémiologiques qui infectent les animaux domestiques est soutenue par la différence de composition en hôtes des clusters dans le super-arbre et la phylogénie basée sur le gène *ankA*. *A. phagocytophilum* entretient de nombreuses interactions avec les cellules hôtes, d'une part pour infecter et survivre dans les granulocytes et d'autre part pour éviter le système immunitaire de l'hôte. Face à cette nécessité biologique, la pression de sélection exercée sur les gènes impliqués dans ces processus (tel que *ankA*) peut engendrer deux stratégies d'évolution opposées : soit elle favorise la spécialisation des souches à une espèce d'hôte ou à un groupe d'hôtes présentant des systèmes immunitaires très proches, soit elle favorise les souches les plus généralistes (Keesing, Belden et al. 2010; Viana, Mancy et al. 2014). La capacité d'un variant à infecter plusieurs espèces d'hôtes présente un avantage pour persister dans une communauté locale notamment lorsque la composition en espèces varie au cours du temps. La présence de génotypes associés aux bovins dans les trois clusters laisse penser que les pressions de sélection exercées sur *A. phagocytophilum* sont en faveur du maintien d'une diversité de variants adaptés à des gammes d'hôtes vertébrés pouvant être chevauchantes. La divergence serait le reflet d'une adaptation à un ensemble d'hôtes plutôt qu'à un seul. Cette hypothèse est également supportée par d'autres études menées sur la diversité génétique d'*A. phagocytophilum*, qui démontrent l'existence de plusieurs écotypes adaptés à différents ensembles d'hôtes (Bown, Lambin et al. 2009; Scharf, Schauer et al. 2011).

La seconde hypothèse concernant la différence de sensibilité des hôtes pourrait expliquer la grande diversité de symptômes observés chez les bovins. Au fil de l'apparition de mutants génétiques, il est attendu que la sélection favorise les mutants les plus proches du point de virulence évolutivement stable (*evolutionarily stable strategy*, ou ESS). Cependant, des souches présentant un différentiel de virulence peuvent émerger et coexister s'il existe une forte variation de sensibilité chez les hôtes, comme démontré par modélisation, dans le cas d'une vaccination partielle d'une population (André and Gandon 2006). De plus, l'émergence d'un polymorphisme de virulence semble d'autant plus favorisée lorsque le pathogène évolue dans un système multi-hôtes (Gandon 2004). En effet, comme dans l'hypothèse de divergence due à une différenciation des cycles épidémiologiques, le compromis entre adaptation à une espèce d'hôte et capacité à exploiter plusieurs hôtes tend à favoriser la diversité des stratégies de virulence. Les infections expérimentales menées sur les moutons et les souris montrent

l'existence d'une variation de virulence entre les souches d'*A. phagocytophilum* (Massung, Priestley et al. 2003; Stuen, Scharf et al. 2010). Dans notre étude, la relation entre symptômes et variation génétique d'*A. phagocytophilum* n'a pas pu être testée, car pour la plupart des échantillons les informations concernant les symptômes cliniques n'ont pas pu être récupérées. Cependant, la cohérence entre la topologie du super-arbre et celle des phylogénies basées sur les gènes *ankA* et *pleD* (deux gènes liés à la régulation de l'infection) pose question sur la relation entre virulence et divergence génétique. Cette hypothèse nécessite des études complémentaires, notamment par infections expérimentales, pour être validée.

La dernière hypothèse, suggérant que la structuration génétique d'*A. phagocytophilum* résulte d'une structuration spatiale, ne semble pas être validée par les résultats de notre étude (Figure 10). Il est néanmoins envisageable que le facteur spatial joue un rôle dans l'évolution et la répartition des génotypes à travers des phénomènes de dérive ou d'adaptation à une communauté d'hôtes locale. Par exemple, en Sardaigne et, comme nous le présenterons plus loin, en Camargue, le génotype circulant est différent de ceux identifiés dans le reste de l'Europe (Alberti, Zobba et al. 2005; Chastagner A, Bailly X et al. 2013)(annexe 1). Les écosystèmes Méditerranéens (climat, espèces de tiques et d'hôtes présentes) pourraient expliquer la répartition de ce génotype. De même, il a été montré en Sicile que la répartition des espèces d'hôtes et de tiques influence la distribution des souches (Torina, Alongi et al. 2008).

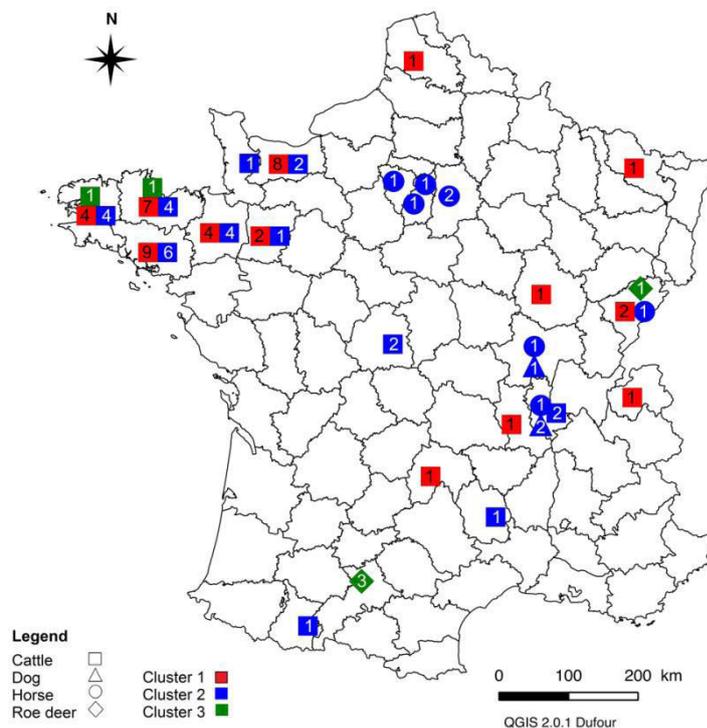


Figure 10 : Carte de répartition des génotypes identifiés dans le super-arbre

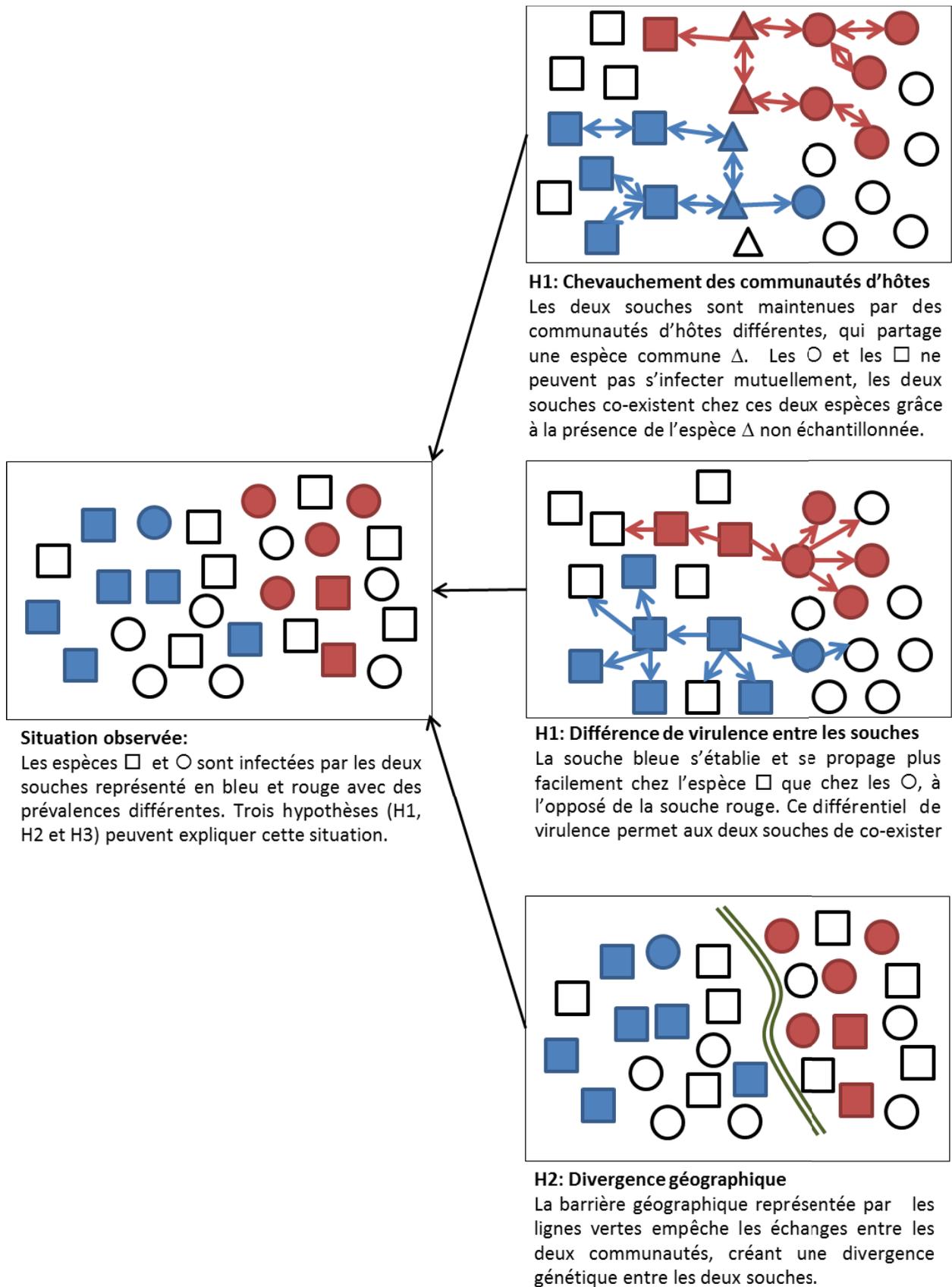


Figure 11 : Représentation schématique des trois hypothèses pouvant expliquer la structuration géographique. Chaque forme correspond à une espèce d'hôte différente. Les couleurs indiquent que l'individu est infecté par une des deux souches.

Bien que l'origine de la répartition des génotypes en différents clusters ne soit pas encore déterminée, nos résultats semblent favoriser l'hypothèse que plusieurs cycles épidémiologiques coexistent. Les bovins sont impliqués dans au moins trois cycles épidémiologiques, et les chevreuils (qui sont décrits comme le principal hôte réservoir d'*A. phagocytophilum*) ne semblent contribuer qu'à la dispersion des génotypes du cluster A, qui est associé à moins de 2% des génotypes infectant les bovins. Sachant que dans les données de séquençage du gène *ankA* disponibles sur Genbank (incluant plus de 800 séquences ADN provenant de plusieurs espèces d'hôtes), aucun génotype associé à des chevreuils n'avait jamais été identifié chez des bovins, l'échange de souches entre les chevreuils et les bovins observé dans notre étude pourrait être dû à un effet de *spill-over*. Le *spill-over* est un «échappement» d'une souche vers une espèce qu'elle n'infecte pas habituellement. Pour les génotypes appartenant aux clusters B et C, l'hôte vertébré réservoir reste à déterminer. Dans la littérature, il a été montré que les sangliers, les hérissons et les cerfs sont porteurs de génotypes proches de ceux décrits chez les animaux domestiques (Huhn, Winter et al. 2014). Les hérissons et les cerfs présentent des taux de prévalence élevés (environ 60% et 80% respectivement (Rymaszewska 2008; Zeman and Pecha 2008; Silaghi, Skuballa et al. 2012; Stuen, Granquist et al. 2013)), ce qui en font de bons candidats en tant qu'hôte réservoir. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer le rôle de ces espèces dans la propagation des souches d'*A. phagocytophilum* pathogènes pour les bovins. Enfin, la présence d'un groupe retrouvé exclusivement chez les bovins (cluster B) pose question sur le rôle des bovins dans le maintien de la bactérie. Les études de séroprévalences montrent qu'une grande proportion de bovins semblent être en contact avec la bactérie sans présenter de symptômes. Jusqu'à 77% des bovins se sont révélés séropositifs en Belgique au cours d'une année (Lempereur, Lebrun et al. 2012). Si la présence de porteurs sains dans les troupeaux bovins est confirmée, et que ces animaux peuvent transmettre la bactérie aux tiques, les bovins pourraient maintenir à eux seuls la bactérie dans la population et jouer le rôle d'espèce réservoir.

Au bilan, l'utilisation de la MLSA pour caractériser les génotypes circulant chez les bovins nous a permis d'identifier trois groupes de génotypes. Ces groupes semblent associés à différentes communautés d'hôtes, ce qui suggère la présence de trois cycles épidémiologiques impliquant les bovins en France. Les chevreuils ne sont associés qu'à un seul des trois groupes. Pour décrypter ces cycles et déterminer les réservoirs, des études complémentaires sont nécessaires.

3.2 Les génotypes issus des chevaux et des chiens sont regroupés dans un seul cluster proche des souches humaines

Les génotypes d'*A. phagocytophilum* portés par les chevaux et les chiens sont groupés dans un même cluster sur le super-arbre. Mais le faible nombre d'échantillons dont nous disposons dans notre étude ne permet pas de généraliser cette information. Nous avons donc choisi de comparer nos séquences avec une sélection de séquences provenant de chiens, chevaux et humains représentatives de la diversité disponibles sur Genbank pour le gène *AnkA*. Un arbre phylogénétique a été construit à partir de ces séquences et d'une sélection d'haplotypes de bovins et chevreuils représentatifs de la diversité en France issus de notre échantillonnage (Figure 12).

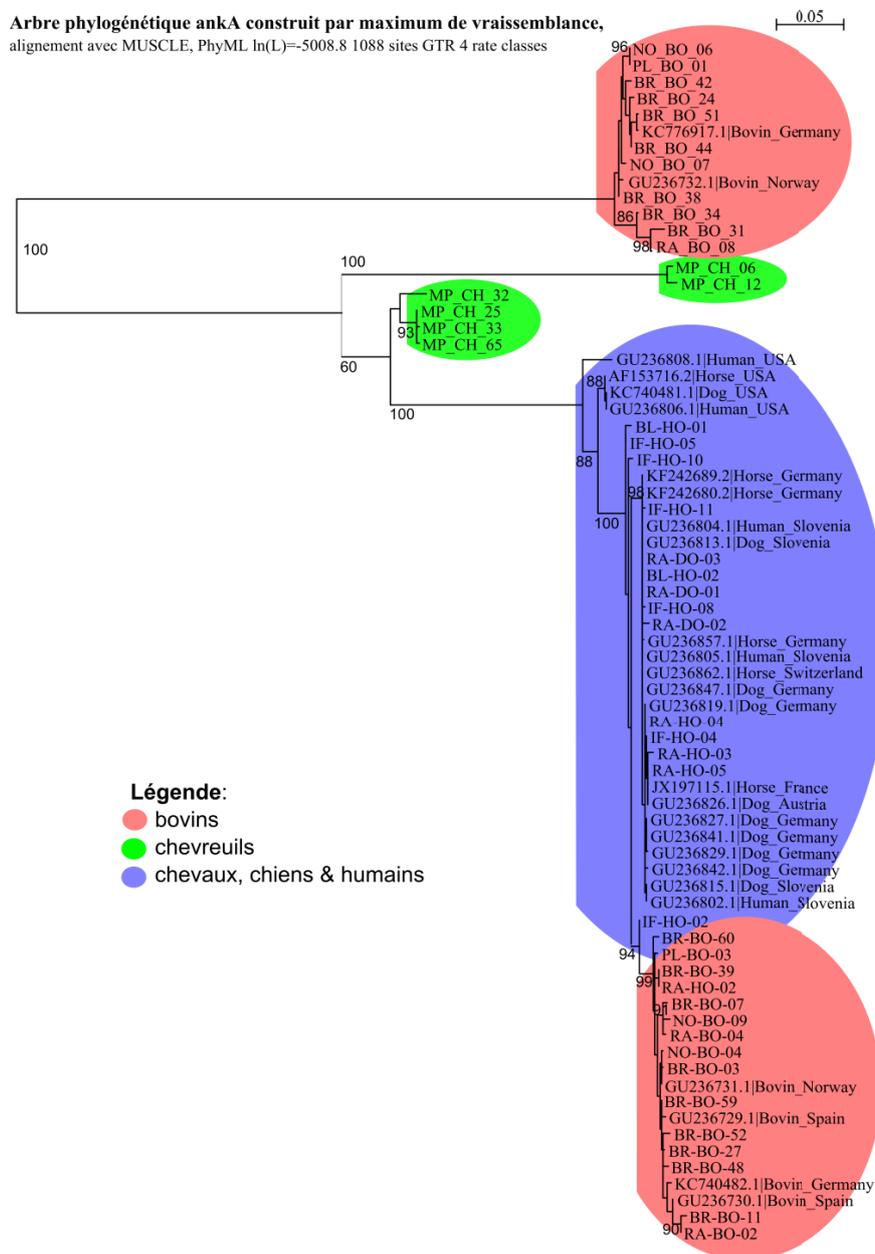


Figure 12 : Arbre phylogénétique *ankA* construit par maximum de vraisemblance

Malgré une répartition spatiale non homogène par espèce, nous remarquons que les génotypes portés par les chiens, les chevaux et les hommes se retrouvent tous dans le cluster I d'*ankA*. Bien que ce cluster comporte des bovins et soit décrit comme associé à d'autres espèces dans la littérature (e.g., les bisons et les moutons (Scharf, Schauer et al. 2011)), les génotypes infectant l'homme sont plus proches des génotypes associés aux chevaux et aux chiens que ceux portés par les autres espèces. La proximité entre les génotypes infectant l'homme, les chevaux et les chiens a également été démontrée sur la base du gène *groESL* (Rymaszewska 2008), et plus récemment par MLST (Huhn, Winter et al. 2014). Ces résultats montrent l'importance de mieux surveiller et contrôler la dispersion d'*A. phagocytophilum* dans ces deux espèces. En effet, leur proximité avec l'homme et la présence de souches potentiellement infectantes pour l'homme accroissent le risque d'émergence de souches zoonotiques.

3.3 Quid des animaux domestiques ne présentant pas de symptômes ?

Une des limites rencontrées dans cette étude est que la diversité d'*A. phagocytophilum* est étudiée seulement chez des animaux présentant des signes cliniques d'anaplasmose granulocytaire suffisamment graves pour justifier la consultation par un vétérinaire. Certes, ces animaux nous intéressent particulièrement car ils nous permettent de mieux comprendre le cycle des variants d'*A. phagocytophilum* pathogènes pour ces espèces et aident à la mise en place de plans de gestion. Cependant, il est possible que certaines souches provoquant des symptômes peu spécifiques ou peu pathogènes pour une espèce donnée n'aient pas été identifiées dans notre étude. Or, pour la mise en œuvre de mesures de prévention ou de contrôle, il est important de tenir compte du fait que certains animaux pourraient être porteurs sains et ainsi participer au maintien de la bactérie. Par exemple, en Camargue (cf chapitre 3) nous avons trouvé, chez les tiques collectées sur les chevaux, une souche très proche des souches humaines américaines (décrites comme très virulentes pour l'homme). Pourtant les chevaux de Camargue ne présentent pas de signes cliniques malgré un taux de prévalence d'environ 8% (Leblond, Tilliette et al. 2009). La détection de ces génotypes est essentielle pour bien comprendre le cycle de la bactérie et contrôler sa propagation.

Conclusion :

Nous avons trouvé chez les animaux domestiques malades, les bovins dans trois groupes phylogénétiques, alors que les chevaux et les chiens ne sont associés qu'à un seul groupe. Les différents groupes génétiques semblent présenter une forte structuration liée aux espèces

d'hôtes. Cette structuration appuie l'hypothèse de l'existence de plusieurs cycles épidémiologiques. Les bovins seraient impliqués dans au moins 3 cycles, dont deux n'impliquant pas les chevreuils. Pour mieux comprendre ces cycles, des études complémentaires incluant plus d'espèces et à des échelles plus locales sont nécessaires, d'une part pour déterminer quelles espèces partagent les mêmes génotypes et d'autre part quelles espèces peuvent être réservoir d'*A. phagocytophilum*.

CHAPITRE 3 :

HYPOTHESES SUR LES CYCLES EPIDEMIOLOGIQUES (RECHERCHE DES HOTES RESERVOIRS ET DES VECTEURS)

Chapitre 3 : Hypothèses sur les cycles épidémiologiques (recherche des hôtes réservoirs et des vecteurs)

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les génotypes d'*A. phagocytophilum* infectant les animaux domestiques sont associés à plusieurs cycles épidémiologiques. Pour mettre en place des mesures de prévention, il nous faut maintenant acquérir une meilleure connaissance des hôtes réservoirs et des tiques vectrices impliqués dans ces cycles. Nous avons cherché quels peuvent être les hôtes vertébrés réservoirs dans les zones d'endémie d'*A. phagocytophilum*. Puis dans un second temps, nous avons recherché quelles espèces de tiques pouvaient véhiculer la bactérie lorsque *I. ricinus* est absente.

1 Recherche des hôtes réservoirs potentiels par l'étude des prévalences

L'étude de la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* chez les animaux domestiques a mis en évidence plusieurs cycles, dont un au moins est lié aux chevreuils. En ce qui concerne les autres cycles, les hôtes réservoirs restent à identifier. La contribution des rongeurs notamment du mulot à collier (*A. flavicollis*), du mulot sylvestre (*A. sylvaticus*) et du campagnol roussâtre (*M. glareolus*) est actuellement discutée car selon les localités la prévalence d'*A. phagocytophilum* chez ces espèces peut varier de moins de 1% jusqu'à 20% de positifs par PCR (Bown, Begon et al. 2006; Stuen, Granquist et al. 2013). De plus, les génotypes portés par ces espèces semblent différents de ceux identifiés chez les autres mammifères (Majazki, Wuppenhorst et al. 2013). Cependant ces espèces font parties des principaux hôtes sur lesquels se gorgent les larves d'*I. ricinus* (Talleklint and Jaenson 1997; Kurtenbach, De Michelis et al. 2002), elles présentent donc un fort potentiel infectieux pour la transmission de la bactérie aux larves de tiques. Nous avons choisi de déterminer si les micromammifères pouvaient contribuer au maintien de la bactérie par une étude de prévalence. Nous avons comparé les prévalences d'*A. phagocytophilum* chez les micromammifères dans 4 zones d'endémie géographiquement distantes, pour vérifier si les taux observés sont spatialement stables. Enfin nous avons comparé les prévalences observées chez les micromammifères à celles observées chez les chevreuils pour déterminer la contribution de chacune des espèces dans le maintien de la bactérie dans l'écosystème. Ce travail fait l'objet d'une publication en cours de préparation.

1.1 Matériels et méthodes

1.1.1 Description des sites d'échantillonnage

Les rongeurs ont été échantillonnés sur quatre sites : deux sites étudiés à travers le projet OSCAR en Zone Armorique près de Pleine-Fougère (Ille-et-Vilaine) et dans les Vallons de Gascogne près d'Aurignac (Haute-Garonne), et deux sites échantillonnés dans le cadre d'un suivi de population de rongeurs dans les forêts de Bellevaivre et Chérimont (Haute-Saône).

Sur les sites de Zone Armorique et Vallons de Gascogne, les rongeurs ont été capturés aux printemps et automnes 2012 et 2013. Chaque site était fractionné en 4 zones selon des caractéristiques paysagères : bocage dense, bocage ouvert, cœur de forêt et lisière de forêt. Sur chaque zone 6 lignes de pièges ont été disposées. Chaque ligne d'environ 100 m était composée de 34 pièges INRA espacés de 3 m. Les pièges INRA, sont conçus pour piéger toutes les espèces de micromammifères. Ce sont des pièges à capture unique, autrement dit, qui ne permettent pas d'attraper d'autres animaux lorsqu'ils sont fermés. Les pièges ont été relevés une fois par jour pendant 3 jours. Les rongeurs capturés ont été euthanasiés, identifiés et autopsiés. Les rates ont été prélevées et conservées au congélateur à -20°C pour la détection des pathogènes.

Sur les sites de Bellevaivre et Chérimont, les rongeurs ont été capturés dans le cadre d'une étude par Capture-Marquage-Recapture (CMR) effectuée en 2010 et 2011 à raison de 5 sessions de captures par an. Sur chaque site, 49 pièges Ugglan ont été disposés en quadra (1 piège/12m) sur des parcelles de 100m x100m. Les pièges Ugglan sont similaires aux pièges INRA mais permettent les captures multiples. Un prélèvement de sang a été réalisé par prise de sang rétro-orbitale sur animaux vigiles. Le sérum a été séparé du culot sanguin par centrifugation, et les culots ont été conservés au congélateur à -20°C pour la recherche de pathogènes.

En parallèle aux captures de rongeurs, sur le site des Vallons de Gascogne, en hiver 2011/2012 et 2012/2013, des captures de chevreuils ont été réalisées en collaboration avec l'INRA de Toulouse dans le cadre d'un suivi de population par CMR. Un tube de sang sur EDTA a été prélevé sur chaque animal capturé et conservé au congélateur à -20°C .

1.1.2 Extraction et amplification de l'ADN

Extraction de l'ADN

L'ADN contenu dans les échantillons de sang de chevreuils et des rates de micromammifères a été extrait à l'aide des kits NucleoSpin blood QuickPure et NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) comme décrit dans le chapitre 2. Pour extraire l'ADN des culots sanguin de micromammifères aucun protocole n'existait, nous avons donc mis au point et testé plusieurs protocoles d'extraction à partir de kits existants. Le protocole présentant le meilleur rendement en ADN, à la fois quantitatif et qualitatif, utilise le kit « NucleoSpin blood QuickPure ». Le protocole utilisé diffère de celui du fabricant par un doublement de la quantité de protéinase K et de BQ1 lors de l'étape de lyse cellulaire.

Détection d'*A. phagocytophilum* et caractérisation génétique

La présence d'*A. phagocytophilum* dans les extraits d'ADN a été détectée par qPCR selon le protocole Courtney (Courtney and Massung 2003) comme décrit dans le chapitre 2. La caractérisation des souches a été tentée suivant le même protocole que pour les animaux domestiques (chapitre 2).

1.2 Résultats

Au total 950 rongeurs ont été collectés, 205 sur le site de Chérimont, 126 à Bellevaire, 485 en Zone Armorique et 134 dans les Vallons de Gascogne. Les principales espèces capturées sont le mulot sylvestre (*A. sylvaticus*), le mulot à collier (*A. flavicollis*) et le campagnol roussâtre (*M. glareolus*). Sur le site des Vallons de Gascogne, 30 chevreuils ont été capturés en 2012 et 31 en 2013.

Les prévalences chez les rongeurs étaient très variables selon l'espèce et le site. Sur le site des Vallons de Gascogne aucun rongeur ne s'est révélé positif, alors que 63-88% des chevreuils étaient positifs. Sur les sites de Zone Armorique et Bellevaire la prévalence d'*A. phagocytophilum* chez les mulots était faible (2,5% et 5% de positifs par qPCR), alors qu'à Chérimont 26% des mulots étaient positifs. La prévalence dans les populations de campagnols roussâtres était en moyenne plus élevée et plus stable (14% à 24% des individus étaient positifs (Tableau 2)). Dans notre échantillonnage une seule musaraigne couronnée (*Sorex coronatus*) et un campagnol agreste (*Microtus agrestis*) ont été capturés, tous deux étaient positifs.

Tableau 2 : Prévalence d'*A. phagocytophilum* chez les rongeurs et les chevreuils sur les quatre sites étudiés. Nombre de positifs / nombre testés (pourcentage de positifs)

Espèce	Zone Armorique	Vallons de Gascogne	Chérimont	Bellevaire
Campagnols roussâtres <i>Myodes glareolus</i>	18/127 (14%)	0/25 (0%)	37/162 (23%)	25/105 (24%)
Mulots <i>Apodemus sp.</i>	9/357 (2,5%)	0/109 (0%)	11/42 (26%)	1/21 (5%)
Musaraignes couronnées <i>Sorex coronatus</i>	1/1 (100%)	-	-	-
Campagnols agrestes <i>Microtus agrestis</i>	-	-	1/1 (100%)	-
Chevreuils <i>Capreolus capreolus</i>	-	56/75 (75%)	73% *	

* données régionales d'après Portier (2008)

Nous avons rencontré beaucoup de difficultés pour amplifier les génotypes d'*A. phagocytophilum* infectant les rongeurs. Nous avons sélectionné les 94 individus présentant la plus forte quantité d'ADN bactérien pour tenter un génotypage. Cependant l'amplification n'a été obtenue que pour 5 individus sur le gène *typA*, 3 sur *msp4* et 1 sur *groEL*.

- Sur *typA*, deux génotypes déjà identifiés chez les bovins ont été amplifiés. Le premier génotype identifié chez deux mulots et deux campagnols différait d'un nucléotide par rapport au second génotype identifié chez un mulot. Ces deux génotypes avaient été identifiés chez des bovins appartenant aux groupes B et C décrit par la MLST.
- Sur le locus *msp4*, deux génotypes également identifiés chez les bovins appartenant aux groupes B et C décrit par la MLST ont été amplifiés. Le premier génotype a été identifié chez un mulot et le second chez un mulot et un campagnol. Les deux génotypes différaient de 9 nucléotides sur 390 (soit 98% d'identité).
- Enfin, pour le gène *groEL*, une seule séquence d'*A. phagocytophilum* a été amplifiée chez un campagnol. Ce génotype était très éloigné de ceux caractérisés chez les chevreuils et les animaux domestiques cliniquement infectés. Parmi les génotypes caractérisés dans notre étude la séquence la plus proche (issue d'un chevreuil) présentait seulement 95% d'identité et différait de 54 nucléotides sur 1164. Des séquences identiques à celle que nous avons trouvée sur ce rongeur ont été décrites

chez d'autres campagnols roussâtres en Slovaquie et en Suisse (GenBank : AF192796, KF383227-KF383232).

1.3 Discussion

Les prévalences d'*A. phagocytophilum* sont beaucoup plus élevées chez le chevreuil que chez les rongeurs. Dans les Vallons de Gascogne la prévalence chez le chevreuil était de 63% en 2012 et 88% en 2013. La prévalence d'*A. phagocytophilum* décrite chez le chevreuil en Franche-Comté dans la littérature était de 76% en 2007/2008 (Portier 2008), en Bretagne la prévalence chez le chevreuil n'a pas été étudiée. Ces fortes prévalences laissent penser que le chevreuil a un fort potentiel de réservoir pour un des cycles d'*A. phagocytophilum*. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les génotypes portés par les chevreuils sont rarement retrouvés chez les animaux domestiques. Les chevreuils ne semblent donc pas être la source des bactéries pour les animaux domestiques. Chez les rongeurs les prévalences sont plus faibles et très variables selon les zones échantillonnées. Dans notre échantillonnage, les prévalences observées chez les rongeurs étaient également semblables à celle décrites dans la littérature (Stuen, Granquist et al. 2013). Les prévalences observées chez les campagnols roussâtres (14 à 24%) suggèrent que cette espèce contribue fortement au cycle d'*A. phagocytophilum*. Chez les mulots, les faibles prévalences observées sur deux sites suggèrent qu'ils participent peu à la propagation d'*A. phagocytophilum*, alors que dans la forêt de Chérimont ils représentent l'espèce la plus infectée. Ces deux espèces de rongeurs sont décrites comme fortement parasitées par les larves d'*I. ricinus*, ce qui en fait de bons réservoirs potentiels pour les maladies à tiques. La caractérisation par MLSA des souches d'*A. phagocytophilum* circulant chez les rongeurs n'a pas pu être réalisée car peu d'amplifications ont réussi.

Les détections par qPCR ont révélé une bactériémie très faible chez les rongeurs, dans la plupart des cas moins de 10 cellules infectées ont été détectées (Ct compris entre 37 et 42). Sachant que la bactériémie chez l'hôte est un facteur important pour l'efficacité de la transmission et la maintenance de la bactérie après la mue, il est possible que malgré les fortes prévalences chez les campagnols, la bactériémie ne soit pas suffisante pour que la transmission de la bactérie des rongeurs vers les tiques soit possible. Cette faible bactériémie peut expliquer l'inefficacité des amplifications réalisées pour le séquençage, mais la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* peut également en être la cause. En effet, de récentes études visant à caractériser les génotypes d'*A. phagocytophilum* chez les rongeurs montrent que les

génotypes portés par les rongeurs sont génétiquement différents de ceux portés par les autres espèces de mammifères (Majazki, Wuppenhorst et al. 2013; Huhn, Winter et al. 2014). Dans notre étude, seul un génotype a été identifié sur la base du gène *groEL*, celui-ci est très différent de ceux décrit chez les autres mammifères. Les deux génotypes identifiés sur le gène *typA* et ceux identifiés sur le gène *msp4* ont déjà été identifiés chez des bovins. Les rongeurs semblent donc être porteurs de plusieurs génotypes dont ceux pathogènes pour les animaux domestiques. Malheureusement, le faible nombre de séquences obtenues ne nous permet pas de conclure de manière quantitative quant à la spécificité des génotypes retrouvés chez les rongeurs. L'absence de rongeurs positifs dans les Vallons de Gascogne, où de nombreux chevreuils sont porteurs d'*A. phagocytophilum*, suggère qu'ils ne participent pas aux mêmes cycles épidémiologiques. Bown et al (2003) ont décrit une forte saisonnalité de la prévalence chez *A. sylvaticus* et *M. glareolus* concordante avec l'abondance de *I. trianguliceps*, et une absence de rongeurs positifs de janvier à avril, suggérant que les populations de rongeurs ne permettent pas de maintenir la bactérie dans l'écosystème. Les rongeurs ne seraient pas réservoirs d'*A. phagocytophilum*, mais il participeraient plutôt au cycle de la bactérie en permettant le maintien des populations de tiques qu'ils nourrissent et en permettant la transmission entre tiques par *co-feeding*. L'implication des rongeurs dans le maintien d'*A. phagocytophilum* reste donc à démontrer.

Bilan

Les prévalences chez les mulots et le campagnol roussâtre sont bien inférieures à celles décrites chez les chevreuils. Sur le site de vallon de Gascogne aucun rongeur n'était positif, ils ne participent donc pas aux cycles épidémiologiques des génotypes d'*A. phagocytophilum* présent dans cette région. Sur les trois autres sites d'échantillonnage, la prévalence semble suffisante pour maintenir la bactérie dans un écosystème. Cependant, un suivi longitudinal des prévalences serait nécessaire pour vérifier la persistance de la bactérie et connaître les variations du taux d'infection au cours de l'année. De plus, la caractérisation des génotypes portés par les rongeurs reste à mettre au point pour vérifier leur implication dans le cycle des génotypes pathogènes pour les animaux domestiques.

2 Recherche des réservoirs potentiels à l'échelle d'un site : les Vallons de Gascogne.

Il est difficile de déterminer quels sont les hôtes réservoirs à une échelle globale, car les prévalences et les souches circulantes sont très variables selon les sites. A l'échelle d'un site ou d'un écosystème, il est plus aisé de prendre en compte l'ensemble des espèces infectées par une bactérie et de déterminer leur contribution au maintien et à la propagation des différentes souches. Nous avons choisi d'étudier la contribution des chevreuils au cycle d'*A. phagocytophilum* sur le site des Vallons de Gascogne. Ce site a été sélectionné car l'étude des prévalences montre que les chevreuils sont fortement infectés dans cette région alors que les rongeurs sont tous négatifs. En comparant les souches circulant chez les tiques et celles circulant chez les chevreuils, nous déterminerons si les chevreuils sont les seuls hôtes réservoirs d'*A. phagocytophilum* dans la zone ou si d'autres hôtes réservoirs sont à rechercher. Nous avons également comparé la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* chez les chevreuils entre le site des Vallons de Gascogne et l'élevage de Gardouch. Dans l'élevage, les chevreuils sont en surpopulation. La circulation de la bactérie devrait être favorisée par cette situation. La prévalence d'*A. phagocytophilum* ainsi que le nombre de co-infections devraient ainsi être plus élevés à Gardouch que dans les Vallons de Gascogne. Ce travail fait l'objet d'une publication en cours de préparation.

2.1 Matériels et méthodes

2.1.1 Description de l'échantillonnage

Aux printemps 2012 et 2013, des tiques ont été échantillonnées dans le cadre du projet OSCAR sur le site des Vallons de Gascogne. Les tiques ont été collectées par la méthode du drapeau sur 90 lignes. Les lignes sont réparties en bordure de haies dans les bocages, et en lisière et au cœur de la forêt (Figure 13). La méthode du drapeau consiste à tirer un drap de 1 m² sur 10 mètre de distance. Les tiques à l'affût (en attente d'un hôte) s'accrochent sur le drap qu'ils confondent avec un hôte. Cette technique est efficace pour échantillonner les tiques *I. ricinus* quel que soit leur stade de développement.

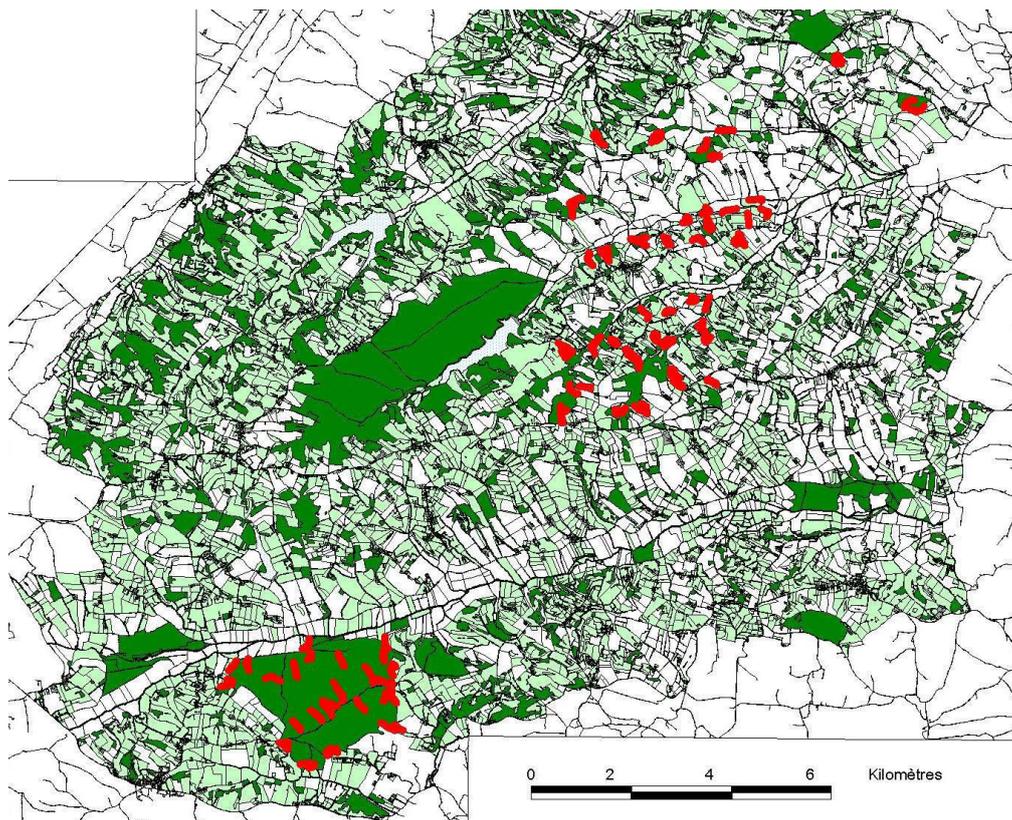


Figure 13 : Site des Vallons de Gascogne. Répartition des lignes d'échantillonnage des tiques (en rouge). Les forêts sont indiquées en vert foncé, les pâtures en vert clair et les zones cultivées en blanc. Coordonnées GPS du centre de la figure : 43° 18' 54" Nord 0° 53' 44" Est.

Au total, 3019 *I. ricinus* ont été collectées (2947 nymphes et 72 adultes). Parmi lesquelles, 1837 nymphes ont été sélectionnées par tirage aléatoire stratifié par ligne de collecte pour la détection de pathogènes.

Comme nous l'avons indiqué dans l'étude des prévalences, 61 chevreuils ont été capturés sur le site des Vallons de Gascogne entre décembre 2011 et février 2013 au cours de deux sessions de capture. Parmi les 31 chevreuils capturés au cours de la deuxième session, 5 individus avaient déjà été capturés l'année précédente.

En parallèle aux captures des vallons de Gascogne, 56 chevreuils ont été abattus dans l'élevage de Gardouch (27 individus au début de l'année 2012 et 29 chevreuils début 2013). L'élevage de Gardouch est une installation expérimentale de l'unité Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (INRA) qui mène des expériences sur le système «chevreuil-environnement». Les animaux évoluent en semi-liberté dans un grand enclos boisé et dans 7 petits enclos en prairie. Du sang et un morceau de rate ont été collectés sur chaque individu et conservés à -20°C pour la recherche de pathogènes.

2.1.2 Caractérisation d'*A. phagocytophilum* par séquençage haut-débit

Extraction de l'ADN total et détection d'*A. phagocytophilum*

L'extraction de l'ADN contenu dans les tiques a été effectuée par précipitation dans l'ammoniaque selon la méthode de Morán-Cadenas et al (Moran-Cadenas, Schneider et al. 2007). La détection d'*A. phagocytophilum* a été effectuée par qPCR à partir de 10 µl d'extrait selon le protocole de Drazenovich et al (Drazenovich, Foley et al. 2006).

Caractérisation des génotypes d'*A. phagocytophilum* portés par les tiques et les chevreuils

Chez les chevreuils et les tiques, la cooccurrence de souches d'*A. phagocytophilum* nous a contraints à modifier notre méthode de caractérisation. En effet, l'utilisation du séquençage Sanger n'est pas adaptée au séquençage d'échantillons co-infectés car elle ne permet pas de différencier les différents génotypes. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'un séquençage haut-débit par la méthode 454 (Margulies, Egholm et al. 2005), qui permet d'obtenir des séquences indépendantes pour les différents fragments amplifiés lors de la PCR. Nous avons choisi une profondeur de séquençage d'environ 300 reads par échantillons et par locus.

Le séquençage 454 ne permettant pas de séquencer des fragments d'ADN de grande taille, nous avons redessiné des amorces de PCR permettant d'amplifier des régions de 380 pb sur les gènes *msp4*, *groESL* et *ankA*. Les amplifications ont été réalisées par PCR nichées. Pour *msp4* et *groEL*, la première PCR a été réalisée avec les amorces utilisées lors des amplifications interne pour le séquençage Sanger, c'est-à-dire avec les amorces *msp4*-Fb1, *msp4*-Rb1, HSVR, et HS43 (Tableau 1 page 45). Pour *ankA*, de nouvelles amorces reverses ont été dessinées pour amplifier une plus large gamme de génotypes. Deux amplifications ont été réalisées en parallèle avec l'amorce Fe-ankA (Tableau 1 page 45) et l'amorce *ankA*-new-R1 3'- GCTGCTATATGTAAAGCCGT-5' dans un cas, et l'amorce *ankA*-new-R2 3'- GCTGCTACGTGTAAAGGTGT-5' dans le second cas. Nous avons amplifié chaque loci dans un volume de réaction de 50µl en utilisant 4 µl de chaque amorce décrites ci-dessus, 4 µl de dNTP à 25 mM, 10 µl de Q solution (Qiagen), 2µl de MgCL2 à 25 mM et 2 unités de Taq polymérase (Qiagen, Venlo, Netherlands). Le programme utilisé pour les PCR primaire est le même que celui présenté Figure 8 (page 44). Nous avons utilisé une température d'hybridation de 62°C pour les amplifications d'*ankA*.

Pour chaque locus, une PCR nichée a été effectuée avec 5 µl de produit de première PCR dans un volume total de 44 µl avec le même mélange que pour l'amplification primaire. Pour chaque échantillon, un tag unique de 12 pb a été ajouté à l'amorce forward pour identifier l'individu auquel sont associées les séquences. Les amorces utilisées sont : groEL1_f 3'-TGCTMAGAGCTTCACCTTCA-5' et groEL1_r_1 3'-GAGACGTGAAGTAGAAGAAGACGA-5' pour *groEL* ; msp4_f 3'-TAACAAGCGTTAAGCATTACAGAT-5' et msp4_r_1 3'-TCCGTCATTYCCTTCTATATCTTCA-5' pour *msp4*. Pour *ankA*, nous avons utilisé plusieurs combinaisons d'amorces pour augmenter notre probabilité d'amplifier toute la diversité de génotypes existant pour ce locus : ANKA3_reverse 3'-CTCATTTGCCGTTGTACTGC-5', ANKA1_reverse 3'-CTCATCTACAGCTMGACTGC-5' et ankA1_forward 3'-GCAGCATGTTGCTGTMGAG-5', ankA1_forward 3'-GMAGCATGTTGCTGTMGAG-5'. Pour ces amplifications, nous avons utilisé un cycle classique composé d'une phase de dénaturation de 5 min à 95°C, suivi de 40 cycles débutant par une dénaturation de 30 s à 94°C, puis 30s d'hybridation à 55°C pour *groEL*, 63 °C pour *msp4* ou 60°C pour les différents couples d'amorces d'*ankA*, et terminant par 1 min 30 d'élongation à 72°C. Le dernier cycle s'achevant par 5 min d'élongation finale à 72°C.

Pour chaque gène, les séquences ont été amplifiées, puis préparées pour le séquençage 454 en suivant le protocole décrit Figure 14. Les amplifias des trois gènes ont été mélangés équitablement en un seul tube pour le séquençage.

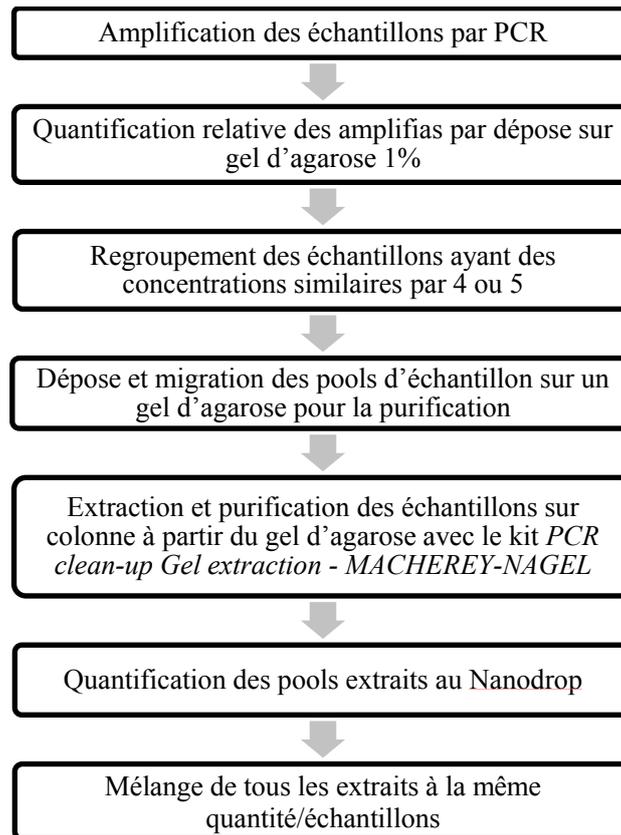


Figure 14 : Protocole de préparation des échantillons pour le séquençage 454

Nettoyage des séquences et regroupement en séquences consensus

Les séquences obtenues lors du séquençage ont été nettoyées et regroupées par génotype suivant le protocole décrit Figure 15.

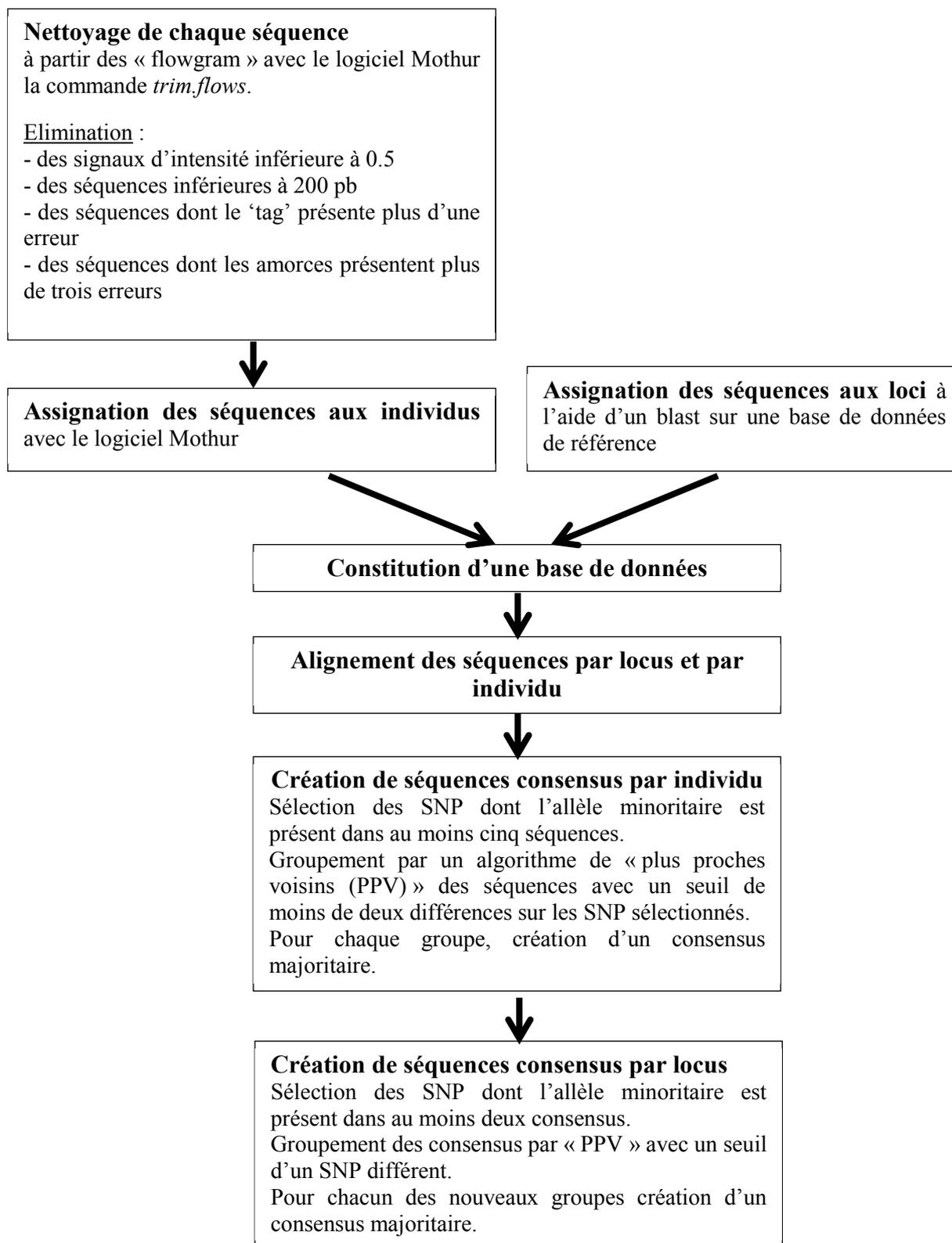


Figure 15 :Schéma du protocole de nettoyage des séquences 454 et de leur regroupement par génotypes

Analyse des génotypes

- Relations phylogénétiques entre génotypes :

Pour chaque locus nous avons construit un réseau phylogénétique par la méthode de NeighborNet à l'aide du logiciel SplitsTree4 (version 4.11.3). Les réseaux phylogénétiques prennent en compte les recombinaisons génétiques, les transferts horizontaux et les hybridations, contrairement aux arbres phylogénétiques. Quelques séquences issues du génotypage d'*A. phagocytophilum* par MLSA (présenté dans le chapitre précédent) ont été ajoutées dans la construction des réseaux pour nous permettre de replacer les génotypes identifiés dans cette étude par rapport à ceux déjà connus. Pour chaque groupe phylogénétique visible sur les réseaux, nous avons calculé le nombre d'individus (tiques et chevreuils) qui portaient les génotypes composant le groupe.

- Le taux de co-infection dans les individus a été évalué par la moyenne du nombre de génotypes rencontrés dans un individu.

- Association entre individus et entre génotypes :

Des réseaux d'association ont été construits avec le package 'igraph' sous R. Dans le réseau d'association des individus, une connexion entre deux individus est établie lorsqu'ils partagent un génotype commun. L'épaisseur des connexions est proportionnelle à la fréquence des génotypes (en nombre de séquences représentant le génotype) dans les deux individus. Pour le réseau d'association des génotypes, ce sont les génotypes retrouvés dans un même individu qui sont reliés ensemble, avec une fréquence d'association également proportionnelle à la fréquence des génotypes dans chaque individu. Les individus et les génotypes les plus fréquemment associés sont regroupés dans une même communauté définie par l'algorithme de Clauset et al 2004, avec la fonction 'fastgreedy.community' sous R.

2.2 Résultats

Parmi les 1837 nymphes analysées, 35 se sont révélées positives à *A. phagocytophilum*. La majorité des tiques positives se situe en lisière de forêts ou de bosquets (Figure 16). A Gardouch 11 chevreuils étaient positifs en 2012 et 9 chevreuils en 2013 (soit 38% et 33% des individus testés respectivement). Seuls les extraits de tiques et de chevreuils présentant les plus fortes concentrations de bactéries estimées par qPCR ont été sélectionnés pour le

séquençage. Au final, les génotypes d'*A. phagocytophilum* contenus dans 16 chevreuils de Gardouch, 21 tiques et 52 chevreuils des Vallons de Gascogne ont été caractérisés.

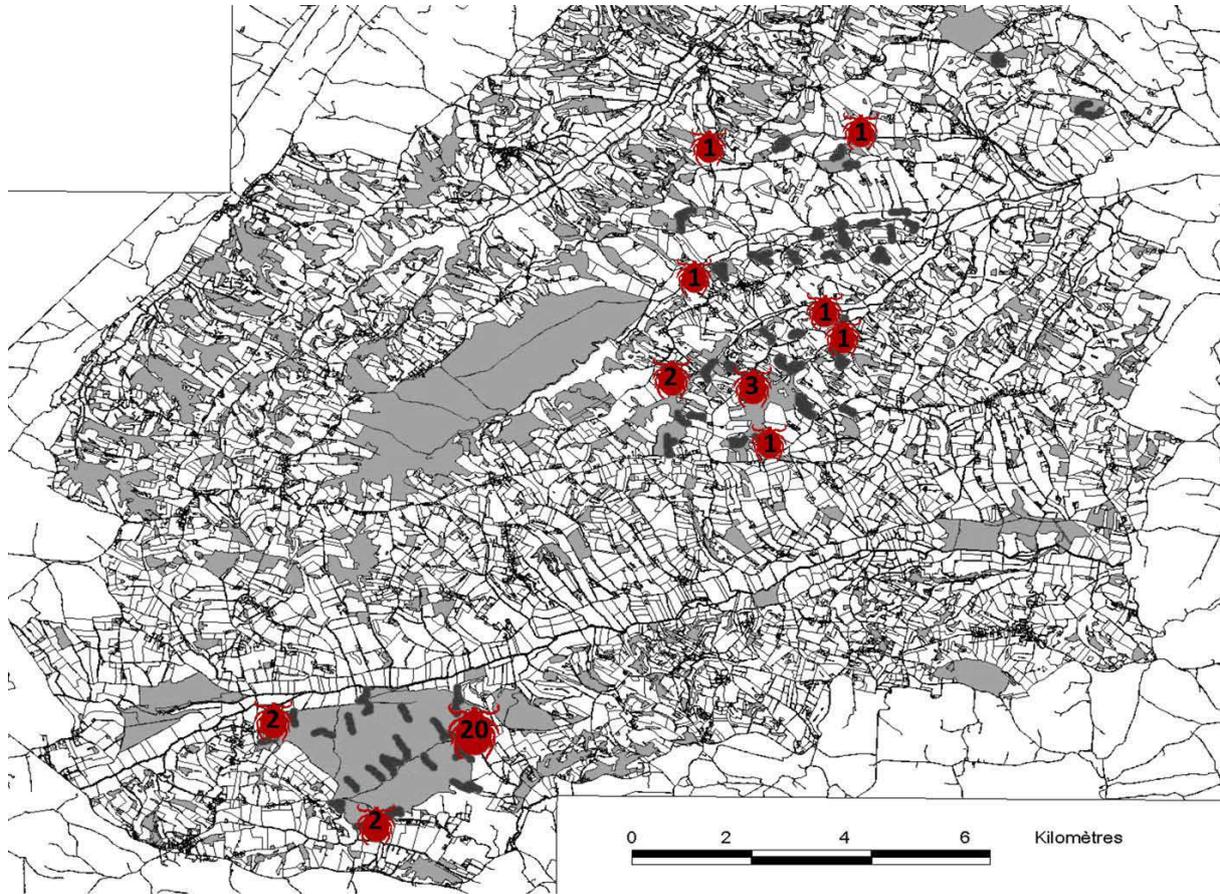
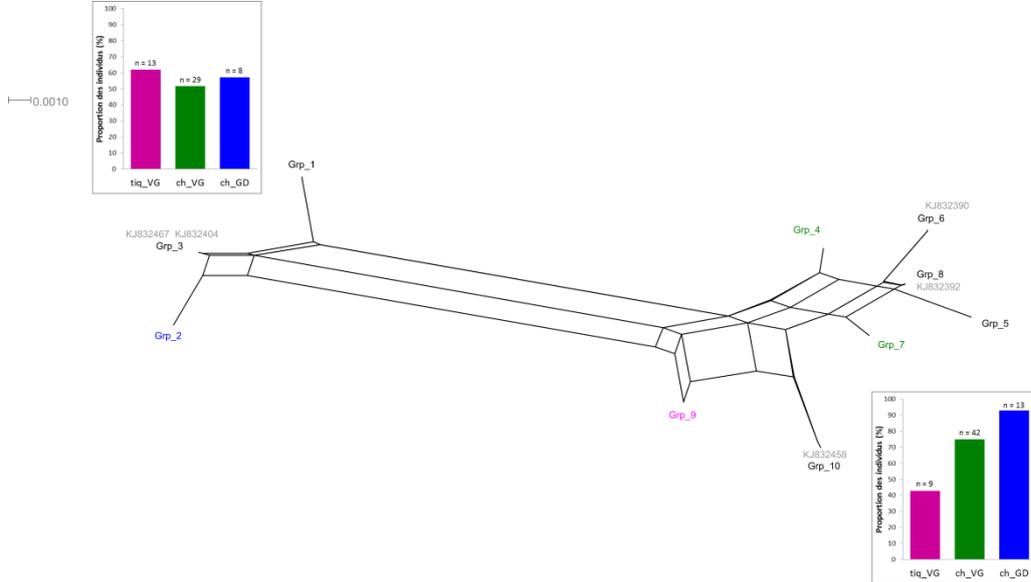


Figure 16 : Site des Vallons de Gascogne. Carte de répartition des nymphes positives à *A. phagocytophilum*

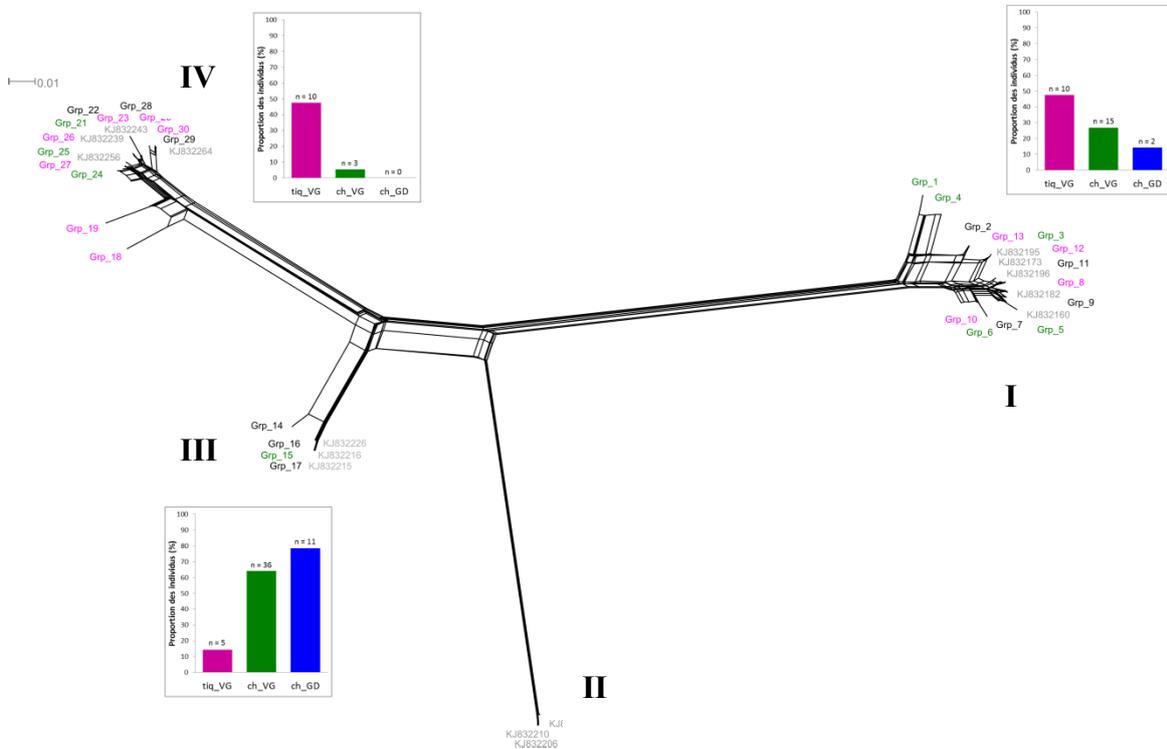
Après nettoyage et regroupement des séquences en génotype, nous avons obtenu 10 génotypes pour le locus *groEL*, 30 génotypes pour *ankA* et 34 génotypes pour *msp4*. Les génotypes sont répartis dans plusieurs groupes phylogénétiques. Sur la phylogénie basée sur le locus *groEL*, nous observons une faible diversité génétique, en nombre de génotypes et en nombre de sites polymorphes sur le fragment étudié (seulement 10 SNP sur 255 nucléotides). Les génotypes de *groEL* se répartissent en deux groupes séparés par moins de 2% de divergence (Figure 17a). Pour le locus *ankA*, les génotypes identifiés sont répartis dans 3 des 4 groupes définis par les séquences de référence. La fréquence des trois groupes de génotypes n'est pas répartie équitablement entre les tiques et les chevreuils. La plus grande partie des génotypes issus des échantillons de chevreuils sont dans le groupe III, alors que 95% des génotypes portés par les tiques sont dans les groupes I et IV (Figure 17b). Sur le locus *msp4* les observations sont similaires. Les génotypes issus des tiques sont répartis plus équitablement dans les différents

groupes, mais ceux portés par les chevreuils sont concentrés dans un seul groupe du réseau phylogénétique (Figure 17c).

a) *groEL*



b) *ankA*



c) *msp4*

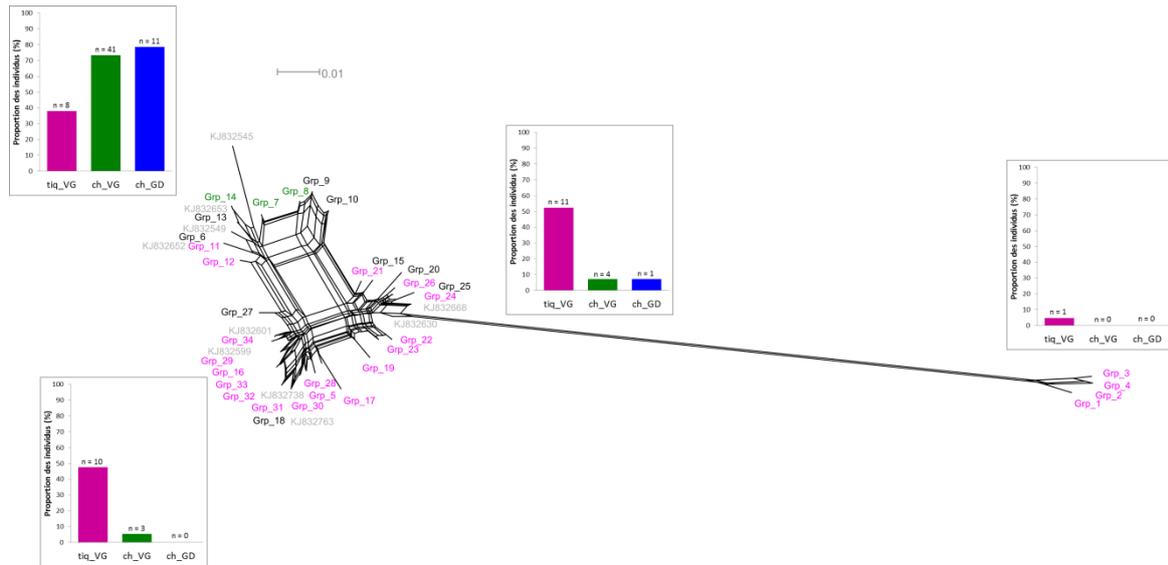


Figure 17 : Réseaux phylogénétiques construits à partir des génotypes de *groEL* (a), *ankA* (b) et *msp4* (c) par la méthode de NeighborNet. Les génotypes représentés en violet proviennent exclusivement de tiques sont, ceux en vert des chevreuils des Vallons de Gascogne et en bleu des chevreuils de Gardouch. Les génotypes portés par plusieurs groupes d'individus sont en noir, et les génotypes de référence en gris.

Le taux de co-infection moyen par locus est compris entre 1,4 et 1,7 génotypes par individu (Figure 18). La co-infection par plusieurs génotypes de *msp4* est la plus forte chez les tiques. 25% des tiques portent plus de 9 génotypes de *msp4* différents, alors que la majorité des chevreuils n'en porte qu'un. Pour *ankA* les fréquences de co-infections sont similaires entre les tiques et les chevreuils. Le maximum de co-infection a été observé chez un chevreuil des Vallons de Gascogne porteur de 9 génotypes d'*ankA*. Enfin pour *groEL* près de 40% des chevreuils de Gardouch sont porteurs de 2 génotypes, et le nombre maximum de génotypes observés dans un individu est de 3. Lorsqu'on considère chaque gène indépendamment les uns des autres, plus de 75 % des individus sont porteurs d'un seul génotype. Cependant près de 60% des individus présentent plusieurs génotypes pour au moins un gène.

Les graphes d'associations d'individus mettent en évidence la présence de plusieurs groupes d'individus partageant les mêmes génotypes. Cinq communautés ont été définies sur *groEL*, 4 communautés sur *ankA* et sur *msp4* (Figure 19). En accord avec les réseaux phylogénétiques, 66% des tiques sont dans une communauté faiblement liée aux chevreuils pour *ankA* et *msp4* et plus de 80% des chevreuils de Gardouch sont dans une même communauté. Pour *groEL*, bien que quatre communautés aient été définies, beaucoup de liaisons sont visibles entre les communautés. Six échantillons provenaient de trois chevreuils échantillonnés en 2012 et recapturés en 2013. Ces trois chevreuils étaient infectés lors des deux prélèvements. Un individu semble avoir conservé une partie des génotypes l'infectant entre les deux prélèvements, car une connexion faible est observée lors de l'analyse des réseaux

d'associations issus des trois gènes. Les deux autres chevreuils ne semblent pas porter le même génotype entre les deux années, car même si un lien faible a été observé sur le graphe de *msp4* pour un des chevreuil, aucun lien n'a été observé sur les autres gènes ; et les prélèvements du dernier chevreuil n'ont aucun lien et ne sont pas affectés aux mêmes communautés sur *msp4*.

Les réseaux d'associations de génotypes mettent en évidence trois communautés de génotypes fréquemment associés dans les individus échantillonnés pour les trois loci. Aucun lien entre l'association des génotypes et la proximité phylogénétique n'est observée (Figure 20).

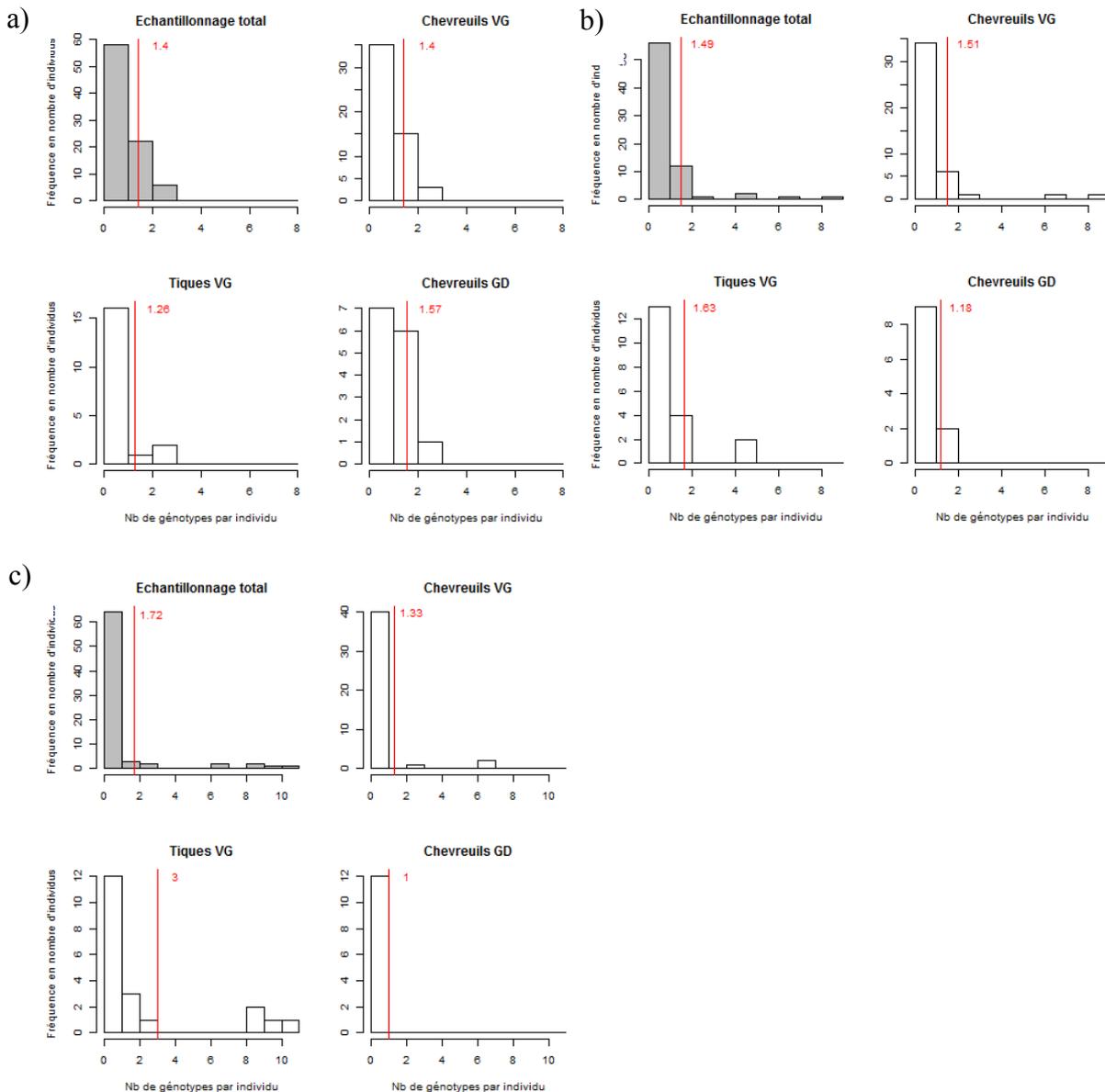
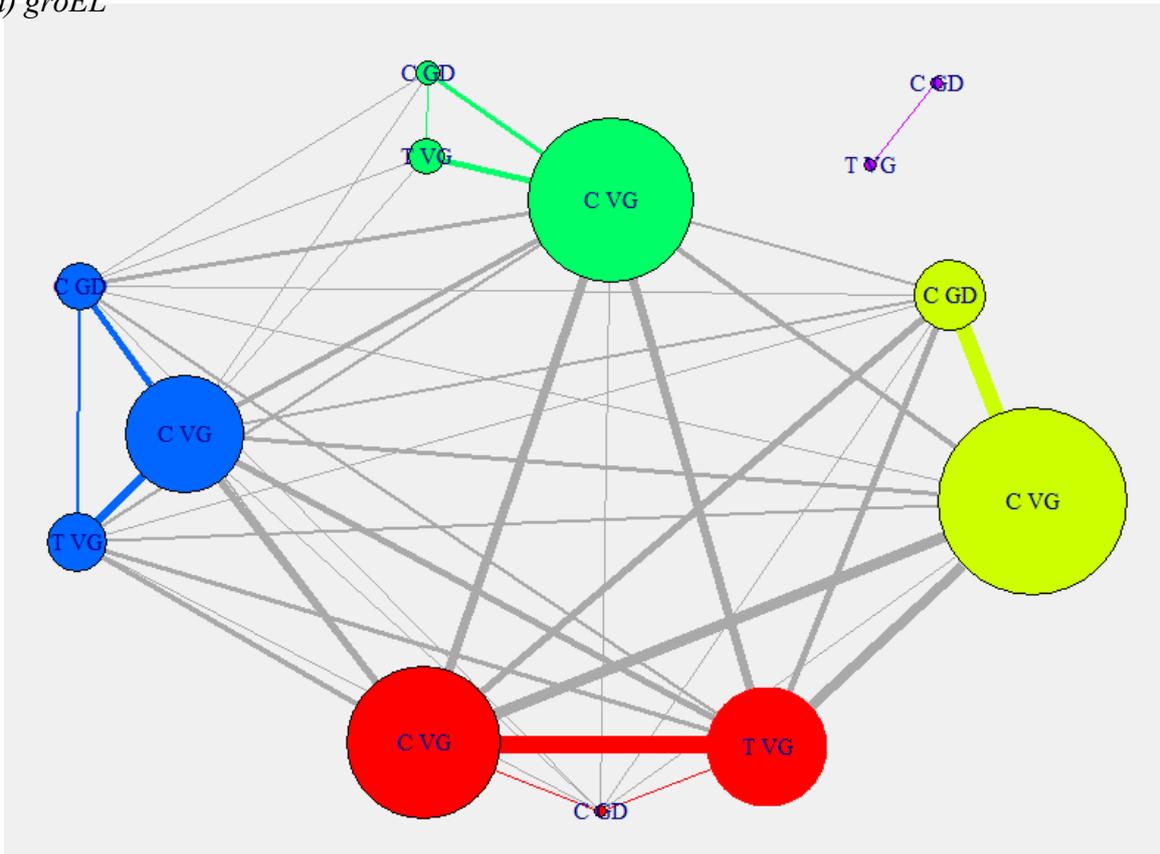
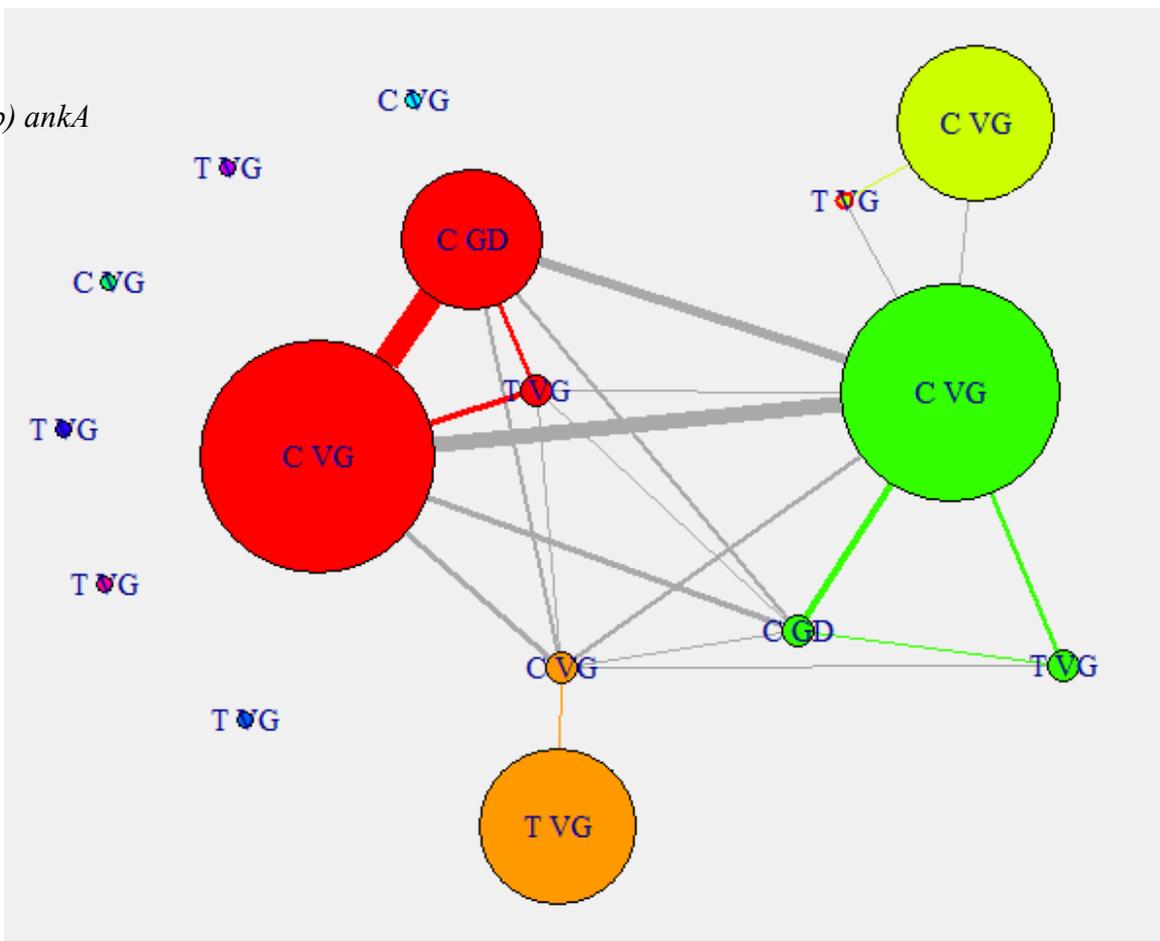


Figure 18 : histogrammes représentant la fréquence des coinfections dans les individus : a) *groEL*, b) *ankA* et c) *msp4*. La ligne rouge représente la moyenne.

a) *groEL*



b) *ankA*



c) *msp4*

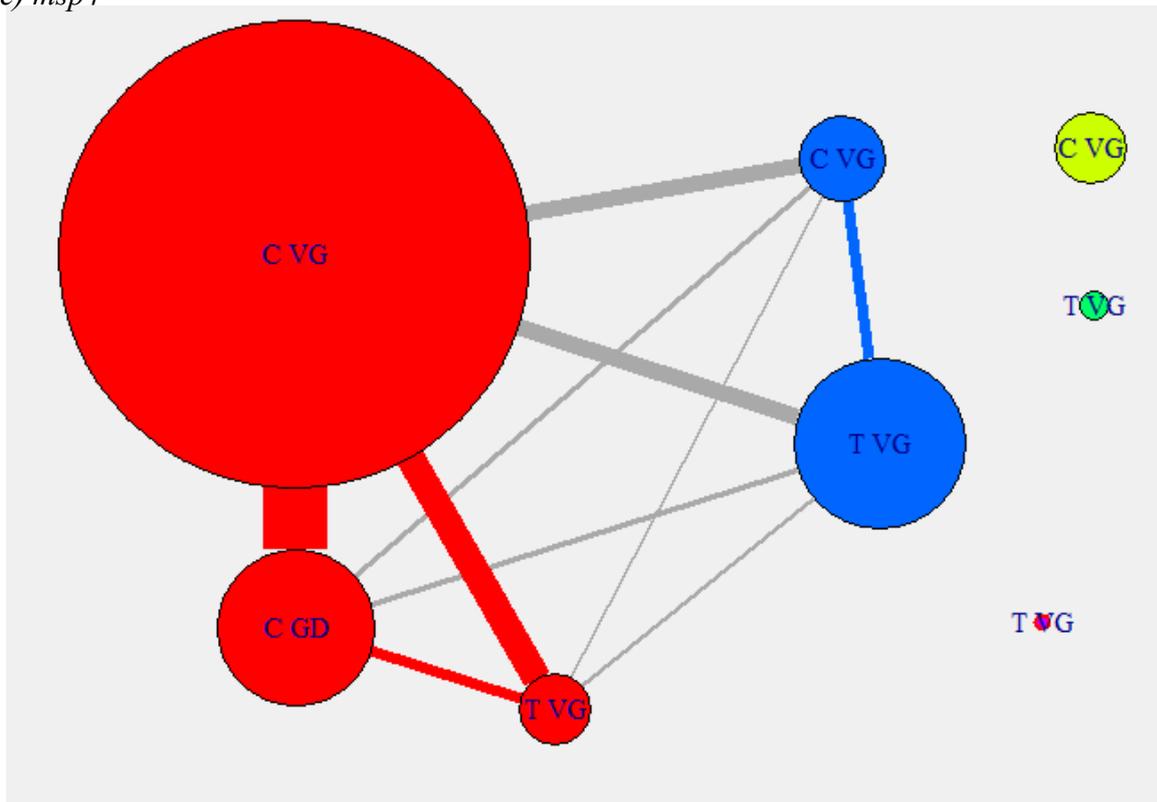


Figure 19 : graphe d'association des individus selon les gènes a) *groEL*, b) *ankA* et c) *msp4*. Chaque communauté d'individus les plus fréquemment associés est représentée par une couleur différente. Les individus appartenant à la même espèce et à la même population sont représentés par un cercle. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus composant la communauté. Le nom des cercles commence par « T » ou « C » selon s'il s'agit d'une Tique ou d'un Chevreuil, les deux lettres suivantes indiquent le site d'échantillonnage « VG » pour les Vallons de Gascogne ou « GD » pour Gardouch. Chaque liaison indique le partage d'un génotype entre deux individus, l'épaisseur des liaisons est proportionnelle aux nombres de séquences partagées.

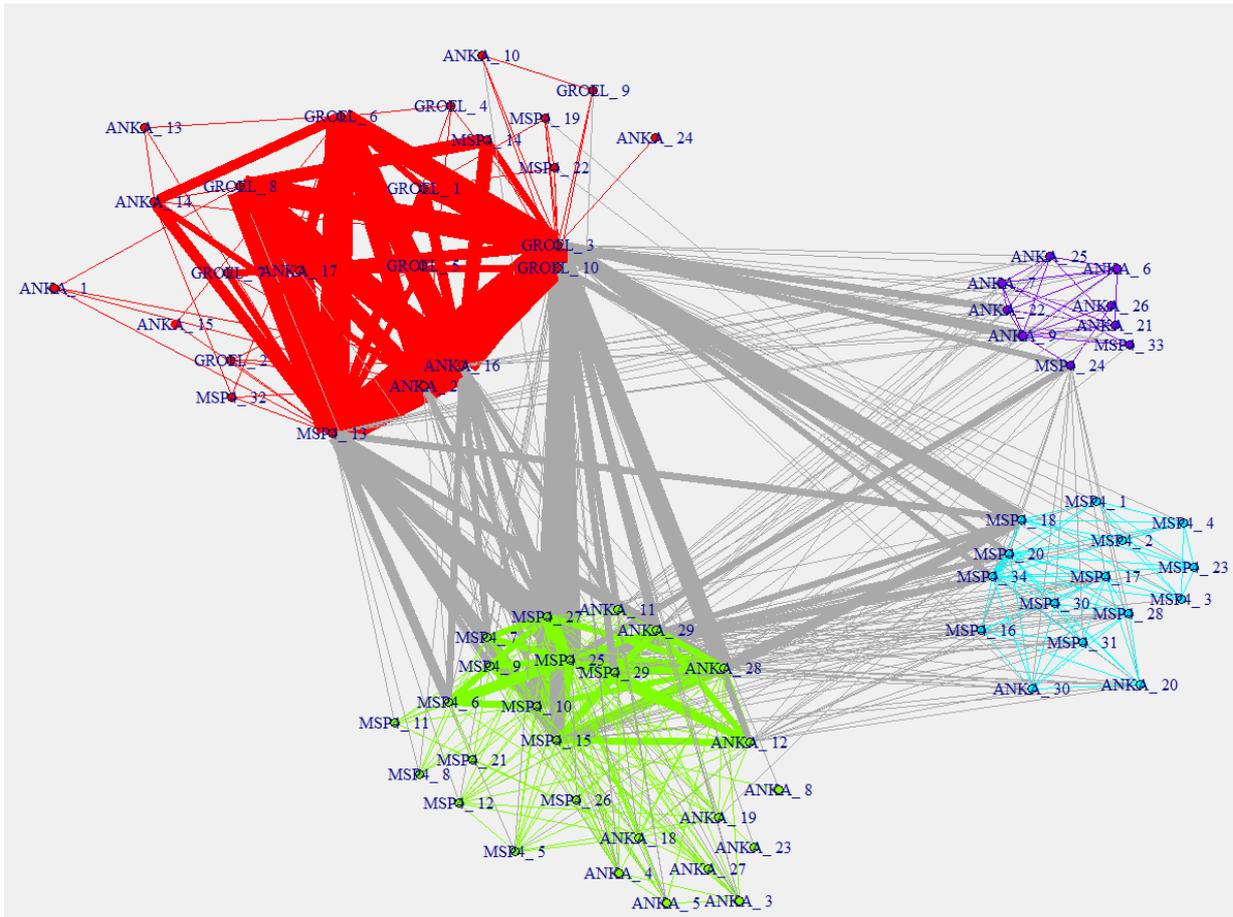


Figure 20 : Réseaux d'association des génotypes *ankA*, *msp4* et *groEL*. Chaque point représente un génotype. Chaque liaison indique la présence des deux génotypes dans un même individu. L'épaisseur des liaisons est proportionnelle aux nombres d'échantillons présentant cette association de génotype. Chaque communauté de génotypes les plus fréquemment associées dans les échantillons est représentée par une couleur différente.

2.3 Discussion

Le séquençage des génotypes d'*A. phagocytophilum*, par la méthode de séquençage haut-débit, nous a permis d'identifier un grand nombre de variants circulant chez les chevreuils et les tiques sur le site des Vallons de Gascogne. Nous observons une plus grande diversité de génotypes et de plus forts taux de co-infections chez les nymphes que chez les chevreuils. Notamment sur *msp4*, les nymphes sont co-infectées en moyenne par 3 génotypes contre seulement 1,3 génotypes chez les chevreuils échantillonnés sur le même site. Un taux plus faible de co-infection était pourtant attendu chez les nymphes. En effet, sachant qu'il n'y a pas de transmission transovarienne chez *I. ricinus*, et que toutes les tiques étudiées sont des nymphes à l'affût, l'acquisition de la bactérie n'a pu se faire que lors du repas sanguin effectué au stade larvaire sur un seul hôte. Les co-infections observées chez les nymphes devraient donc être le reflet des co-infections chez l'hôte sur lequel la larve s'est nourrie. De

plus, un plus grand nombre de co-infections et de diversité était attendu chez les chevreuils que chez les nymphes, du fait du grand nombre de tiques portées par les chevreuils au cours de l'année (estimé à près de 600 tiques lors de la saison est estivale, Kiffner, Lödige et al. 2010). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le taux de co-infection et la diversité plus élevée chez les nymphes que chez les chevreuils.

La diversité génétique d'*A. phagocytophilum* plus élevée chez les nymphes que chez les chevreuils, peut être expliquée par le fait que les génotypes trouvés chez les tiques proviendraient d'hôtes réservoirs différents des chevreuils. Cela suppose que nous avons étudié des nymphes à l'affût qui se seraient gorgées sur d'autres hôtes. La préférence trophique liée au stade de développement pourrait également expliquer cette différence de diversité (les larves sont moins susceptibles de se gorger sur des chevreuils que les nymphes, Talleklint and Jaenson 1997), de même que l'existence de communautés de tiques présentant une préférence d'hôte, Kempf, De Meeus et al. 2011). L'existence d'autres hôtes réservoirs que le chevreuil est renforcée par le fait que la majorité des génotypes identifiés dans les nymphes ne présentent pas d'association avec ceux des chevreuils. La majorité des génotypes portés par les nymphes sont proches de ceux décrits chez les animaux domestiques. Peu de chevreuils portent des génotypes portés par les animaux domestiques (groupe I et IV d'*ankA*). Ces observations suggèrent donc qu'un (ou plusieurs) hôte(s) réservoir(s), différent des chevreuils, maintient la bactérie sur le site des Vallons de Gascogne. Sur ce site, l'étude de prévalence menée sur les rongeurs n'a révélé aucun individu positif à *A. phagocytophilum* en détection par qPCR. Des études de détections devront être menées sur d'autres espèces, tel que le hérisson et le lièvre, voire sur les animaux domestiques (qui pourraient être réservoir, comme nous l'avons expliqué précédemment) afin de déterminer l'hôte réservoir des souches non identifiées chez le chevreuil.

Une autre hypothèse pouvant expliquer la différence de diversité, mais aussi de taux de co-infection entre tiques et chevreuils, est une différence de sensibilité de détection. En effet, pour le chevreuil, les génotypes ont été détectés dans le sang uniquement, alors qu'ils ont été détectés dans l'ensemble de l'organisme de la tique. La probabilité de détection pourrait donc être plus faible chez le chevreuil.

Les différences de niveau de co-infection pourraient également être expliquées par trois hypothèses. Tout d'abord, le fait que le principal vertébré réservoir des génotypes portés par les nymphes (différent du chevreuil) soit lui-même co-infecté par de nombreux génotypes.

Ensuite, le co-feeding pourrait expliquer les différences de co-infection entre les tiques et les chevreuils (Ogden, Casey et al. 2002). En effet, si la larve s'est nourrie à proximité de nymphes ou d'adultes infectées par divers génotypes, celle-ci a pu acquérir plusieurs génotypes par co-feeding sans que l'hôte n'en soit porteur. Cependant, le co-feeding n'explique pas la différence de diversité génétique.

Enfin, deux facteurs peuvent limiter la co-infection et la diversité chez les chevreuils : la compétition entre souches (Stuen, Dahl et al. 2005) ou l'élimination de souches par le système immunitaire. Sur les deux sites, la plus grande partie des chevreuils ne portent qu'un seul génotype, à l'exception de quelques individus des Vallons de Gascogne dans lesquels nous retrouvons plus de sept génotypes d'*ankA* et de *mSP4*. En considérant que les chevreuils ont la même probabilité de contact avec l'ensemble des souches identifiées chez les tiques, l'absence de certains génotypes chez les chevreuils tend à confirmer que leur système immunitaire joue un rôle important dans le contrôle de l'infection. La durée d'infection du chevreuil par une souche et l'efficacité de leur système immunitaire pour éliminer *A. phagocytophilum* n'est pas connue. Les fortes prévalences observées dans les populations de chevreuils pourraient laisser penser que la bactérie perdure dans cette espèce. Cependant, lors de la seconde capture de chevreuils sur le site des Vallons de Gascogne, 5 chevreuils échantillonnés l'année précédente ont été recapturés. Parmi ces chevreuils, trois étaient positifs lors des deux prélèvements, et deux ont changé de statut (un est devenu positif et l'autre négatif). Les génotypes portés par les chevreuils infectés lors des deux prélèvements ne présentaient pas de similitude. Les fortes prévalences chez les chevreuils et la longue durée d'infection apparente semblent donc expliquées par la récurrence d'infection, due à la fréquence des contacts avec les tiques, plutôt que par la persistance des souches dans les chevreuils.

Nous n'observons pas de différence en terme de diversité génétique entre le site des Vallons de Gascogne et de Gardouch. La prévalence était plus forte dans les Vallons de Gascogne qu'à Gardouch (77% contre 32%), cependant les chevreuils présents dans l'élevage de Gardouch répartis dans plusieurs enclos. Seuls les chevreuils présents dans le grand enclos sont infectés. Rapportée au nombre d'individus échantillonnés dans cet enclos, la prévalence était de 78% en 2012. Les chevreuils de Gardouch sont en surpopulation dans un espace clos infesté de tiques. Cette situation favorisant les contacts entre les tiques et les chevreuils, devrait faciliter la propagation des bactéries transmises par les tiques. A l'opposé, sur le site des Vallons de Gascogne les chevreuils sont dispersés sur un plus vaste territoire, ce qui aurait

pu limiter la prévalence d'*A. phagocytophilum* mais également augmenter la diversité par l'apport de nouvelles souches liées à la migration d'individus. Une prévalence plus forte était donc attendue à Gardouch, avec une différence de diversité de génotypes avec le site des Vallons de Gascogne. Or, nous n'observons pas de différence. Les chevreuils de Gardouch sont le plus souvent associés dans une même communauté sur les réseaux d'associations d'individus, mais ils ne sont pas dissociés des chevreuils des Vallons de Gascogne. Les génotypes d'*A. phagocytophilum* identifiés chez les chevreuils dans cette étude ne semblent donc pas présenter une structuration géographique comme on pouvait l'attendre.

Bilan

Le séquençage haut-débit a mis en évidence la présence de nombreuses co-infections chez les nymphes et les chevreuils. Sur le site des Vallons de Gascogne, une grande partie des génotypes d'*A. phagocytophilum* identifiés chez les tiques n'a pas été retrouvée chez les chevreuils. Sur ce même site, nous n'avons trouvé aucun rongeur positif. Les nymphes semblent donc s'infecter sur un autre hôte réservoir que nous n'avons pas encore identifié.

3 Recherche des vecteurs potentiels lorsque *I. ricinus* est absente dans une zone d'endémie : la Camargue

Comme nous venons de le présenter, pour caractériser le cycle d'*A. phagocytophilum* dans une zone d'endémie, lorsque *I. ricinus* est présente, nous recherchons les génotypes de la bactérie dans les tiques et les réservoirs potentiels. Mais lorsque *I. ricinus* est absente, il est nécessaire d'identifier quelles espèces vectorisent la bactérie avant de rechercher les hôtes réservoirs. En effet, les hôtes réservoirs de la bactérie sont également des hôtes pour les tiques. Grâce à la connaissance de l'espèce vectrice, la recherche de l'hôte réservoir peut être restreinte compte tenu des préférences trophiques de la tique. De plus, l'identification du vecteur est essentielle car son cycle de vie et sa biologie impactent le cycle de la bactérie. Par exemple, chez la tique *D. albipictus*, il existe une transmission transovarienne d'*A. phagocytophilum*. Cette tique peut donc maintenir la bactérie dans l'écosystème sans que la présence d'un hôte réservoir soit nécessaire. Dans ce cas, les actions de lutte contre la bactérie focalisées sur les hôtes n'auront aucun effet.

La Camargue est considérée comme une zone d'endémie d'*A. phagocytophilum*. Les suivis sérologiques menés sur les chevaux dans cette région montrent qu'environ 10% des individus sont séropositifs pour *A. phagocytophilum* (Leblond, Tilliette et al. 2009). La Camargue présente un biotope favorable aux tiques, mais pas à *I. ricinus* qui est très rare en zone méditerranéenne (Figure 21). Nous avons donc cherché quelles espèces de tiques étaient porteuses de la bactérie et pouvaient contribuer à la propagation d'*A. phagocytophilum* chez les chevaux en Camargue. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « Emerging Infectious Diseases » en 2013 (article en annexe 1).

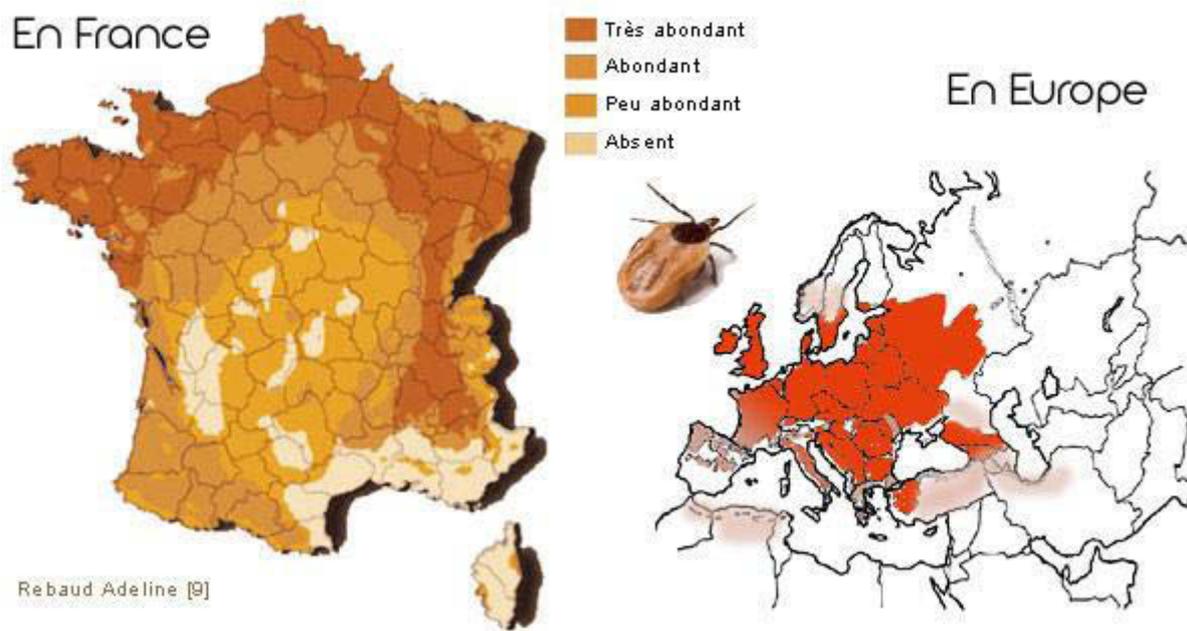


Figure 21 : Carte de répartition des *Ixodes ricinus* en France et en Europe. Collie-online 2011

3.1 Echantillonnage

Pour déterminer quelles espèces de tiques peuvent infecter les chevaux, nous avons détecté *A. phagocytophilum* chez des tiques échantillonnées sur les chevaux et dans leur environnement. Nous avons également recherché la présence d'ADN bactérien dans le sang des chevaux.

Trois échantillonnages ont été menés entre 2007 et 2010 (Figure 22). Une base de données listant les écuries présentes dans la zone d'étude avait été créée lors des enquêtes sérologiques menées en 2002 sur les populations équinées de Camargue. De cette base de données, nous avons choisi au hasard 84 écuries en 2007, 72 en 2008 et 19 en 2010. Dans chacune de ces écuries, un échantillon de sang sur EDTA a été prélevé sur chaque cheval, ainsi que les tiques en gorgement. En parallèle, en 2008 et 2010, un échantillonnage de tiques présentes à l'affût dans les pâtures a été effectué sur 19 pâtures. En 2008, un sous-ensemble de 19 pâtures a été choisi au hasard parmi les écuries ayant au moins un cheval séropositif pour *A. phagocytophilum*. En 2010, l'échantillonnage a été réalisé sur les pâtures associées aux 19 écuries étudiées. Ces échantillonnages ont été réalisés au printemps (en mai et juin) qui est la période jugée la plus favorable pour l'activité d'*I. ricinus*, et par la méthode du drapeau. Pour chaque pâture, deux zones ont été échantillonnées : la zone de repos des chevaux et la zone d'abreuvement et d'alimentation. Les tiques ont été conservées dans l'alcool à 70°, et le sang des chevaux a été stocké au congélateur à -20°C jusqu'à analyse.

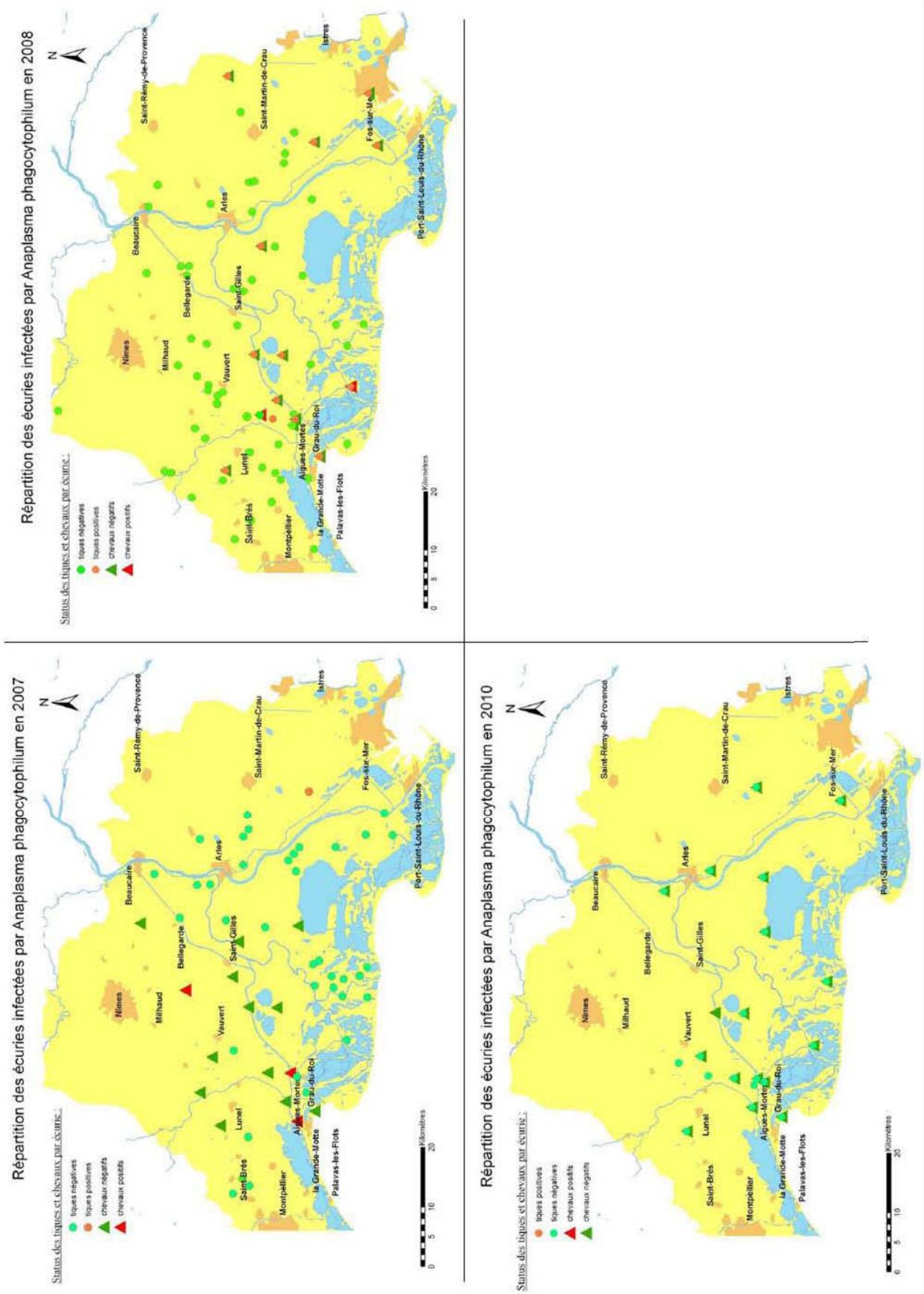


Figure 22 : Carte de répartition des écuries et pâture échantillonnées en Camargue

3.2 Détection et de caractérisation des géotypes d'*A. phagocytophilum*

3.2.1 Identification des tiques

Une première identification du stade (adulte, nymphe ou larve) et de l'espèce a été faite sur les critères morphologiques. Une vérification de la taxonomie a ensuite été réalisée par le séquençage de l'ADNr 12S de chaque tique, et le remplacement des séquences sur l'arbre phylogénétique des *Rhipicephalinae*.

3.2.2 Extraction de l'ADN et détection d'*A. phagocytophilum*

Les tiques ont d'abord été broyées après une rigidification des tissus en milieu azote liquide, puis l'ADN total a été extrait à l'aide du kit «DNeasy Tissue » (Qiagen, Venlo, Netherlands). Les ADN contenus dans les échantillons de sang total des chevaux ont quant à eux été extraits à l'aide du kit « NucleoSpin Blood QuickPure » (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

La détection d'*A. phagocytophilum* a été effectuée par PCR nichée ciblant l'ADNr 16S selon le protocole de Massung (1998). Pour la première réaction, 100 ng d'ADN purifié sont utilisés dans un volume total de réaction de 25 µl, contenant 50µM de chaque déoxynucléoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, et dTTP), 1U de Taq polymérase Qiagen, 2,5µl de tampon 10X et 0,8 µM de chaque amorce ge3a (5' – CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC - 3') et ge10r (5'- TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC - 3'). L'amplification se déroule en 40 cycles. Un premier cycle de dénaturation de 8 min à 95°C, puis chaque cycle commence par 30 s de dénaturation, 30 s d'hybridation à 55°C et 1 min d'élongation à 72°C. Le dernier cycle permettant l'élongation finale est fait à 72°C pendant 5min. Pour la seconde réaction, 5 µl d'amplification de la première réaction est utilisée dans un volume total de réaction de 25 µl, dans les mêmes conditions que la première mais avec les amorces ge9f (5'- AACGGATT ATTCTTTATAGCTTGCT -3') et ge2 (5'- GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG - 3'). Les produits de la deuxième PCR sont déposés sur gel d'agarose à 2% et la révélation de la présence de la bactérie est effectuée par électrophorèse.

3.2.3 Caractérisation des géotypes

Les géotypes d'*A. phagocytophilum* présents dans les échantillons de Camargue ont été séquençés sur six loci : *msp4*, *ankA*, *pleD*, *typA*, et les régions intergéniques entre *APH_1099-*

CtrA et *HemE- APH_0021*. Chaque locus a été amplifié par PCR nichée. Pour la première PCR, chaque réaction contenait 40 ng d'ADN total dans une solution de 25 µl avec 1 U de Taq polymérase (Qiagen), 2 µl de chaque amorce à 10 µM, 2 µl de dNTP à 25 mM, 5 µl de Q solution (Qiagen) et 1 µl de MgCl² à 25 mM. Des essais ont été effectués pour choisir des températures d'hybridation optimales. Le programme de PCR débutait par une étape de dénaturation initiale de 3 min à 95 ° C, puis 40 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 s à 94 ° C, une étape d'hybridation de 30 s à la température correspondant au gène cible (voir annexe 1) et une étape d'extension de 90 s à 72 ° C. Une dernière étape d'extension de 10 min à 72 ° C a été réalisée à la fin des 40 cycles. La PCR nichée a été réalisée avec 5 µl du premier produit de PCR dans un volume total de 50 µl contenant 2 U de Taq polymérase, 4 µl de chaque amorce à 10 µM et 4 µl de dNTP à 25 mM. Le programme utilisé pour la PCR nichée était le même que pour la première PCR.

3.3 Résultats

Au total 1448 chevaux et 406 tiques ont été échantillonnés sur les trois années (2007, 2008 et 2010). Parmi les tiques récoltées, 6 espèces ont été identifiées : *Rhipicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *R. pusillus*, *Dermacentor marginatus* et *Hyalomma marginatum*. Les deux espèces dominantes sont *R. bursa* et *R. sanguineus*. (Tableau 3). Toutes les tiques étaient au stade adulte et aucune *I. ricinus* n'a été trouvée.

Sur l'ensemble des années, plus de *R. bursa* ont été trouvées sur les chevaux que de *R. sanguineus* ($\chi^2 = 60.35$, $df = 1$, $p\text{-value} = 7.94e^{-15}$). A l'inverse, les *R. sanguineus* sont significativement plus fréquents sur les pâtures que les *R. bursa* ($\chi^2 = 10.169$, $df = 1$, $p\text{-value} = 1.428 e^{-3}$). Ces observations sont valables pour chaque année, sauf en 2010, où aucune différence significative entre les deux espèces n'est visible.

Tableau 3 : Nombre de tiques récoltées sur les chevaux et les pâtures en 2007, 2008 et 2010

Espèce tique	2007		2008		2010		Total		
	Pâtures -	Chevaux (n = 643)	Pâtures (n = 19)	Chevaux (n = 700)	Pâtures (n = 12)	Chevaux (n = 105)	Pâtures (n = 31)	Chevaux (n = 1448)	Total
<i>R. bursa</i>	-	92	6	141	6	14	12	247	259
<i>R. sanguineus</i>	-	8	33	26	20	24	53	58	111
<i>R. turanicus</i>	-	2	2	1	2	2	4	5	9
<i>R. pusillus</i>	-	1	4	0	5	0	9	1	10
<i>D. marginatus</i>	-	1	3	8	0	0	3	9	12
<i>H. marginatum</i>	-	1	0	3	0	1	0	5	5
Total	-	105	48	179	33	41	81	325	406

La détection a permis d'identifier 40 tiques (Tableau 4) et 6 chevaux positifs à *A. phagocytophilum* (3/158 en 2007, 3/166 en 2008 et 0/84 en 2010). Les prévalences d'infection sont très variables entre les années. Par exemple en 2010, aucune tique récoltée n'est infectée, alors qu'en 2008 28,6 % des *R. sanguineus* étaient infectés.

Tableau 4 : Nombre et pourcentage de tiques positives à *A. phagocytophilum* collectée entre 2007 et 2010 en Camargue.

Espèce de tique	Nombre de tiques positives / nombre de tiques analysées (% de positives)					
	Tiques à l'affût sur pâtures		Tiques en gorgement sur les chevaux		Total	
<i>Rhipicephalus bursa</i>	3 / 12	(25)	19 / 247	(7.7)	22 / 259	(8.5)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	11 / 53	(20.7)	2 / 58	(3.4)	13 / 111	(11.7)
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	2 / 4	(50)	0 / 5	(0)	2 / 9	(22.2)
<i>Rhipicephalus pusillus</i>	0 / 9	(0)	0 / 1	(0)	0 / 10	(0)
<i>Dermacentor marginatus</i>	1 / 3	(33.3)	1 / 9	(11.1)	2 / 12	(16.7)
<i>Hyalomma marginatum</i>	0 / 0	(0)	1 / 5	(20)	1 / 5	(20)

La caractérisation des génotypes circulant chez les chevaux n'a pas pu être effectuée, car les PCR n'ont pas permis d'amplifier assez d'ADN pour le séquençage. Chez les 40 tiques

positives un seul génotype a été identifié. Ce génotype était phylogénétiquement très proche de la souche humaine américaine HZ (Figure 23).

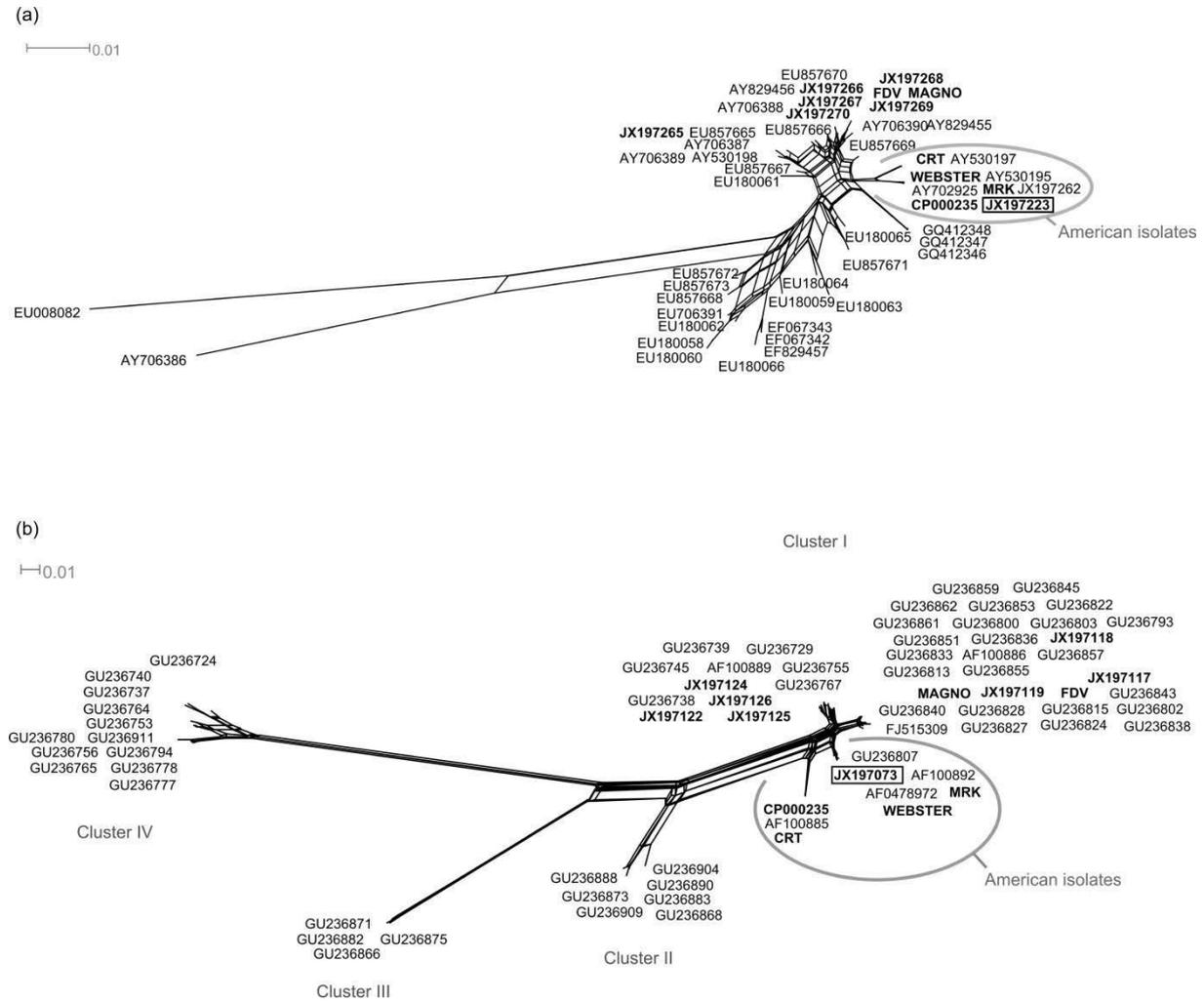


Figure 23 : Réseaux phylogénétiques d'*A. phagocytophilum* basées sur les gènes *msp4* (a) et *ankA* (b), construit avec le logiciel SplitsTree4 (version 4.11.3) par la méthode du NeighborNet. Les génotypes issus d'individus présents dans les deux réseaux sont écrits en gras. Les séquences d'*A. phagocytophilum* amplifié chez les tiques de Camargue sont encadrées. Les séquences porteuses de numéros JX197116 à JX197126 et JX197265 à JX197270 sont issues de tiques échantillonnées dans les Combrailles (Auvergne).

3.4 Discussion

La plupart des études menées en Europe s'intéressent à la prévalence d'*A. phagocytophilum* chez les *Ixodes sp.* et aux hôtes sur lesquels ils se nourrissent, car les *Ixodes sp.* sont considérées comme les principaux vecteurs de la bactérie. Or en zone méditerranéenne les *Ixodes sp.* sont rares voir absentes, pourtant *A. phagocytophilum* a été identifiée chez plusieurs hôtes domestiques et sauvages (De La Fuente, Torina et al. 2005; De La Fuente, Ruiz-Fons et al. 2008; Torina, Alongi et al. 2008).

En Camargue nous avons identifié 5 espèces de tiques positives à *A. phagocytophilum* : *Rhipicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Dermacentor marginatus* et *Hyalomma sp.* En région méditerranéenne, les espèces *Hy. m. marginatum*, *R. bursa* and *D. marginatus* sont suspectées d'avoir le plus fort potentiel pour être vectrices des anaplasmes, car ce sont les espèces les plus abondantes sur les ongulés sauvages (De La Fuente, Ruiz-Fons et al. 2008). Dans notre échantillonnage *R. bursa* et *R. sanguineus* sont les plus abondantes dans l'environnement des chevaux. Leur abondance et les prévalences moyennes observées suggèrent qu'elles sont impliquées dans le cycle d'*A. phagocytophilum* qui infecte les chevaux. Cependant, leur compétence vectorielle reste à tester pour vérifier leur implication.

La caractérisation génétique a permis d'identifier un seul génotype circulant chez les tiques, alors que l'échantillonnage comportait 40 tiques positives appartenant à différentes espèces et dispersées sur plus de 250 km². Ce génotype est plus proche des génotypes décrits aux Etats-Unis qu'en Europe. Des génotypes similaires ont été identifiés chez des chevaux et des chiens en Sardaigne avec le gène *groESL* (Alberti, Zobba et al. 2005) et chez l'âne en Sicile sur le gène *msp4* (De La Fuente, Torina et al. 2005). Le génotype que nous avons identifié n'est pas spécifique à une espèce de tique. La présence d'un seul génotype en Camargue, différent de tous ceux identifiés dans le reste de la France, peut être expliquée par deux hypothèses : soit il s'agit d'une introduction récente d'un génotype américain en méditerranée comme le suggère Alberti et al (2005), soit l'hôte réservoir de la bactérie est une espèce vertébrée inféodée à l'écosystème méditerranéen.

DISCUSSION GENERALE

Les études de caractérisation d'*A. phagocytophilum*, menées depuis 1996 à partir de séquençage ADN, ont mis en évidence une grande diversité génétique chez cette bactérie sans en connaître l'origine (Engvall, Pettersson et al. 1996). De récentes études ont démontré que cette diversité génétique était liée à l'exploitation d'hôtes et de vecteurs différents, se traduisant par une différenciation des cycles épidémiologiques de la bactérie (Foley, Nieto et al. 2008a; Rejmanek, Bradburd et al. 2012). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* pour identifier 1) les génotypes circulant chez les animaux domestiques qui présentent des symptômes cliniques, 2) les réservoirs potentiels de la bactérie et 3) les vecteurs potentiels, le tout pour mieux comprendre quels sont les cycles de la bactérie afin de mieux prévenir et contrôler la maladie.

Synthèse des résultats

Dans l'ensemble de notre échantillonnage (animaux domestiques, chevreuils, rongeurs et tiques) nous avons obtenu une grande diversité de génotypes. Chez les bovins présentant des symptômes d'anaplasmose granulocytaire, nous avons distingué 3 groupes de génotypes laissant penser qu'ils sont impliqués dans plusieurs cycles épidémiologiques. Un des groupes contient des génotypes retrouvés fréquemment chez les chevreuils, mais ces génotypes n'infectent qu'une minorité de bovins (seulement 2% de notre échantillonnage). La majorité des génotypes provoquant des symptômes chez les bovins se répartissent dans les deux autres groupes de génotypes. Ces génotypes sont très rarement retrouvés avec les chevreuils ; l'implication des chevreuils dans la propagation des génotypes infectant les bovins semble donc restreinte. Un des groupes contient les génotypes issus des échantillons de chevaux et de chiens symptomatiques, ainsi que les génotypes décrits chez l'homme en Europe. Ce groupe présente donc un fort potentiel zoonotique. Nous n'avons pas non plus identifié de réservoir pour ce groupe.

Nous avons évalué l'implication des rongeurs dans ces cycles, en étudiant dans un premier temps la prévalence d'*A. phagocytophilum* chez les mulots (*Apodemus sp.*) et le campagnol (*Myodes glareolus*). Les prévalences observées suggèrent que la bactérie circule bien chez ces espèces. Cependant, sur le site des vallons de Gascogne, où plus de 70% des chevreuils ont été détectés positifs à *A. phagocytophilum*, aucun rongeur n'était infecté. Cette observation tend à indiquer que les mulots et les campagnols ne participent pas aux mêmes cycles épidémiologiques que les chevreuils. Nous avons réussi à obtenir un séquençage partiel des

loci *msp4*, *typA* et *groEL* à partir de quelques rongeurs positifs. Nous avons retrouvé un génotype décrit exclusivement chez les campagnols et deux génotypes identifiés auparavant chez les bovins. Le séquençage de ces deux génotypes ayant fonctionné sur seulement trois gènes, nous ne sommes pas en mesure de déterminer dans quel groupe génétique se situent les génotypes de rongeurs, parmi les deux principaux groupes décrits par MLSA chez les bovins. La prévalence de ces génotypes reste à déterminer chez les mulots et les campagnols. Une forte prévalence permettrait de prouver que ces espèces sont des hôtes réservoirs pour les génotypes d'*A. phagocytophilum* pathogènes pour les bovins, mais si la prévalence est très faible il pourrait s'agir seulement d'un effet de *spill-over*.

L'étude menée sur le site des Vallons de Gascogne a mis en évidence une plus grande diversité de souches chez les tiques que chez les chevreuils. Ce différentiel et l'absence de micromammifères positifs à *A. phagocytophilum* suggère qu'un hôte réservoir différent des chevreuils et des rongeurs maintient la bactérie sur le site. Parmi les espèces sauvages, les sangliers, les hérissons et les lièvres sont porteurs de la bactérie et pourraient être des hôtes réservoirs (Stuen, Granquist et al. 2013). Parmi les espèces domestiques, le mouton et la chèvre sont décrits comme des hôtes réservoirs mais ils n'étaient pas présents dans nos zones d'études. L'implication des bovins dans le maintien du cycle n'a pas été testée, mais la présence d'ADN d'*A. phagocytophilum* chez des bovins ne présentant pas de symptômes laisse penser que des porteurs sains sont présents dans les populations bovines. Les bovins pourraient alors être des hôtes réservoirs au même titre que les moutons.

A partir de l'ensemble des données présentées ci-dessus, nous pouvons proposer les cycles Figure 24.

Il reste beaucoup d'incertitudes concernant les cycles et la contribution des différentes espèces d'hôtes. Nous proposons à présent de voir quelles améliorations nous pouvons apporter aux recherches menées sur *A. phagocytophilum* pour améliorer nos connaissances sur les cycles. Nous aborderons d'abord comment améliorer la stratégie d'échantillonnage, puis comment optimiser la caractérisation des génotypes. Ensuite, nous ferons un point sur les problèmes liés à la co-infection. Enfin, nous verrons quelles sont les moyens de prévention et de lutte pouvant être mis en place pour contrôler la dispersion de l'anaplasmoose granulocytaire et pourquoi la caractérisation des cycles est importante pour aider dans cette démarche.

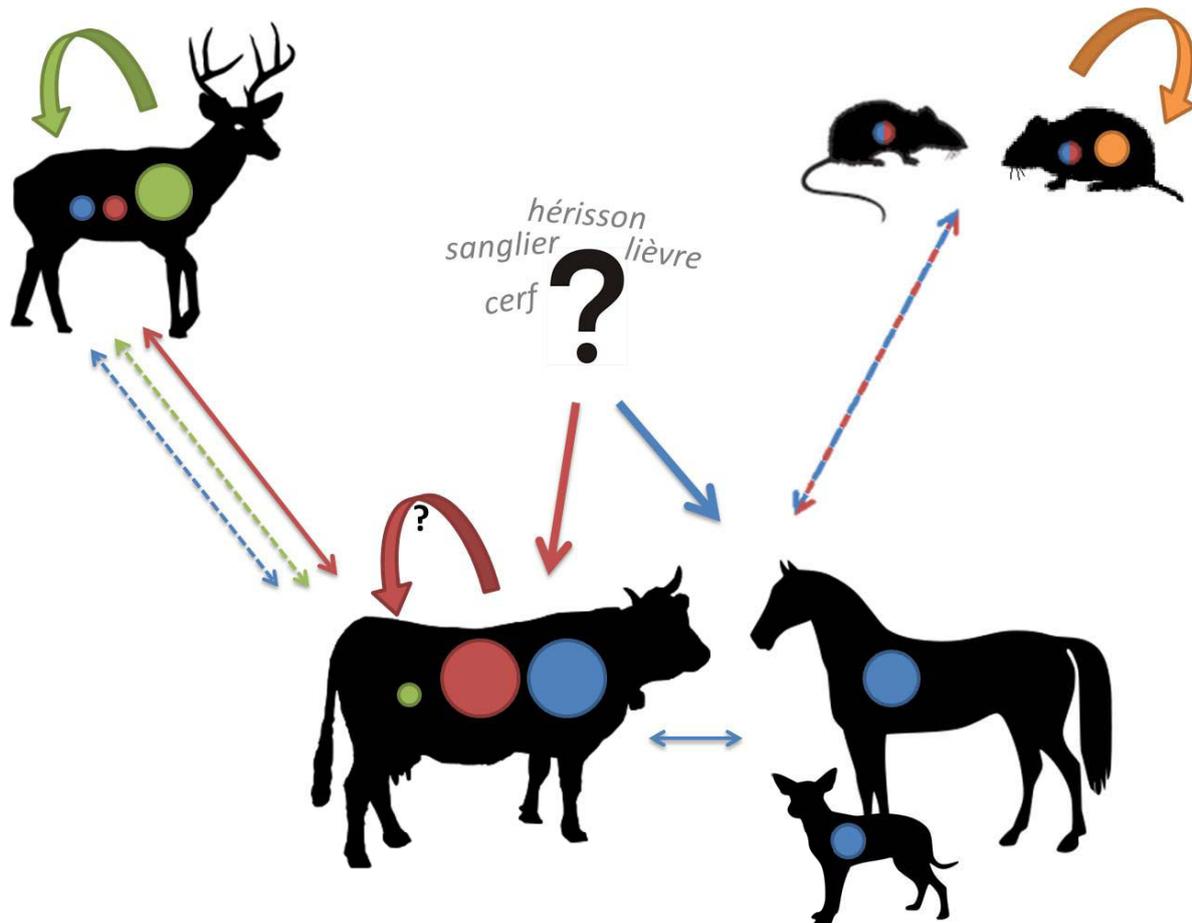


Figure 24 : Représentation des cycles épidémiologiques hypothétiques d'*A. phagocytophilum* déterminés à partir des données de notre étude. Chaque rond coloré représente un groupe de génotypes. Un rond de deux couleurs a été employé pour les rongeurs car le génotypage n'a pas permis de discriminer totalement à quel groupe appartenaient les génotypes séquencés. La taille des ronds est relative aux nombres d'individus porteurs du génotype par espèce. Les flèches indiquent que des échanges entre les espèces sont possibles, en pointillé lorsque les échanges semblent rares. Les échanges se font exclusivement par l'intermédiaire des tiques qui ne sont pas représentées sur ce schéma.

Améliorer la stratégie d'échantillonnage

Malgré l'ensemble des informations apportées par notre étude, il reste beaucoup de zones d'ombre concernant le cycle d'*A. phagocytophilum*. Les premières limites à la compréhension des cycles concernent l'échantillonnage. Dans l'idéal, il serait nécessaire de caractériser tous les génotypes circulant dans l'ensemble d'un écosystème spatialement clos (où l'apport de la bactérie par des individus externes n'est pas possible). Pour ce faire, il faudrait dans un premier temps capturer toutes les espèces susceptibles d'être infectées par les tiques dans cet écosystème, puis déterminer lesquelles sont porteuses de la bactérie et quels génotypes elles portent. Cet échantillonnage est difficilement réalisable, c'est pourquoi la plupart des recherches sont généralement centrées sur le vecteur ou sur quelques hôtes qui sont le plus en contact avec ce dernier.

Dans notre échantillonnage, nous souhaitons nous focaliser d'abord sur les animaux domestiques présentant des signes cliniques, car ce sont ces espèces que nous souhaitons protéger en priorité. Cette stratégie nous a permis de collecter un grand nombre d'échantillons dispersés sur l'ensemble de la France métropolitaine. Cependant nous avons rencontré deux problèmes : les échantillons ne sont pas répartis de façon homogène sur le territoire, et il nous a été impossible d'obtenir assez d'échantillons dans une même zone pour comparer la diversité des génotypes intra-zone. Actuellement, l'incidence réelle de la maladie chez les animaux domestiques n'est pas connue. Des cas d'anaplasmose granulocytaire ont été déclarés dans toutes les régions de France métropolitaine, mais l'absence de symptômes spécifiques liés à cette maladie fait que la prévalence de la bactérie reste largement sous-diagnostiquée. C'est pourquoi, nous supposons que la répartition de notre échantillonnage, notamment celle des bovins, n'est pas représentative de la répartition réelle de la bactérie sur le territoire français, mais est plutôt représentative de la sensibilisation des vétérinaires à l'anaplasmose granulocytaire dans certaines régions.

Pour progresser dans la compréhension des cycles d'*A. phagocytophilum*, une meilleure détection et l'évaluation de la durée de transmissibilité de la bactérie par les hôtes est nécessaire. En effet, chez les animaux domestiques la détection se limite aux porteurs symptomatiques, qui reçoivent le plus souvent un traitement antibiotique pour éliminer la bactérie. Ces animaux représentent donc une impasse pour le cycle épidémiologique de la bactérie, au contraire des porteurs sains qui ne sont pas pris en compte dans les études et qui représentent pourtant un fort potentiel en tant qu'hôte réservoir. Il est donc nécessaire de détecter tous les porteurs de la bactérie, même les animaux non symptomatiques, et d'évaluer leur contribution dans la transmission de la bactérie aux tiques. Le choix des espèces et des individus à échantillonner est important, de même que la nature du tissu sur lequel la détection est effectuée. Le tissu le plus souvent utilisé est le sang car son échantillonnage est non invasif. Or, les études menées sur le mouton montrent que la bactérie peut rester dans les organes internes jusqu'à sa remise en circulation activée par les morsures de tiques, sans être détectable dans le sang (Stuen, Casey et al. 2006). Dans ces conditions, seule la xénodiagnose permet de déterminer de façon non invasive la contribution des individus au maintien du cycle d'*A. phagocytophilum*, mais cette technique est difficile à mettre en place sur des animaux de grande taille et hors des laboratoires. La biopsie de peau ou la prise de sang capillaire dans les zones d'attachement des tiques pourraient être des moyens alternatifs à la xénodiagnose, puisque les neutrophiles infectés se déplacent vers les sites de morsures de tiques. Enfin, la

durée de transmissibilité est également un point clé pour la compréhension des cycles, car quelle que soit l'espèce, le nombre de tiques qui acquièrent la bactérie et contribuent à la continuité du cycle dépend de la durée pendant laquelle la bactériémie est suffisante pour que la transmission à la tique soit efficace. Par exemple, au Nord du Pays de Galles, dans les pâtures de moutons naturellement infectés par *A. phagocytophilum*, seulement 1,5% des nymphes à l'affût sont infectées par la bactérie alors que tous les moutons sont infectés. De plus, les moutons infectés transmettent la bactérie à plus de 60% des larves pendant la phase d'infection aiguë (Ogden, Casey et al. 2003). En absence d'autres hôtes pour les tiques, le faible taux d'infection observée chez les tiques à l'affût est expliqué par la courte durée des phases d'infection aiguë chez le mouton. La durée et le taux de transmission de l'hôte à la tique sont donc des facteurs importants pour déterminer la contribution d'un hôte au cycle bactérien. Pour comprendre la contribution des différentes espèces d'hôtes vertébrés présents dans l'écosystème, il serait donc nécessaire de mettre en place un suivi longitudinal de détection de la bactérie chez les hôtes, couplé à une étude de transmission par xénodiagnose.

Dans le cas d'une bactérie qui utilise un large spectre d'hôtes comme *A. phagocytophilum*, l'échantillonnage de toutes les espèces vertébrées porteuses de la bactérie est très souvent irréaliste. Pour réduire l'échantillonnage, il est possible de focaliser les recherches sur le vecteur. En effet, le cycle de la bactérie est fortement lié au cycle de vie de son vecteur. La diversité des génotypes pourrait être expliquée par la différence de vecteur autant que par la différence d'hôte réservoir. Une bonne connaissance des espèces vectrices et de leur écologie est essentielle pour lutter contre la dispersion de la bactérie. Comme nous l'avons montré en Camargue, *I. ricinus* n'est pas la seule espèce porteuse d'*A. phagocytophilum* en France. D'autres espèces de tiques, telle que les *Rhipicephalus sp.* et *Dermacentor marginatus*, sont également infectées par la bactérie. La compétence vectorielle de ces espèces pour *A. phagocytophilum* n'est pas connue, ni leur capacité à maintenir la bactérie par la transmission transovarienne. Ces paramètres nécessitent d'être testés, pour déterminer la contribution de ces espèces en tant que vecteur et/ou réservoir. L'étude du vecteur permet également d'identifier les hôtes réservoirs potentiels de façon indirecte, par la connaissance de ses préférences d'hôte et par l'étude de son repas sanguin. Des outils sont actuellement développés pour rechercher et identifier dans la tique des résidus d'ADN provenant de l'hôte sur lequel elle s'est nourrie (Kent 2009). Les premiers résultats montrent que l'analyse des repas sanguins couplée à la détection d'agents pathogènes pourrait permettre d'identifier indirectement les hôtes réservoirs sans les échantillonner (Wodecka, Rymaszewska et al.

2014). Cependant, ces outils (PCR-RFLP, RLBH ou rtPCR) sont très sensibles aux contaminations, l'efficacité et la fiabilité des résultats obtenus sont aujourd'hui controversées (Masségli and Vourc'h Submitted.).

Optimiser la caractérisation des géotypes

Après la détection, la caractérisation des géotypes d'*A. phagocytophilum* circulant chez les différentes espèces est nécessaire pour déterminer les cycles. Le géotypage ne permet pas d'identifier directement quelle espèce est la source de l'infection mais il nous permet d'identifier les espèces porteuses de géotypes identiques. A partir de ces données et de nos connaissances en écologie et en épidémiologie, nous pouvons élaborer des hypothèses concernant les cycles. Pour *A. phagocytophilum*, le géotypage a mis en évidence la présence de plusieurs écotypes qui co-existent en utilisant des cycles distincts (Bown, Lambin et al. 2009). Cependant l'amplification de l'ADN d'*A. phagocytophilum* pose beaucoup de problèmes, du fait de la forte variabilité des géotypes, des faibles quantités d'ADN bactérien présent dans les échantillons, et des co-infections par plusieurs géotypes. Pour améliorer les amplifications nous avons testé plusieurs techniques, telles que la capture de gènes, l'amplification aléatoire de l'ADN total par MDA, ou la concentration des bactéries dans l'échantillon avant extraction par séparation des granulocytes du culot sanguin. Dans notre étude, notre choix s'est tourné vers l'utilisation du MDA. Cette technique nous a permis d'améliorer la quantité d'ADN amplifié par nos PCR dans les échantillons de tiques, de chevreuils et des animaux domestiques, mais pas dans les échantillons de rongeurs. Nous supposons que l'ADN des rongeurs interfère avec nos amorces de PCR. La capture de gènes, à l'aide de sondes spécifiques reliées à une bille magnétique, semble être une des solutions à privilégier pour contrer les difficultés que l'on rencontre pour l'amplification de l'ADN d'*A. phagocytophilum* dans les échantillons de rongeurs. La capture de gènes a montré son efficacité pour isoler un ADN cible dans le contexte de données environnementales complexes (Denonfoux, Parisot et al. 2013). Cette technique nécessite cependant beaucoup de mises au point et une bonne connaissance de la diversité génétique sur le locus ciblé, de ce fait nous n'avons pu l'utiliser dans notre étude. D'autres solutions pourront être envisagées comme l'utilisation d'hexamères spécifiques à *A. phagocytophilum* dans le MDA (Leichty and Brisson 2014), ou la mise en culture de la bactérie à partir des échantillons de sang infecté ou encore l'utilisation de la xénodiagnose pour amplifier l'ADN bactérien depuis la tique plutôt que depuis les échantillons d'hôte.

Une bonne connaissance de la diversité est importante pour bien détecter la bactérie et caractériser les génotypes. Par exemple, pour le gène *ankA*, des amorces spécifiques sont nécessaires pour amplifier les différents groupes de génotypes, car la divergence entre les groupes est trop grande. C'est pourquoi nous rencontrons encore beaucoup de difficultés à amplifier les génotypes du groupe *ankA II*, et que le groupe *ankA V* présent chez les rongeurs n'a été identifié qu'en 2013 (Majazki, Wuppenhorst et al. 2013). Nous avons choisi de caractériser la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* par l'utilisation d'un séquençage multi-loci. Cette technique de caractérisation basée sur plusieurs loci propose une vision plus proche de l'évolution générale de la bactérie que celle obtenue à partir de loci étudiés indépendamment les uns des autres. Elle permet également d'établir des relations entre génotypes plus robustes. Le choix des gènes pour notre étude a été basé sur la comparaison de la souche HZ (qui est la première souche d'*A. phagocytophilum* séquencée complètement et la seule disponible lors de la mise en place de notre schéma de MLSA) avec des souches d'*A. marginale* et *A. centrale*. En 2014, 7 nouvelles souches américaines ont été séquencées totalement et 11 souches américaines et européennes sont en projet de séquençage total. Les génomes déjà disponibles présentent plus de 6% de divergence (Figure 25). Le séquençage total est en plein développement et devient de plus en plus abordable en terme technique et financier. C'est un outil indispensable pour faire avancer les recherches fondamentales et déterminer la diversité génétique chez des espèces difficile à étudier. Cependant, pour l'identification en routine des génotypes il est nécessaire de continuer à développer des outils plus rapides, comme la MLST avec un nombre de gènes limités. La comparaison des différents génomes permettra de sélectionner des loci plus pertinents pour caractériser les différents génotypes, et de créer des amorces de PCR plus adaptées grâce à une meilleure connaissance de la diversité. Ces connaissances auraient pu dans notre cas faciliter la caractérisation des génotypes de rongeurs.

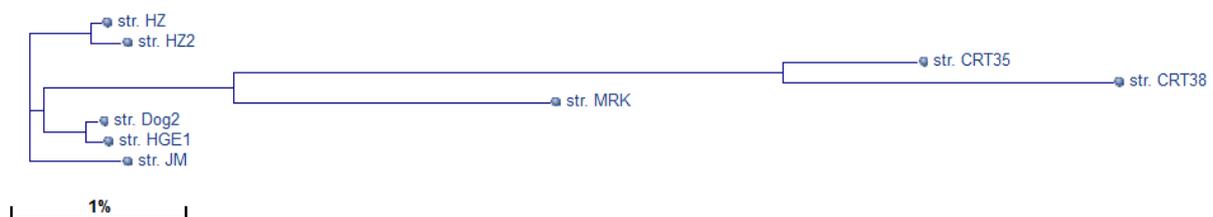


Figure 25 : Distance génétique entre les différentes souches d'*A. phagocytophilum* séquencées entièrement (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=anaplasma%20phagocytophilum>)

Dans notre étude, la MLSA s'est révélée être un bon outil pour différencier les génotypes malgré les données manquantes dues à une amplification partielle des génotypes. Pour étudier

ces relations, nous avons choisi d'analyser les séquences via la construction d'un super-arbre. Le super-arbre permet de faire face aux données manquantes, et tient compte des modèles évolutifs, qui diffèrent selon les loci. Chez les animaux domestiques, nous avons ainsi pu identifier trois grands groupes de génotypes qui n'étaient pas distinguables à l'échelle d'un loci. L'analyse de séquençage multi-loci est un bon compromis entre le séquençage de génome total et le séquençage d'un seul locus, cependant elle présente quelques limites. D'un point de vue pratique, le séquençage multi-loci nécessite une plus grande quantité de matériel biologique car il faut multiplier le nombre de PCR par le nombre de loci choisis. Et d'un point de vue technique, les échantillons co-infectés ne peuvent pas être pris en compte dans ce type d'analyse. En effet, en cas de co-infection par plusieurs génotypes, nous ne pouvons pas associer les différents génotypes identifiés sur un loci à ceux identifiés sur un autre loci.

La co-infection : problème technique et implications biologiques

La co-infection est un problème réel pour la caractérisation des pathogènes tels qu'*A. phagocytophilum*. Le séquençage haut-débit permet actuellement de visualiser la co-infection. Grâce à cette technique, nous avons identifié près de 60% des individus présentant plusieurs génotypes pour au moins un des loci étudiés, chez les chevreuils et les tiques sur le site des Vallons de Gascogne. Cependant, même si nous avons identifié les individus co-infectés, il reste impossible d'effectuer un génotypage correct. En effet, si un individu est infecté par deux souches différentes, deux allèles seront obtenus pour chaque locus étudié, et nous ne pourrons pas déterminer à quel souche appartient les différents allèles observés. Le séquençage de nouvelle génération permet de distinguer les différents génotypes sur un fragment d'ADN de taille restreinte. Lorsque les génotypes sont très divergents, et que des mutations sont présentes dans chaque fragment de séquençage, la reconstruction du génome total de chaque souche est envisageable. Pour *A. phagocytophilum*, le taux de divergence entre les souches est très faible, l'utilisation de cette technique semble donc compromise. De plus, comme nous en avons fait l'expérience avec le séquençage haut-débit 454, ces techniques peuvent introduire du polymorphisme par des erreurs de lecture. Ces erreurs peuvent être en partie éliminées par le regroupement de séquences en séquences consensus. Le taux de co-infection observé est donc variable selon la stringence choisie pour le regroupement des séquences. La caractérisation d'*A. phagocytophilum* par le séquençage lors de co-infection ne semble possible que si les souches sont séparées en amont. L'utilisation d'enzymes de restriction qui digèrent les hétéroduplexes, de type EcoRI, permet d'identifier rapidement les échantillons co-infectés (technique de l'*eco-tilling*) (Till, Zerr et al. 2006). Par

comparaison des profils alléliques avec des souches de références l'*eco-tilling* permet de typer les séquences présentes dans l'échantillon. Cependant ce type d'analyse nécessite beaucoup de manipulations et est difficile à utiliser en routine. L'identification des souches en co-infection est un problème qui nécessite d'être résolu techniquement, car l'impact biologique est important.

D'un point de vue biologique, il a été montré que la co-infection par plusieurs souches d'une même espèce influe sur les symptômes. Les co-infections peuvent provoquer des symptômes beaucoup plus sévères par rapport à une infection simple, par exemple, des cas des super-infections sont observés chez les patients atteints de plusieurs souches de VIH (Steain, Wang et al. 2005). Peu d'études expérimentales de co-infection ont été menées sur *A. phagocytophilum*. Une étude montre que l'injection de deux souches chez l'agneau n'engendre pas de différences d'expression symptomatologique, mais les deux souches entrent en compétition, et la souche la plus virulente élimine la seconde (Stuen, Bergström et al. 2003). Le fort taux de co-infection observé chez les chevreuils et les tiques tend à indiquer que la compétition entre les souches n'est pas une généralité. La co-infection peut présenter un avantage pour la bactérie, car elle favorise l'évolution des génotypes par la recombinaison. Chez *A. phagocytophilum*, la recombinaison est un facteur essentiel pour l'évolution des protéines membranaires, elle leur permet de s'adapter et de déjouer le système immunitaire de l'hôte (Rejmanek, Foley et al. 2012b). La co-infection pourrait ainsi être un des moteurs de l'adaptation des génotypes.

Quelles mesures de prévention et de lutte peuvent être mises en place pour contrôler la propagation de l'anaplasnose granulocytaire ?

Pour prévenir et lutter contre l'anaplasnose granulocytaire, une bonne connaissance des génotypes, des cycles et des facteurs de risque est nécessaire. La caractérisation génétique d'*A. phagocytophilum* apporte une meilleure connaissance de la bactérie et de sa variabilité génétique, ce qui permet à la fois de mieux détecter la bactérie et d'adapter les moyens de lutte. La relation entre la diversité des génotypes et la diversité des symptômes n'a pas encore été évaluée. Elle est difficile à établir à partir des données de terrain, car la sévérité de l'infection semble autant liée à la diversité génétique qu'à la présence d'infections secondaires provoquées par d'autres pathogènes (Stuen, Nevland et al. 2003). Actuellement, le seul moyen de lutte dont disposent les vétérinaires et médecins est le traitement par

antibiotiques qui est utilisé pour éliminer la bactérie chez les individus présentant des symptômes d'anaplasmose.

Une meilleure connaissance de la diversité génétique et des cycles bactériens, permettrait d'adapter les stratégies de prévention et de lutte. En effet, pour prévenir et lutter contre la propagation de la bactérie plusieurs stratégies peuvent être envisagées, telles que la mise en place d'actions sur les hôtes réservoir, sur les vecteurs ou sur les hôtes cibles (animaux domestiques). Tout d'abord, un vaccin basé sur la reconnaissance des protéines membranaires *mSP1* et *mSP5* est en cours de développement pour lutter contre l'anaplasmose bovine (Kano, Tamekuni et al. 2008). Des vaccins similaires basés sur la reconnaissance des *mSP2* pourraient être développés pour protéger les animaux domestiques de l'infection par *A. phagocytophilum* (Yu, Chen et al. 2012). Cependant, la diversité des souches infectant les bovins, ainsi que la forte variabilité génétique observée sur les gènes codant les protéines membranaires et la rapidité d'évolution des souches, pourraient limiter l'efficacité de la couverture vaccinale.

Ensuite, une seconde stratégie serait de limiter les contacts entre les tiques et les animaux domestiques. Jusqu'à présent, l'utilisation d'acaricides ne semble pas efficace. L'utilisation d'acaricides diminue significativement le nombre de tiques se gorgeant sur l'hôte, mais l'efficacité diminue avec le temps et la durée de protection est très variable (Ogden, Casey et al. 2002b; Grear, Koethe et al. 2014). Une étude menée sur l'efficacité de la stratégie de traitement par acaricide chez les bovins pour lutter contre *Theileria parva*, a démontré que l'utilisation de l'acaricide diminue la population de tiques en gorgement sur les bovins et dans leur environnement (Walker, Klein et al. 2014). Néanmoins la prévalence de ce protozoaire chez les tiques a augmenté suite à ce traitement, car désormais la majorité des tiques qui survivent sont celles qui se nourrissent sur le buffle qui est l'hôte réservoir de *T. parva*. La protection des bovins par l'acaricide n'étant pas totale, la prévalence de la maladie chez les bovins n'a pas été affectée par l'utilisation du traitement. En outre, chez les moutons pâturant en zone d'endémie d'*A. phagocytophilum* l'utilisation d'acaricide n'empêche pas l'infection, mais la retarde seulement (Ogden, Casey et al. 2002b). Les acaricides ne sont cependant pas à proscrire, mais la stratégie de leur utilisation est à repenser. En effet, la prévalence d'*A. phagocytophilum* chez les tiques dans les pâtures de moutons se maintient essentiellement grâce à la transmission de l'hôte à la tique pendant la phase aiguë de l'infection, correspondant à une à deux semaines après le premier contact avec une tique infectée (Ogden, Casey et al. 2002b). L'utilisation de l'acaricide en préventif retarde ce premier contact et l'infection, mais ne limite pas la transmission vers de nouvelles tiques.

L'utilisation d'acaricide post-infection (pendant la phase aïgue) pourrait bloquer la transmission de la bactérie vers les tiques saines et devrait diminuer drastiquement la prévalence de la bactérie chez les tiques jusqu'à son élimination. Outre l'utilisation d'acaricides, des vaccins anti-vecteurs sont en cours d'essai pour limiter le contact entre les hôtes et les tiques (De La Fuente, Moreno-Cid et al. 2013). Le développement d'un vaccin anti-vecteur présente un avantage considérable face au vaccin anti-pathogènes, car il permet à la fois de protéger contre toutes les maladies vectorisées par les tiques et de reste efficace quelle que soit l'évolution génétique des pathogènes.

Enfin, la prévention passe par l'anticipation de la propagation et de l'émergence de la bactérie chez une espèce ou dans un milieu donné. Pour les maladies multi-hôtes dont la population de maintien est composée de plusieurs espèces, une modification dans la composition des communautés d'hôtes peut impacter fortement la propagation du pathogène. Par exemple, la présence de sangliers et de chevreuils dans un même site a un effet de dilution sur les génotypes d'*A. phagocytophilum*, car chacune de ces espèces élimine les génotypes portés par l'autre (Estrada-Peña, Acevedo et al. 2008). Les sangliers étant porteurs de souches pathogènes pour l'homme, une augmentation de la population de sangliers, ou une forte diminution de la population de chevreuils, représente un fort risque zoonotique. Ainsi, le changement global est un facteur de risque important pour la dispersion et l'émergence de souches. Le changement global s'accompagne, en effet, de modifications de la répartition des espèces. Par exemple, l'augmentation de la fréquence des épidémies de l'*Hantavirus Puumala* en Europe de l'Ouest coïncide avec l'augmentation des températures qui favorise le développement des campagnols. A l'opposé, en Scandinavie, un déclin des populations de campagnols dû aux hivers doux a conduit à une diminution de la propagation de ce même *Hantavirus* (Klempa 2009). De plus, la fragmentation du paysage et la diminution des espaces naturels a fait augmenter les contacts entre la faune sauvage, la faune domestique et l'homme. Ces interactions favorisent la propagation de souches et augmentent les risques zoonotiques (Woolhouse and Gowtage-Sequeria 2005). La répartition des espèces de tiques pourrait également être affectée par les changements climatiques (Gray, Dautel et al. 2009). Certaines souches d'*A. phagocytophilum* actuellement présentes dans des zones géographiques restreintes, comme celles circulant en méditerranée qui ont un fort potentiel zoonotique, pourraient voir leur aire de répartition augmenter avec la dispersion des tiques. Une meilleure connaissance des cycles est fondamentale pour modéliser la propagation des souches, prévoir leur dispersion et mettre en place des actions intégrant l'ensemble des acteurs des cycles.

Conclusion

L'épidémiologie moléculaire est un excellent outil pour mieux comprendre les cycles épidémiologiques complexes des agents pathogènes multi-hôtes. Bien qu'*Anaplasma phagocytophilum* soit de plus en plus étudiée depuis cette dernière décennie, la description des cycles épidémiologiques de cette bactérie reste incomplète. Dans cette étude, nous avons caractérisé la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* circulant chez différentes espèces domestiques et sauvages, afin d'identifier les espèces d'hôtes qui participent au même cycle épidémiologique et les hôtes réservoirs potentiel pour chaque cycle. Nous avons identifié trois groupes de génotypes chez les bovins, dont un groupe partagé avec les chevreuils. Bien que nous ayons obtenu peu d'information sur les génotypes portés par les rongeurs, des génotypes communs entre les rongeurs et les bovins ont été identifiés. L'absence de rongeurs positifs à *A. phagocytophilum* dans les Vallons de Gascogne indique qu'ils ne sont touchés par les génotypes portés par les chevreuils. Enfin, la caractérisation génétique par le séquençage haut-débit, des génotypes portés par les chevreuils et les tiques dans cette région, a mis en évidence une forte proportion d'individus co-infectés. Nos résultats soulignent l'importance de la caractérisation génétique des agents pathogènes multi-hôtes pour appréhender la contribution des différentes espèces aux cycles épidémiologiques. Ces connaissances sont nécessaires pour élaborer des plans de gestion visant à limiter la propagation de la maladie. Actuellement, l'anaplasmose granulocytaire humaine est en augmentation dans l'hémisphère nord. L'approche « *One Health* » qui vise à grouper les études de médecine humaine et vétérinaire, et à élaborer une gestion globale des épidémies en incluant tous les acteurs des cycles épidémiologiques, semble la plus appropriée pour étudier cette maladie. Le dernier rapport du « Center of Diseases Control » du Maine (USA) fait état de 80 nouveaux cas humains pendant les sept premiers mois de 2014, auxquels s'ajoutent 94 cas sur l'ensemble de l'année 2013. Bien que dans cet Etat la production laitière représente la principale activité agricole, aucun cas d'anaplasmose granulocytaire n'a été déclaré chez les bovins (Stuenkel, Granquist et al. 2013). A l'opposé, en Méditerranée des génotypes similaires à ceux infectant l'homme aux Etats Unis ont été décrits chez les animaux domestiques et les tiques (Alberti, Zobba et al. 2005; Chastagner A, Bailly X et al. 2013). Sachant que les animaux domestiques représentent une des principales sources de maladies zoonotiques émergentes (Cleaveland, Laurenson et al. 2001; Wolfe, Dunavan et al. 2007), le risque d'émergence de l'anaplasmose granulocytaire humaine en Europe est d'autant plus grand. Il est donc essentiel de continuer les études sur l'évolution génétique de tels agents pathogènes, et sur l'écologie des

populations d'hôtes et de vecteurs, pour déterminer les facteurs de risque et améliorer le contrôle de cette maladie multi-hôtes vectorisées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akkoyunlu, M., S. E. Malawista, et al. (2001). "Exploitation of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by the agent of human granulocytic ehrlichiosis." Infection and Immunity **69**(9): 5577-5588.
- Alberti, A. and O. A. Sparagano (2006). "Molecular Diagnosis of Granulocytic Anaplasmosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia by PCR-RFLP." Annals of the New York Academy of Sciences **1081**(1): 371-378.
- Alberti, A., R. Zobba, et al. (2005). "Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States." Applied and Environmental Microbiology **71**(10): 6418-6422.
- André, J. B. and S. Gandon (2006). "Vaccination, within-host dynamics, and virulence evolution." Evolution **60**(1): 13-23.
- Ashford, R. (2003). "When is a reservoir not a reservoir?" Emerging Infectious Diseases **9**(11): 1495.
- Baldrige, G. D., G. A. Scoles, et al. (2009). "Transovarial Transmission of *Francisella*-Like Endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* Variants in *Dermacentor albipictus* " Journal of medical entomology **46**(3): 625-632.
- Barbet, A., P. Meeus, et al. (2003). "Expression of multiple outer membrane protein sequence variants from a single genomic locus of *Anaplasma phagocytophilum*." Infection and Immunity **71**(4): 1706-1718.
- Bown, K., X. Lambin, et al. (2007). "High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis." J Clin Microbiol **45**(6): 1771 - 1776.
- Bown, K., X. Lambin, et al. (2011). "The common shrew (*Sorex araneus*): a neglected host of tick-borne infections?" Vector Borne Zoonotic Dis **11**(7): 947 - 953.
- Bown, K. J., M. Begon, et al. (2006). "Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom?" Vector Borne Zoonotic Dis **6**(4): 404-410.
- Bown, K. J., M. Begon, et al. (2003). "Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom." Emerging Infectious Diseases **9**(1): 63-70.
- Bown, K. J., X. Lambin, et al. (2009). "Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, Discrete enzootic cycles." Emerging Infectious Diseases **15**(12): 1948-1954.
- Bown, K. J., X. Lambin, et al. (2008). "Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations." Appl Environ Microbiol **74**(23): 7118-7125.
- Brisse, S., C. Brehony, et al. (2014). "Microbial molecular markers and epidemiological surveillance in the era of high throughput sequencing: an update from the IMMEM-10 Conference." Research in microbiology **165**(2): 140-153.
- Brodie, T. A., P. H. Holmes, et al. (1986). "Some aspects of tick-borne diseases of British sheep." Vet Rec **118**(15): 415-418.
- Carrade, D., J. Foley, et al. (2009). "Canine granulocytic anaplasmosis: a review." J Vet Intern Med **23**(6): 1129 - 1141.
- Casey, A., R. Birtles, et al. (2004). "Groupings of highly similar major surface protein (p44)-encoding paralogues: a potential index of genetic diversity amongst isolates of *Anaplasma phagocytophilum*." Microbiology **150**(3): 727 - 734.
- Chastagner A, Bailly X, et al. (2013). "Single genotype of *Anaplasma phagocytophilum* identified from ticks, Camargue, France " Emerging Infectious Diseases **19**(5): 825-827.
- Chen, S. M., J. S. Dumler, et al. (1994). "Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease." J Clin Microbiol **32**(3): 589-595.
- Cleaveland, S., M. K. Laurensen, et al. (2001). "Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1411): 991-999.
- Courtney, J. W. and R. F. Massung (2003). "Multiplex taqman PCR assay for rapid detection of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi*." Rickettsiology: Present and Future Directions **990**: 369-370.

- Criscuolo, A., V. Berry, et al. (2006). "SDM: A Fast Distance-Based Approach for (Super)Tree Building in Phylogenomics." Systematic Biology **55**(5): 740-755.
- Dark, M. J., A. M. Lundgren, et al. (2012). "Determining the repertoire of immunodominant proteins via whole-genome amplification of intracellular pathogens." Plos One **7**(4): e36456.
- De La Fuente, J., R. F. Massung, et al. (2005). "Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains." Journal of Clinical Microbiology **43**(3): 1309-1317.
- De La Fuente, J., J. A. Moreno-Cid, et al. (2013). "Subolesin/Akirin vaccines for the control of arthropod vectors and vectorborne pathogens." Transbound Emerg Dis **60**(Suppl 2): 172-178.
- De La Fuente, J., V. Naranjo, et al. (2005). "Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain." Vector-Borne and Zoonotic Diseases **5**(4): 390-401.
- De La Fuente, J., F. Ruiz-Fons, et al. (2008). "Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain." Research in Veterinary Science **84**(3): 382-386.
- De La Fuente, J., A. Torina, et al. (2005). "Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily." Veterinary Parasitology **133**(4): 357-362.
- De La Fuente, J., R. A. Van Den Bussche, et al. (2002). "Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences." Veterinary Microbiology **88**(3): 275-285.
- Denonfoux, J., N. Parisot, et al. (2013). "Gene capture coupled to high-throughput sequencing as a strategy for targeted metagenome exploration." DNA Res **20**(2): 185-196.
- Des Vignes, F., M. L. Levin, et al. (1999). "Comparative Vector Competence of *Dermacentor variabilis* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) for the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis." Journal of medical entomology **36**(2): 182-185.
- Drazenovich, N., J. Foley, et al. (2006). "Use of real-time quantitative PCR targeting the *msp2* protein gene to identify cryptic *Anaplasma phagocytophilum* infections in wildlife and domestic animals." Vector-Borne & Zoonotic Diseases **6**(1): 83-90.
- Dugat, T., A. Chastagner, et al. (2014). "A new Multiple-locus variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) reveals different clusters for *Anaplasma phagocytophilum* circulating in domestic and wild ruminants." Parasites & Vectors **7**: 439.
- Dumler, J., K. Asanovich, et al. (2003). "Analysis of genetic identity of North American *Anaplasma phagocytophilum* strains by pulsed-field gel electrophoresis." Journal of Clinical Microbiology **41**(7): 3392-3394.
- Dumler, J. S., A. F. Barbet, 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*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**(Pt 6): 2145-2165.
- Dzięgiel, B., Ł. Adaszek, et al. (2013). "Equine granulocytic anaplasmosis." Research in Veterinary Science **95**(2): 316-320.
- Engvall, E. O., B. Pettersson, et al. (1996). "A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses, and cattle." J Clin Microbiol **34**(9): 2170-2174.
- Estrada-Peña, A., P. Acevedo, et al. (2008). "Evidence of the importance of host habitat use in predicting the dilution effect of wild boar for deer exposure to *Anaplasma* spp." Plos One **3**(8): e2999.
- Estrada-Peña, A. and J. de la Fuente (2014). "The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases." Antiviral Research **108**(0): 104-128.
- Fernández-Soto, P., R. Perez-Sanchez, et al. (2001). "Molecular detection of *Ehrlichia phagocytophila* genogroup organisms in larvae of *Neotrombicula autumnalis* (Acari: *Trombiculidae*) captured in Spain." Journal of Parasitology **87**(6): 1482-1483.
- Foggie, A. (1951). "Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep." J Pathol Bacteriol **63**(1): 1-15.

- Foley, J., N. C. Nieto, et al. (2008a). "Possible differential host tropism in *Anaplasma phagocytophilum* strains in the Western United States." Annals of the New York Academy of Sciences **1149**(1): 94-97.
- Foley, J. E., N. C. Nieto, et al. (2008b). "*Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal hosts of *Ixodes* ticks, Western United States." Emerging Infectious Diseases **14**(7): 1147-1150.
- Galindo, R. C., N. Ayllon, et al. (2012). "Gene expression profile suggests that pigs (*Sus scrofa*) are susceptible to *Anaplasma phagocytophilum* but control infection." Parasit Vectors **5**: 181.
- Gandon, S. (2004). "Evolution of multihost parasites." Evolution **58**(3): 455-469.
- Garcia-Garcia, J. C., K. E. Rennoll-Bankert, et al. (2009). "Silencing of Host Cell CYBB Gene Expression by the Nuclear Effector AnkA of the Intracellular Pathogen *Anaplasma phagocytophilum*." Infection and Immunity **77**(6): 2385-2391.
- Goodmann, J., C. Nelson, et al. (1996). "Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis." N Engl J Med **334**(5): 209 - 215.
- Granquist, E. G., K. Bardsen, et al. (2010). "Variant -and individual dependent nature of persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection." Acta Veterinaria Scandinavica **52**: 25.
- Granquist, E. G., S. Stuen, et al. (2008). "Outer membrane protein sequence variation in lambs experimentally infected with *Anaplasma phagocytophilum*." Infect Immun **76**(1): 120-126.
- Gray, J., H. Dautel, et al. (2009). "Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe." Interdisciplinary perspectives on infectious diseases **2009**.
- Gear, J. S., R. Koethe, et al. (2014). "The effectiveness of permethrin-treated deer stations for control of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* on Cape Cod and the islands: a five-year experiment." Parasit Vectors **7**(1): 1756-3305.
- Gribble, D. H. (1969). "Equine ehrlichiosis." J Am Vet Med Assoc **155**(2): 462-469.
- Hajdusek, O., R. Sima, et al. (2013). "Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens." Front Cell Infect Microbiol **3**(26).
- Heikkila, H. M., A. Bondarenko, et al. (2010). "*Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report." Acta Vet Scand **52**(62): 1751-0147.
- Hildebrandt, A., J. Franke, et al. (2010). "The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp." Ticks and Tick-Borne Diseases **1**(2): 105-107.
- Huhn, C., C. Winter, et al. (2014). "Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing " Plos One **9**(4): e93725.
- Jacquot, M., M. Bisseux, et al. (2014). "High-throughput sequence typing reveals genetic differentiation and host specialization among populations of the *Borrelia burgdorferi* species complex that infect rodents." Plos One **9**(2): e88581.
- Jereb, M., B. Pecaver, et al. (2012). "Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion." Emerg Infect Dis **18**(8): 1354-1357.
- Johnston, E., J. I. Tsao, et al. (2013). "*Anaplasma phagocytophilum* infection in American robins and gray catbirds: an assessment of reservoir competence and disease in captive wildlife." Journal of medical entomology **50**(1): 163-170.
- Joncour, G., G. Pouliquen, et al. (2006). "*Anaplasma phagocytophilum*, agent de l'ehrlichiose granulocytaire bovine (EGB) et avortements chez les bovins." Bulletin des GTV N°25: 95 - 104.
- Jones, K. E., N. G. Patel, et al. (2008). "Global trends in emerging infectious diseases." Nature **451**(7181): 990-993.
- Kano, F. S., K. Tamekuni, et al. (2008). "Induced immune response of DNA vaccine encoding an association MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of *Anaplasma marginale*." Vaccine **26**(27-28): 3522-3527.
- Keesing, F., L. K. Belden, et al. (2010). "Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases." Nature **468**(7324): 647-652.
- Kent, R. J. (2009). "Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies." Molecular Ecology Resources **9**(1): 4-18.
- Klempa, B. (2009). "Hantaviruses and climate change." Clin Microbiol Infect **15**(6): 518-523.

- Kocan, K. M., A. T. Busby, et al. (2012). "Sheep experimentally infected with a human isolate of *Anaplasma phagocytophilum* serve as a host for infection of *Ixodes scapularis* ticks." Ticks Tick Borne Dis **3**(3): 147-153.
- Koebel, C., A. Kern, et al. (2011). "Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis." Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **72**(3): 214-218.
- Kurtenbach, K., S. De Michelis, et al. (2002). "Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato—the key role of host complement." Trends in Microbiology **10**(2): 74-79.
- Ladbury, G. A. F., S. Stuen, et al. (2008). "Dynamic transmission of numerous *Anaplasma phagocytophilum* genotypes among lambs in an infected sheep flock in an area of anaplasmosis endemicity." Journal of Clinical Microbiology **46**(5): 1686-1691.
- Leblond, A., B. Tilliette, et al. (2009). "*Anaplasma phagocytophilum* infections in horses in the south of France: an emerging disease?" J. Vet. Intern. Med. **23**(2): 421.
- Leichty, A. R. and D. Brisson (2014). "Selective Whole Genome Amplification for Re-Sequencing Target Microbial Species from Complex Natural Samples." Genetics **5**(114): 165498.
- Lempereur, L., M. Lebrun, et al. (2012). "Longitudinal field study on bovine *Babesia spp.* and *Anaplasma phagocytophilum* infections during a grazing season in Belgium." Parasitology Research **110**(4): 1525-1530.
- Lepidi, H., J. E. Bunnell, et al. (2000). "Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **62**(1): 29-37.
- Levin, M. L. and D. Fish (2000). "Immunity Reduces Reservoir Host Competence of *Peromyscus leucopus* for *Ehrlichia phagocytophila*." Infection and Immunity **68**(3): 1514-1518.
- Levin, M. L., W. L. Nicholson, et al. (2002). "Comparison of the reservoir competence of medium-sized mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut." Vector Borne and Zoonotic Diseases **2**(3): 125-136.
- Liais, E., G. Croville, et al. (2012). Molecular detection and characterization of duck respiratory viruses using unbiased high-throughput sequencing. ESVV 2012, Madrid, ESP, (2012-09-04 - 2013-02-07).
- Lin, M., A. Den Dulk-Ras, et al. (2007). "*Anaplasma phagocytophilum* *AnkA* secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection†." Cellular Microbiology **9**(11): 2644-2657.
- Lotrič-Furlan, S., M. Petrovec, et al. (1998). "Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia." Clinical Infectious Diseases **27**(3): 424-428.
- Macleod, J. and W. S. Gordon (1933). "Studies in tick-borne fever of sheep. I. Transmission by the tick, *Ixodes ricinus*, with a description of the disease produced." Parasitology **25**(02): 273-283.
- Madewell, B. R. and D. H. Gribble (1982). "Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*." J Am Vet Med Assoc **180**(5): 512-514.
- Majazki, J., N. Wuppenhorst, et al. (2013). "*Anaplasma phagocytophilum* strains from voles and shrews exhibit specific *ankA* gene sequences." BMC Veterinary Research **9**(1): 235.
- Margulies, M., M. Egholm, et al. (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." Nature **437**(7057): 376-380.
- Masségli, S. and G. Vourc'h (Submitted.). Identification moléculaire de l'hôte du repas sanguin d'une tique. Tiques et Maladies à Tiques : une introduction Multidisciplinaire. K. D. M. a. N. Boulanger. IRD Edition, Montpellier.
- Massung, R., J. Courtney, et al. (2005). "*Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer." Emerg Infect Dis **11**: 1604 - 1606.
- Massung, R. F., T. N. Mather, et al. (2006). "Reservoir competency of goats for the Ap-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum*." Infection and Immunity **74**(2): 1373-1375.
- Massung, R. F., M. J. Mauel, et al. (2002). "Genetic Variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut." Emerging Infectious Diseases [serial on the Internet].
- Massung, R. F., R. A. Priestley, et al. (2003). "Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice." Journal of Infectious Diseases **188**(11): 1757-1763.

- Medlock, J. M., K. M. Hansford, et al. (2013). "Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe." Parasit Vectors **6**(1): 1756-3305.
- Michalik, J., J. Stanczak, et al. (2012). "Wild Boars as Hosts of Human-Pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* Variants." Emerging Infectious Diseases **18**(6): 998-1001.
- Moran-Cadenas, F., H. Schneider, et al. (2007). "A comparison of two DNA extraction approaches in the detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from live *Ixodes ricinus* ticks by PCR and reverse line blotting." Vector-Borne and Zoonotic Diseases **7**(4): 555-562.
- Morissette, E., R. F. Massung, et al. (2009). "Diversity of *Anaplasma phagocytophilum* Strains, USA." Emerging Infectious Diseases **15**(6): 928-931.
- Neelakanta, G., H. Sultana, et al. (2010). "*Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold." The Journal of clinical investigation **120**(9): 3179-3190.
- Nicholson, W. L., M. B. Castro, et al. (1999). "Dusky-footed wood rats (*Neotoma fuscipes*) as reservoirs of granulocytic *Ehrlichiae* (Rickettsiales: *Ehrlichieae*) in northern California." Journal of Clinical Microbiology **37**(10): 3323-3327.
- Nieto, N. C., J. E. Foley, et al. (2009). "Reptile infection with *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of granulocytic anaplasmosis." Journal of Parasitology **95**(5): 1165-1170.
- Niu, H., V. Kozjak-Pavlovic, et al. (2010). "*Anaplasma phagocytophilum* Ats-1 is imported into host cell mitochondria and interferes with apoptosis induction." PLoS pathogens **6**(2): e1000774.
- Ogden, N. H., A. N. Casey, et al. (2002a). "Field evidence for density-dependent facilitation amongst *Ixodes ricinus* ticks feeding on sheep." Parasitology **124**(Pt 2): 117-125.
- Ogden, N. H., A. N. Casey, et al. (2002b). "Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep 'carriers' to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks." Parasitology **124**(Pt 2): 127-136.
- Ogden, N. H., A. N. Casey, et al. (2003). "Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection." Infect Immun **71**(4): 2071-2078.
- Oporto, B., H. Gil, et al. (2003). "A Survey on *Anaplasma phagocytophila* in Wild Small Mammals and Roe Deer (*Capreolus capreolus*) in Northern Spain." Annals of the New York Academy of Sciences **990**(1): 98-102.
- Paulauskas, A., J. Radzijeuskaja, et al. (2009). "*Anaplasma* in ticks feeding on migrating birds and questing ticks in Lithuania and Norway." Clinical Microbiology and Infection **15**(Suppl 2): 34-36.
- Petrovec, M., W. Sixl, et al. (2003). "Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic." Ann N Y Acad Sci **990**: 103 - 106.
- Philippe, H., E. A. Snell, et al. (2004). "Phylogenomics of Eukaryotes: Impact of Missing Data on Large Alignments." Molecular Biology and Evolution **21**(9): 1740-1752.
- Portier, J. (2008). Etude de la pathogénicité d'*Anaplasma phagocytophilum* chez les populations de chevreuils (*Capreolus capreolus*) de Franche Comté. 102 p, Ecole Nationale vétérinaire de Nantes.
- Pusterla, N., U. Braun, et al. (1997). "Intrauterine infection with *Ehrlichia phagocytophila* in a cow." The Veterinary Record **141**(4): 101-102.
- Pusterla, N., J. Pusterla, et al. (1999). "Experimental cross-infections with *Ehrlichia phagocytophila* and human granulocytic *ehrlichia*-like agent in cows and horses." Vet Rec **145**(11): 311 - 314.
- Rar, V. and I. Golovljova (2011). "*Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "*Candidatus Neoehrlichia*" bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review." Infection Genetics and Evolution **11**(8): 1842-1861.
- Rejmanek, D., G. Bradburd, et al. (2012). "Molecular characterization reveals distinct genospecies of *Anaplasma phagocytophilum* from diverse North American hosts." Journal of Medical Microbiology **61**(2): 204-212.
- Rejmanek, D., P. Foley, et al. (2012a). "Antigen variability in *Anaplasma phagocytophilum* during chronic infection of a reservoir host." Microbiology **158**(Pt 10): 2632-2641.
- Rejmanek, D., P. Foley, et al. (2012b). "Evolution of antigen variation in the tick-borne pathogen *Anaplasma phagocytophilum*." Mol Biol Evol **29**(1): 391-400.

- Rejmanek, D., P. Freycon, et al. (2013). "Unique strains of *Anaplasma phagocytophilum* segregate among diverse questing and non-questing Ixodes tick species in the western United States." Ticks and Tick-Borne Diseases **4**(6): 482-487.
- Rennoll-Bankert, K. E., S. H. Sinclair, et al. (2014). "Comparison and characterization of granulocyte cell models for *Anaplasma phagocytophilum* infection." Pathogens and disease **71**(1): 55-64.
- Rikihisa, Y. (2010). "*Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells." Nature Reviews Microbiology **8**(5): 328-339.
- Rikihisa, Y. (2011). "Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*." Clinical Microbiology Reviews **24**(3): 469-489.
- Rikihisa, Y., M. Lin, et al. (2010). "Type IV secretion in the obligatory intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*." Cell Microbiol **12**(9): 1213 - 1221.
- Rosef, O., A. Paulauskas, et al. (2009). "Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing Ixodes ricinus ticks in relation to the density of wild cervids." Acta Vet Scand **51**(47): 1751-0147.
- Rymaszewska, A. (2008). "Divergence within the marker region of the *groESL* operon in *Anaplasma phagocytophilum*." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **27**(11): 1025 - 1036.
- Scharf, W., S. Schauer, et al. (2011). "Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters." Journal of Clinical Microbiology **49**(3): 790-796.
- Shukla, S. K., V. Aswani, et al. (2007). "Contribution of Polymorphisms in ankA, gltA, and groESL in Defining Genetic Variants of *Anaplasma phagocytophilum*." Journal of Clinical Microbiology **45**(7): 2312-2315.
- Silaghi, C., D. Hamel, et al. (2011). "Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria." Vector-Borne and Zoonotic Diseases **11**(4): 355-362.
- Silaghi, C., G. Liebisch, et al. (2011). "Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases." Parasites & Vectors **4**.
- Silaghi, C., J. Skuballa, et al. (2012). "The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) - A suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*?" Ticks and Tick-Borne Diseases **3**(1): 49-54.
- Skoracki, M., J. Michalik, et al. (2006). "First detection of *Anaplasma phagocytophilum* in quill mites (Acari: *Syringophilidae*) parasitizing passerine birds." Microbes and infection **8**(2): 303-307.
- Steain, M. C., B. Wang, et al. (2005). "HIV-1 co-infection, superinfection and recombination." Sexual health **1**(4): 239-250.
- Stuen, S. (2007). "*Anaplasma phagocytophilum* - the Most Widespread Tick-Borne Infection in Animals in Europe." Veterinary Research Communications **31**(1): 79-84.
- Stuen, S. and K. Artursson (2000). "Effects of the dose of *Ehrlichia phagocytophila* on the severity of experimental infections in lambs." The Veterinary Record **146**(23): 669-672.
- Stuen, S., K. Bergström, et al. (2003). "Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after experimental infection with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology **10**(4): 692-695.
- Stuen, S., A. N. Casey, et al. (2006). "Detection by the polymerase chain reaction of *Anaplasma phagocytophilum* in tissues of persistently infected sheep." J Comp Pathol **134**(1): 101-104.
- Stuen, S., E. G. Granquist, et al. (2013). "*Anaplasma phagocytophilum* - a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies." Frontiers in cellular and infection microbiology **3**.
- Stuen, S., L. Grova, et al. (2011). "A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological responses after experimental infection with *Anaplasma phagocytophilum* in two Norwegian sheep breeds." Acta Veterinaria Scandinavica **53**: 8.
- Stuen, S., S. Nevland, et al. (2003). "Fatal cases of Tick-borne fever (TBF) in sheep caused by several 16S rRNA gene variants of *Anaplasma phagocytophilum*." Ann N Y Acad Sci **990**: 433-434.
- Stuen, S., W. Scharf, et al. (2010). "Experimental infection in lambs with a red deer (*Cervus elaphus*) isolate of *Anaplasma phagocytophilum*." Journal of Wildlife Diseases **46**(3): 803-809.
- Sukumaran, B., S. Narasimhan, et al. (2006). "An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands." J Exp Med **203**(6): 1507-1517.
- Talleklint, L. and T. G. Jaenson (1997). "Infestation of mammals by *Ixodes ricinus* ticks (Acari: *Ixodidae*) in south-central Sweden." Exp Appl Acarol **21**(12): 755-771.

- Teglas, M. and J. Foley (2006). "Differences in the transmissibility of two *Anaplasma phagocytophilum* strains by the North American tick vector species, *Ixodes pacificus* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae)." Experimental and Applied Acarology **38**(1): 47-58.
- Telford, S. R., J. E. Dawson, et al. (1996). "Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(12): 6209-6214.
- Thomas, R. J., R. J. Birtles, et al. (2012). "Recurrent bacteraemia in sheep infected persistently with *Anaplasma phagocytophilum*." J Comp Pathol **147**(2-3): 360-367.
- Till, B. J., T. Zerr, et al. (2006). "A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals." Nat Protoc **1**(5): 2465-2477.
- Torina, A., A. Alongi, et al. (2008). "Prevalence and Genotypes of *Anaplasma* Species and Habitat Suitability for Ticks in a Mediterranean Ecosystem." Applied and Environmental Microbiology **74**(24): 7578-7584.
- Troese, M. J., A. Kahlon, et al. (2011). "Proteomic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* during infection of human myeloid cells identifies a protein that is pronouncedly upregulated on the infectious dense-cored cell." Infection and Immunity **79**(11): 4696-4707.
- Viana, M., R. Mancy, et al. (2014). "Assembling evidence for identifying reservoirs of infection." Trends in Ecology & Evolution **29**(5): 270-279.
- von Loewenich, F., B. Baumgarten, et al. (2003). "High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany." J Clin Microbiol **41**(11): 5033 - 5040.
- Walker, J. G., E. Y. Klein, et al. (2014). "Disease at the wildlife-livestock interface: acaricide use on domestic cattle does not prevent transmission of a tick-borne pathogen with multiple hosts." Vet Parasitol **199**(3-4): 206-214.
- Wodecka, B., A. Rymaszewska, et al. (2014). "Host and pathogen DNA identification in blood meals of nymphal *Ixodes ricinus* ticks from forest parks and rural forests of Poland." Experimental and Applied Acarology **62**(4): 543-555.
- Woldehiwet, Z. (2008). "Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis." The Veterinary Journal **175**(1): 37-44.
- Woldehiwet, Z. (2010). "The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*." Veterinary Parasitology **167**(2-4): 108-122.
- Woldehiwet, Z. and G. R. Scott (1982). "Stages in the development of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever." J Comp Pathol **92**(3): 469-474.
- Wolfe, N. D., C. P. Dunavan, et al. (2007). "Origins of major human infectious diseases." Nature **447**(7142): 279-283.
- Woolhouse, M. E. and S. Gowtage-Sequeria (2005). "Host range and emerging and reemerging pathogens." Emerg Infect Dis **11**(12): 1842-1847.
- Ye, J., G. Coulouris, et al. (2012). "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction." BMC bioinformatics **13**(1): 134.
- Yoshiie, K., H.-Y. Kim, et al. (2000). "Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis." Infection and Immunity **68**(3): 1125-1133.
- Yu, Q., C. F. Chen, et al. (2012). "Expression and immunogenicity of recombinant immunoreactive surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum*." Clin Vaccine Immunol **19**(6): 919-923.
- Zeman, P. and M. Pecha (2008). "Segregation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* circulating among wild ruminants within a Bohemian forest (Czech Republic)." International Journal of Medical Microbiology **298**: 203-210.
- Zhan, L., W. C. Cao, et al. (2008). "A newly discovered *Anaplasma phagocytophilum* variant in rodents from southeastern China." Vector-Borne and Zoonotic Diseases **8**(3): 369-380.
- Zhan, L., W. C. Cao, et al. (2010). "*Anaplasma phagocytophilum* from Rodents and Sheep, China." Emerging Infectious Diseases **16**(5): 764-768.
- Zhaoqing, Y., J. Miao, et al. (2006). "Genetic structures of geographically distinct *Plasmodium vivax* populations assessed by PCR/RFLP analysis of the merozoite surface protein 3β gene." Acta Tropica **Vol. 100** (Issue 3): Pages 205-212.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Single genotype of *Anaplasma phagocytophilum* identified from ticks, Camargue, France *Emerging Infectious Diseases* 2013.

LETTERS

This study was partly supported by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H22-Shokuhin-Ippan-012, H23-Shinko-Shitei-020, H24-Shokuhin-Ippan-007, and H24-Shokuhin-Ippan-008).

**Hidemasa Izumiya,
Jun Terajima, Shouji Yamamoto,
Makoto Ohnishi,
Haruo Watanabe, Akemi Kai,
Takayuki Kurazono,
Masumi Taguchi, Tetsuo Asai,
Masato Akiba, Yuko Matsumoto,
and Yutaka Tamura**

Author affiliations: National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan (H. Izumiya, J. Terajima, S. Yamamoto, M. Ohnishi, H. Watanabe); Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Tokyo (A. Kai); Saitama Institute of Public Health, Saitama, Japan (T. Kurazono); Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka, Japan (M. Taguchi); National Veterinary Assay Laboratory, Tokyo (T. Asai); National Institute of Animal Health, Ibaraki, Japan (M. Akiba); Yokohama City Institute of Health, Kanagawa, Japan (Y. Matsumoto); and Rakuno Gakuen University, Hokkaido, Japan (Y. Tamura)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1905.121395>

References

1. Threlfall EJ. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104—a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:7–10. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/46.1.7>
2. Briggs CE, Fratamico PM. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:846–9.
3. van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;49:22–7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00173.x>
4. Lindstedt BA, Vardund T, Aas L, Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods.* 2004;59:163–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2004.06.014>

5. Larsson JT, Torpdahl M, Petersen RF, Sorensen G, Lindstedt BA, Nielsen EM. Development of a new nomenclature for *Salmonella typhimurium* multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). *Euro Surveill.* 2009;14:19174 <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19174>
6. Anderson ES, Ward LR, Saxe MJ, de Sa JD. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J Hyg (Lond).* 1977;78:297–300. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022172400056187>
7. Hermans AP, Abbe T, Zwietering MH, Aarts HJ. Identification of novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-specific prophage and nonprophage chromosomal sequences among serovar Typhimurium isolates by genomic subtractive hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:4979–85. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.4979-4985.2005>

Address for correspondence: Hidemasa Izumiya, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640, Japan; email: izumiya@nih.go.jp

Single Genotype of *Anaplasma phagocytophilum* identified from Ticks, Camargue, France

To the Editor: Granulocytic anaplasmosis is a tickborne zoonosis caused by *Anaplasma phagocytophilum* bacteria, which are emerging in Europe. Besides infecting humans, *A. phagocytophilum* infect a wide range of wild and domestic mammals (1). In Europe, the *Ixodes ricinus* tick is the main vector for the bacteria, but *A. phagocytophilum* has also been detected in association with *Rhipicephalus* and *Dermacentor* spp. ticks (2). The climate and biotopes of the Mediterranean region are particularly favorable for several species of ticks and, therefore, for tickborne diseases.

Although *I. ricinus* ticks are rare or absent in the Mediterranean Basin, serosurveys performed on equine

populations in Camargue, southern France, indicated an *A. phagocytophilum* seroprevalence of ≈10% (3). To investigate the prevalence and diversity of *A. phagocytophilum* bacteria in ticks in Camargue, we collected questing ticks from horse pastures and feeding ticks from horses.

Ticks feeding on horses were collected in randomly selected stables during 2007 (84 stables), 2008 (72 stable), and 2010 (19 stables). The stables were chosen among those where evidence of *A. phagocytophilum* seroconversion in horses had been previously found (3). In 2008 and 2010, questing ticks were collected by the dragging method in 19 pastures, around bushes, and in areas where horses spent the most time. Surveys were conducted in the spring, which represents the peak activity time of *Ixodes* ticks.

A total of 406 adult ticks were collected, representing 6 species: *Rhipicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *R. pusillus*, *Dermacentor marginatus*, and *Hyalomma marginatum*. Tick species were identified by morphologic criteria and molecular analyses based on mitochondrial 12S rDNA sequences (4). Total DNA was extracted from the ticks by using the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) (5). *A. phagocytophilum* was detected by nested PCR targeting the 16S rDNA (online Technical Appendix 1, wwwnc.cdc.gov/EID/article/19/5/12-1003-Techapp1.pdf).

Of the 406 ticks, 40 were infected with *A. phagocytophilum*. The infected group included ticks from all 6 collected species except *R. pusillus*. Infection rates among the species ranged from 0 to 22% (online Technical Appendix 2, wwwnc.cdc.gov/EID/article/19/5/12-1003-Techapp2.pdf). The prevalence of *A. phagocytophilum* infection did not differ significantly between species (logistic regression model, $p = 0.76$) but was higher among questing ticks than feeding ticks ($p < 0.001$; odds ratio 1.15).

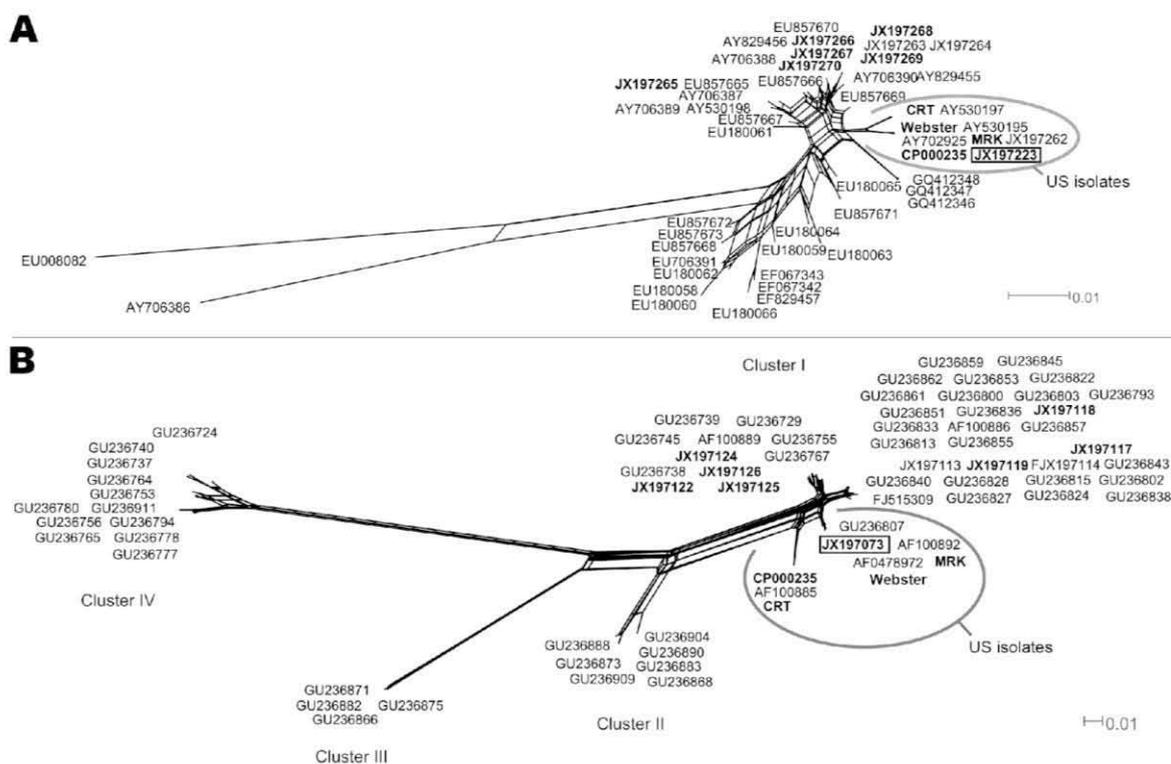


Figure. Phylogenetic networks of *Anaplasma phagocytophilum* based on *msp4* (A) and *ankA* (B) genes and built with SplitsTree4 (version 4.11.3; <http://splitstree.org/>) by the Neighbor-Net method. The sequences of the genotype described in Camargue, France, is framed. Sequences found in the 2 networks are in **boldface**: *A. phagocytophilum* amplified from ticks collected in Combrailles, Auvergne region, France (JX197116–JX197126 and JX197265–JX197270), a human isolate (strain Webster, EU857674 and GU236811), an American roe deer isolate (strain CRT, JX197261 and JX197113), and an American horse isolate (strain MRK, AY530196 and AF153716). Scale bars indicate number of nucleotide substitutions per site.

We amplified 6 loci by nested PCR (online Technical Appendix 1) to characterize *A. phagocytophilum* genetic diversity in positive samples: *ankA*, *msp4*, *pleD*, *typA*, and intergenic regions *hemE-APH_0021* and *APH_1099-APH_1100* (National Center for Biotechnology Information annotation). The GenBank accession numbers for the nucleotide sequences are JX197073–JX197368. No polymorphism was found among the 6 loci tested in the 40 *A. phagocytophilum*-positive ticks. The genotype identified was 100% identical to the reference sequence (NC_007797) for loci *msp4*, *pleD*, and *typA* and for intergenic regions *hemE-APH_0021* and *APH_1099-APH_1100*. The *ankA* sequence was 96% similar (487 nt) to the reference sequence. The relevance of

these loci as markers of diversity was verified (online Technical Appendix 3, wwwnc.cdc.gov/EID/article/19/5/12-1003-Techapp3.pdf).

To study the phylogenetic relationships between cognate sequences, we included in our analysis all sequences available in GenBank for genes *ankA* and *msp4*. To account for recombination events that affect *ankA* and *msp4* (data not shown) in phylogenetic analyses, we used Neighbor-Net networks (Figure). Phylogenetic analysis of *msp4* (Figure, panel A) indicated that the genotype of *A. phagocytophilum* from ticks in Camargue was included in a clade that also includes genotypes that infect humans and horses in the United States.

The diversity of *ankA* sequences has been described as 4 phylogenetic

clusters (6). All sequences obtained in our study were included in cluster I, particularly in a branch composed exclusively of sequences of *A. phagocytophilum* isolated from humans in the United States (Figure, panel B).

Previous studies investigating *A. phagocytophilum* have revealed a genetic diversity that is thought to have been caused by sympatric epidemiologic cycles involving different vectors and reservoir hosts (1,6,7). In 5 species of ticks (40 ticks total) that we collected from a 250-km² area in southern France, we found only 1 genotype of *A. phagocytophilum*, which we determined to be phylogenetically close to genotypes found in the United States. Sequences phylogenetically related to bacteria in the United States were also observed in Sardinia (8) and Sicily (9).

The low diversity we found could be explained by a recent introduction of the bacteria into the area [although *A. phagocytophilum*-seropositive horses have been found in the area since 2001 (3)] or by a selective sweep linked to the particular ticks and host reservoir in Camargue. The 5 species of ticks that we found positive for *A. phagocytophilum* have been described as potential vectors of *A. phagocytophilum* in the Mediterranean Basin (2,10). Among the tick species in our investigation, *R. bursa* and *R. sanguineus* ticks are the 2 main carriers of *A. phagocytophilum*, and these ticks are likely to feed on humans and, thus, pose a risk of infection to the local population. Further studies are needed to address the potential effect of *A. phagocytophilum*-infected ticks on human health in this area and, more specifically, the relationship between genotype and pathogenicity.

Acknowledgments

We thank Curtis Nelson and Friederike von Loewenich for generously providing the DNA of strains HGE1, CRT, and Webster; Véronique Bachy for actively helping us to obtain samples from domestic animals; Magalie René-Martellet and Frédéric Beugnet for helping with the morphological identification of ticks; Gillian Martin for proofreading the manuscript; Nelly Dorr for creating the databases used in this study; and Françoise Rieu-Lesme and Sébastien Masségla who were involved in laboratory work.

**Amélie Chastagner,
Xavier Bailly, Agnès Leblond,
Sophie Pradier,¹
and Gwenaél Vourc'h**

Author affiliations: National Center for Biotechnology Information (INRA), Saint Genès Champanelle, France (A. Chastagner, X. Bailly, A. Leblond, G. Vourc'h); University of Lyon, Marcy l'Etoile, France (A. Leblond); Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France (S. Pradier); and INRA ENVA ANSES, Maisons-Alfort (S. Pradier)

¹Current affiliation: Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1905.121003>

References

- Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24:469–89. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00064-10>
- de la Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Vicente J, Estrada-Peña A, Almazan C, et al. 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 Wildl Res*. 2004;50:187–96. <http://dx.doi.org/10.1007/s10344-004-0060-1>
- Leblond A, Pradier S, Pittel PH, Fortier G, Boireau P, Chadoeuf J, et al. An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in southern France [in French]. *Rev Sci Tech*. 2005;24:899–908.
- Beati L, Keirans JE. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol*. 2001;87:32–48.
- Halos L, Jamal T, Vial L, Maillard R, Suau A, Le Menache A, et al. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet Res*. 2004;35:709–13. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2004038>
- Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Petrovec M, Schaarschmidt-Kiener D, Liebisch G, et al. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. *J Clin Microbiol*. 2011;49:790–6. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02051-10>
- Bown KJ, Lambin X, Ogden NH, Begon M, Telford G, Woldehiwet Z, et al. Delimiting *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1948–54. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1512.090178>
- Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Parpaglia MLP, et al. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:6418–22. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.10.6418-6422.2005>
- de la Fuente J, Torina A, Caraccappa S, Tumino G, Furla R, Almazan C, et al. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. *Vet Parasitol*. 2005;133:357–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.063>
- Toledo A, Olmeda AS, Escudero R, Jado I, Valcarcel F, Casado-Nistal MA, et al. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81:67–74.

Address for correspondence: Amélie Chastagner, INRA, UR346 Epidémiologie Animale, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France; email: amelie.chastagner@clermont.inra.fr

West Nile Virus Lineage 2 Strain in Greece, 2012

To the Editor: West Nile virus (WNV) has been in Europe at least since the 1960s (1). Before 2010, WNV epidemics in Europe were caused mainly by lineage 1 strains. However, in 2010, a major WNV epidemic in Central Macedonia, Greece, was caused by a lineage 2 strain (Nea Santa-Greece-2010) (2).

This strain also circulated during 2011 (3), causing a second epidemic among humans throughout the country (4). Although the virus was closely related to the goshawk-Hungary-2004 strain circulating in Hungary, Austria, and Italy (5–7), severe epidemics occurred only in Greece; 273 cases of West Nile neuroinvasive disease (WNND) in humans were reported during the 2 seasons (2,4).

A third epidemic occurred in 2012, and 109 WNND cases were reported (8). Until mid-August, most cases were in central (Attica; 29 cases) and northeastern Greece (East Macedonia and Thrace; 10 cases). In contrast, during the same period, only 3 cases were confirmed at the location of the 2010 epidemic epicenter, in Central Macedonia (9). This situation led to the question of whether the Nea Santa-Greece-2010 strain was responsible for the third epidemic in Greece.

Technical Appendix 1. List of primers used for sequencing *Anaplasma phagocytophilum*. The primers were defined with the Primer-BLAST software.

Primers		Sequences (5' - 3')	Temperature of annealing	Fragment length (bp)
<i>16S_ external *</i>	<i>ge3a</i>	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	58°C	932
	<i>ge10r</i>	TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC		
<i>16S_ internal *</i>	<i>ge9f</i>	ACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT	58°C	544
	<i>ge2r</i>	GCAGTATTAAGCAGCTCCAGG		
<i>ankA - external</i>	forward	TGAGCCTCACCCGCAGCATG	72°C	540
	reverse	CTCTGCGTTGCTGGAGCCCC		
<i>ankA - internal</i>	forward	CTCACCCGCAGCATGTTG	66°C	534
	reverse	GTTGCTGGAGCCCCTTTATCC		
<i>msp 4 -external</i>	forward	TCGCTGCAATACGATTCCGA	66°C	1300
	reverse	GAGTCTTCCACCCATCGGTT		
<i>msp 4 ** -internal</i>	forward	TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG	66°C	849
	reverse	ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG		
<i>pleD- external</i>	forward	ACAAGTGGCCCTGAAGCAAT	66°C	1101
	reverse	TGCGTCGTAGCCTGTCTGCA		
<i>pleD- internal</i>	forward	TGCACTTTGCCGGAGATGGGT	69°C	576
	reverse	same of <i>pleD-external</i> reverse		
<i>typA - external</i>	forward	CCTGGACATGCTGACTTCGG	66°C	1455
	reverse	CGGCGGAACCTCACAG		
<i>typA - internal</i>	forward	TGCCTCTGAGGGCCCTATGCC	71°C	550
	reverse	AGCCCTTCCAGCCCTGCAAC		
<i>hemE-aph0021 - external</i>	forward	GCGATCCTGCCAAGGGTATT	66°C	1070
	reverse	AGCCCTAATTTCCGACCTTGC		
<i>hemE-aph0021 - internal</i>	forward	AGCGCTGTGTGCTTCTTCTGGT	66°C	537
	reverse	AGAGACGCGCTTCCAGCGA		

aph1099- aph1100	forward	ACAGTGCCCAACCTAGACGA	66°C	1453
- external	reverse	TGGAAGAACACGGTGGTTGC		
aph1099- aph1100	forward	GTTGCACATCCTGCTGGGGTGT	69°C	574
- internal	reverse	GCCCCTCTGCAGACAAAGAAGC		

* published by Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, et al. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(4):1090-5.

** published by De La Fuente J, Massung RF, Wong SJ, Chu FK, Lutz H, Meli M, et al. Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(3):1309-17.

All fragments were amplified by nested PCR. For the first PCR, each reaction contained 40 ng of total DNA in a solution of 25 µl with 1 U of Taq polymerase (Qiagen), 2 µl of each primer at 10 µM, 2 µl of dNTP at 25 mM, 5 µl of Q solution (Qiagen) and 1 µl of MgCl₂ at 25 mM. Tests were performed to choose optimal annealing temperatures. The PCR program began by an initial denaturation step of 3 min at 95°C, then 40 cycles consisted of a denaturing step of 30 s at 94°C, an annealing step of 30 s at the temperature corresponding to the target gene (see Table 2) and an extension step of 90 s at 72°C, and finally an extension step of 10 min at 72°C. The nested PCR was performed with 5 µl of the first PCR product in a total volume of 50 µL containing 2 U of Taq polymerase, 4 µl of each primer at 10 µM and 4 µl of dNTP at 25 mM. Nested cycling conditions were as described for the primary amplification.

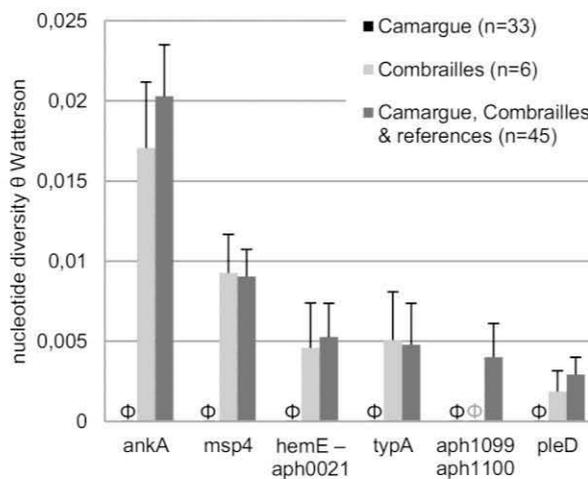
Technical Appendix 2. Number and percentage of ticks positive for *Anaplasma phagocytophilum* collected in Camargue (France) between 2007 and 2010.

Ticks species	No. positive / No. tested (% of positive)					
	Ticks questing in pastures		Ticks feeding on horses		Total	
<i>Rhipicephalus bursa</i>	3 / 12	(25)	19 / 247	(7.7)	22 / 259	(8.5)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	11 / 53	(20.7)	2 / 58	(3.4)	13 / 111	(11.7)
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	2 / 4	(50)	0 / 5	(0)	2 / 9	(22.2)
<i>Rhipicephalus pusillus</i>	0 / 9	(0)	0 / 1	(0)	0 / 10	(0)
<i>Dermacentor marginatus</i>	1 / 3	(33.3)	1 / 9	(11.1)	2 / 12	(16.7)
<i>Hyalomma marginatum</i>	0 / 0	(0)	1 / 5	(20)	1 / 5	(20)

Technical Appendix 3 : Verification of the nucleotide diversity of *Anaplasma phagocytophilum*, as calculated by use of the Watterson estimator

To verify the relevance of our loci as markers of *A. phagocytophilum* diversity, we compared the nucleotide diversity of *A. phagocytophilum* found in questing ticks collected in Camargue with that found in six questing *Ixodes ricinus* ticks collected in the Combrailles (Auvergne, Central France, HALOS 2010*); and with the totality of studied sequences that include two cognate sequence obtained in diseased horses from France, two American human strains (HGE and Webster) and one American roe deer strain ('CRT').

The nucleotide diversity was calculated with the Watterson estimator, $\hat{\theta} = K / \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$ with K the proportion of single nucleotide polymorphisms in the sequences. Diversity in Combrailles ticks showed that the markers used in this study were appropriated to describe significant level of diversity (see graph below)



Nucleotide diversity of *Anaplasma phagocytophilum* calculated with the Watterson estimator. n: number of sequences analyzed and Φ indicates the zero values. Length of the sequences analyzed: 462 pb for ankA, 709 pb for msp4, 457 pb for aph1099-aph1100, 477 pb for hemE-aph0021, 308 pb for typA and 471 pb for pleD.

* Halos L, Bord S, Cotte V, Gasqui P, Abrial D, Barnouin J, et al. Ecological factors characterizing the prevalence of Bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and Woodlands. Appl Environ Microbiol. 2010;76(13):4413-20.

ANNEXE 2 : Article en révision dans “Veterinary Research”

Three clusters of *Anaplasma phagocytophilum* genotypes from clinical cases of French cattle revealed by multilocus sequence analysis

Chastagner A. ¹, Dugat T. ², Vourc’h G. ¹, Verheyden H. ³, Legrand L. ⁴, Bachy V. ⁵, Chabanne L. ⁶, Joncour G. ⁷, Maillard R. ⁸, Boulouis H.-J. ², Haddad N. ², Bailly X. ¹ & Leblond A. ^{1,9}

1: INRA, UR346 Epidémiologie Animale, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

2: Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort, UMR BIPAR, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France

3: INRA, CEFS, UR035, 24 chemin de Borde Rouge - Auzeville, CS 52627, F-31326 CASTANET TOLOSAN, France

4: Frank Duncombe Laboratory; 1 Route de Rosel, 14053 Caen, France; EA 4655 U2RM – University of Caen Basse-Normandy, 14000 Caen, France

5: Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône, Campus vétérinaire VetAgro Sup, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l’Etoile, France

6: Université de Lyon, VetAgro Sup, Jeune Equipe Hémopathogènes Vectorisés, F-69280 Marcy l’Etoile, France

7: Groupe Vétérinaire de Callac, 26 rue du Cleumeur, 22160 Callac, France

8: Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Unité pathologie des ruminants, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

9: Département Hippique, VetAgroSup, F-69280, Marcy L’Etoile, France

Corresponding author: Amélie Chastagner at amelie.chastagner@clermont.inra.fr.

Abstract

Molecular epidemiology represents a powerful approach to elucidate the complex epidemiological cycles of multi-host pathogens, such as *Anaplasma phagocytophilum*, a tick-borne bacterium affecting a wide range of wild and domesticated animals. Here, we characterized the genetic diversity of *A. phagocytophilum* circulating in French cattle; we then compared the observed genotypes with those found in horses, dogs, and roe deer to determine whether genotypes of *A. phagocytophilum* are shared among different hosts.

We sampled 120 domesticated animals (104 cattle, 13 horses, and 3 dogs) and 40 wild animals (roe deer), and used multilocus sequence analysis on nine loci (*ankA*, *msp4*, *groESL*, *typA*, *pled*, *gyrA*, *recG*, *polA*, and an intergenic region) to characterize the genotypes of *A. phagocytophilum* present. Phylogenetic analysis revealed three genetic clusters of bacterial variants in domesticated animals. The two principal clusters included 98% of the bacterial genotypes found in cattle, which were only distantly related to those in roe deer. One cluster comprised only cattle genotypes, while the second contained genotypes from cattle, horses, and dogs. The third contained all roe deer genotypes and three cattle genotypes. Geographical factors could not explain this clustering pattern.

These results suggest that roe deer do not contribute to the spread of *A. phagocytophilum* in cattle in France. Further studies should explore if these different clusters are associated with differing disease severity in domesticated hosts. Additionally, it remains to be seen if the three clusters of *A. phagocytophilum* genotypes in cattle correspond to distinct epidemiological cycles, potentially involving different reservoir hosts.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, bovine granulocytic anaplasmosis, MLSA, *ankA*, *groEL*, *msp4*.

Introduction

Molecular characterization of the genetic diversity present within pathogen species provides valuable information that can be used to develop appropriate monitoring or control measures [1]. Understanding a pathogen's intraspecific genotypic diversity can aid in diagnosis, specifically by allowing the detection of different variants and, ultimately, the possibility of customizing treatments. Moreover, studies examining the host specificity of individual pathogen genotypes can aid in planning control measures for pathogens that circulate among multiple host species. For example, such measures could involve managing host diversity in order to reduce disease risk [2], as has occurred in the UK, where researchers have been exploring the genetics of the host-pathogen interaction between badgers and the tuberculosis-causing bacterium *Mycobacterium bovis* with an eye towards improving strategies for limiting tuberculosis in cattle [3]. Studies of genetic diversity can also clarify the epidemiology of vector-borne pathogens that, as a result of the low host specificity of their vector(s), circulate among multiple vertebrate hosts. Classic example of such vectors are found among ticks, which have different hosts during different developmental stages. This is especially the case for generalist tick species, such as *Ixodes ricinus* in western Europe, *Ixodes persulcatus* in eastern Europe, or *Ixodes scapularis* in the United States [4]. Transmission patterns of tick-borne pathogens can thus be quite complex and depend on a pathogen's ability to infect different host species. Initially, the *Ixodes*-borne pathogen *Borrelia burgdorferi* was thought to be a single bacterial species [5]. However, subsequent molecular characterization revealed the presence of multiple variants, each with a specific host range, a result that has highlighted the complexity of the epidemiological cycles of this tick-pathogen association [6].

Anaplasma phagocytophilum is a pathogen that raises similar questions. This tick-borne bacterium is the etiologic agent of granulocytic anaplasmosis, an emerging disease that affects a wide range of mammals [7, 8]. In cattle, it causes reduced milk yield, abortion, and immunosuppression, which facilitates secondary infections [9, 10]. At present, disease control is limited to treating symptomatic cases with antibiotics; little preventive action is taken, since both the source(s) of the pathogen and the environmental conditions that favor the infection of cattle remain poorly documented.

In the wild, *A. phagocytophilum* is highly prevalent and persistent in cervids, which are consequently considered to be a reservoir for this bacterium. In areas where *A. phagocytophilum* is endemic, its prevalence is commonly higher than 70% in both roe deer

(*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) populations [11, 12]. However, the strains carried by roe deer appear to be different from those carried by domesticated animals [13, 14]. Indeed, molecular studies have shown that different variants of *A. phagocytophilum* circulate among different hosts, which suggests that each bacterial strain could be associated with a different epidemiological cycle [15-17]. A thorough genetic characterization of *A. phagocytophilum* could help determine which hosts contribute to each cycle and, more importantly, which hosts promote the spread of the bacterium in cattle.

Various molecular techniques have been used to characterize the genetic diversity of *A. phagocytophilum*, including restriction fragment length polymorphism [18], pulsed-field gel electrophoresis [19], and multiple-locus variable number tandem repeat analysis [20]. Such techniques have yielded limited information due to either a lack of resolution (the two former techniques) or an excess of variability (the latter technique). The direct detection of polymorphism in DNA sequences has proven to be a more versatile method, and thus far, the characterization of *A. phagocytophilum* has been based on the sequencing of one or a few loci. The most frequently used markers, *groESL*, *ankA*, *msp4*, and 16S rRNA. All these markers except 16S rRNA revealed a high diversity but phylogenies based on single genes have yielded inconsistent results [13, 21, 22]. The use of seven or more markers can help resolve such phylogenetic incongruence. Different markers provide information that can be used to identify different genotypic groups, also called clonal complexes, that belong to a common lineage and that are closely related to each other [23]. Two recent studies have used this multilocus sequence typing approach to explore the intraspecific diversity of *A. phagocytophilum* in different host species; one examined dogs, sheep, roe deer, and humans in Europe [24], while the other investigated roe deer and red deer in Poland [25]. Using analyses of seven housekeeping genes and four loci, respectively, these studies have provided robust support for well-defined groups of strains.

In this study, we used multilocus sequence analysis to describe the genetic diversity of the *A. phagocytophilum* strains that infect cattle in France. We employed nine loci, including three commonly studied genes (*groESL*, *ankA*, and *msp4*), and six new markers. Using this approach, we investigated the genetic diversity of *A. phagocytophilum* strains responsible for clinical cases of bovine granulocytic anaplasmosis throughout the country with a view towards identifying the bacterial variants circulating within the cattle population. Then, in order to determine additional host species that could be involved in the circulation of bovine strains, the genotypes associated with the bovine clinical cases were compared to the

genotypes circulating in horses, dogs, and roe deer in France. We discuss our results in the context of other studies that have investigated *A. phagocytophilum* genetic diversity in different reservoirs.

Materials and Methods

Samples

All animal samples were collected in France between 2011 and 2013. We obtained samples from clinically ill domesticated animals via the network of veterinary clinics belonging to the French national association SNGTV (Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires), and governmental veterinary laboratories. Blood and DNA were sampled from 104 cattle, 13 horses, and 3 dogs, which had all tested positive for granulocytic anaplasmosis after they had begun expressing clinical symptoms associated with the disease. Contemporaneously, blood and spleen samples were taken from wild and captive-bred roe deer sampled as a result of deer management efforts and a population monitoring study. In total, 40 roe deer representing 3 regions were included in our study (Suppl. Mat. 1).

Whole blood samples were stabilized with EDTA, and 200 μ l of each sample was used in the DNA extraction procedure, which took place in a silica column and employed a Nucleospin Blood QuickPure Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions.

The presence of *A. phagocytophilum* was assessed in each clinical sample with real-time PCR, using a protocol adapted from Courtney et al (2004 [26]) that targeted the *msp2* and *p44* genes. The reaction mix included 5 μ l of DNA extract, 10 μ l SsoFast Supermix (Biorad, Hercules, California), 2 μ l of each primer (10 μ M ApMSPf and ApMSP2r), and 0.5 μ L of the Taqman probe ApMSP2p-HEX (10 μ M), in a total volume of 20 μ l.

Selection of loci

To characterize the genetic diversity of the bacteria causing the infections, we chose nine loci that are evenly distributed across the genome of *A. phagocytophilum*. These loci included *ankA*, *msp4*, and *groESL*, which have frequently been used to characterize the diversity of *A. phagocytophilum*, and six other loci that were specifically selected for this analysis. As the only *A. phagocytophilum* genome that was available at the beginning of this study was that of

strain HZ (GenBank: NC_007797.1), we chose the six new loci by comparing the HZ genome with the genomes of *Anaplasma marginale* (strains St. Maries GenBank: NC_004842.2 & Florida GenBank: NC_012026.1) and the *Anaplasma centrale* Israel strain (GenBank: NC_013532.1) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>]. In particular, we looked for markers shared among the strains of *Anaplasma* and identified six targets: three house-keeping genes (*gyrA*, *polA*, and *recG*), a gene coding for a GTP-binding protein (*typA*), a gene encoding a response regulator linked to intracellular infection [*pleD*, 27], and an intergenic spacer located in a region of high synteny (*APH_1099-APH_1100*). The biological function of the selected genes was not the principal criterion in locus selection.

Locus-specific amplification of DNA

Because of the low bacterial load within the blood samples, we first increased the amount of DNA so that more would be available for the amplification of the molecular markers. Multiple displacement amplification (MDA) was performed on positive samples using the Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) in accordance with the manufacturer's recommendations. The DNA solution obtained was diluted in 80 μ l of purified water.

Each locus was then amplified using nested PCR. In the first PCR, each reaction used 5 μ l of pre-amplified DNA in a total reaction volume of 50 μ l. The reaction mix included 2 units of Taq polymerase (Qiagen, Venlo, Netherlands), 4 μ l of each primer (at a concentration of 10 μ M), 4 μ l of dNTPs (at a concentration of 25 mM), 10 μ l of Q solution (Qiagen), and 2 μ l of 25-mM MgCl₂. Prior to sample amplification, tests were performed to optimize the annealing temperatures. The PCR program began with an initial denaturation step of 3 min at 95°C. This was followed by three cycles that consisted of a denaturation step of 1 min at 95°C, an annealing step of 2 min at the temperature corresponding to each primer pair (Suppl. Mat. 2), and an extension step of 90 s at 72°C; then 40 cycles that differed from the first three by having a denaturation step of 1 min at 88°C; and an extension step of 10 min at 72°C. The nested PCR was performed using 5 μ l of the product of the first PCR in a total volume of 50 μ L, with the same mix and cycling conditions as in the primary amplification.

DNA sequencing and alignment

Nucleotide sequences were obtained from PCR products using Sanger sequencing (Beckman Coulter Genomic, Essex, UK). When PCR amplification with the external primers was

successful in recovering a sufficient amount of PCR product for sequencing, we sequenced this longer fragment. However, when it was unsuccessful, the shorter fragment obtained from the nested PCR was used. For DNA fragments longer than 1000 bp, sequencing was performed on both strands. Base calls were checked manually in ChromasLite version 2.1, and IUPAC codes were used to indicate ambiguous states. DNA sequences were aligned using the '*Clustal Omega*' algorithm in SeaView version 4. The sequences analyzed in this study are available in Genbank under the accession numbers KJ832158-KJ833031.

Single-locus polymorphism analyses

Loci were amplified with differing degrees of success because bacterial DNA concentrations varied across samples and the primers showed differing sensitivity to individual sequences. For this reason, each locus was initially examined independently in the polymorphism analyses. All samples were retained even if they had not yielded sequences for all target loci. Only the shortest sequences and those containing ambiguous sites were excluded.

To estimate polymorphism at each locus, DnaSP 5.10 software was used to calculate haplotype diversity (H_d , the number of variable nucleotide sites), and nucleotide diversity (π , the average number of nucleotide differences per site between two sequences). We also investigated the potential impact of recombination on our alignments by calculating minimum recombination values (R_m).

Phylogenetic tree building

Unless otherwise indicated, the following analyses were carried out with the packages 'ape,' 'ade4,' and 'fpc' in R v2.15.1.[28]

For each locus, we first used the alignment constructed for the polymorphism analyses to build a DNA distance matrix, and using a bio++ algorithm to integrate the parameters of the best model of evolution for that alignment (selected with the Akaike Criterion (AIC) value calculated using the `phymtest` function in 'ape'). Using this DNA distance matrix, a phylogenetic tree was built with the `bionj` function in 'ape.' When available, similar analyses were performed using homologous data obtained from GenBank (data not shown).

Then, we restricted the alignment of each locus (except that of *ankA*) to samples for which at least five out of eight loci had been successfully sequenced in order to create a consensus tree (or supertree). As before, the AIC of each locus was calculated from the restricted dataset to select the best model of sequence evolution. Then, the alignments were concatenated into a single alignment. A supertree was built from the concatenated alignment with MrBayes 3.2 software, using a Bayesian method of construction that has been developed to highlight the information provided by the different markers while optimizing a tree structure [29]; this method has been shown to be robust even when more than 50% of the data are missing [30].

The data were partitioned in MrBayes, and the respective best model of evolution was applied to each partition. Three runs of 500,000 generations were performed using a Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMCMC) approach based on six chains. Trees were sampled from the main chain every 500 generations. Assuming that convergence had not been reached, the first 25% of sampled trees were removed. Then, using the remaining trees, a consensus tree was generated from the 25% of trees with the highest posterior probabilities among the three runs. The robustness of the phylogenetic relationships among genotypes was evaluated using the Bayesian posterior probability of branches.

Phylogenic analyses

The presence of clusters in the phylogenic consensus tree was evaluated using a hierarchical clustering analysis (the `hclust` function in R). The number of clusters was determined using the minimum sum of squared errors and confirmed with the functions `pamk` and `kmeans` in the 'fpc' package. Each sample present in the consensus tree was assigned to one cluster. The clusters from the consensus tree were mapped onto the *ankA* phylogenic tree in order to compare the two phylogenic structures.

To explore if DNA polymorphism at each locus was linked with either host origin or the clusters identified in the consensus tree, a discriminant analysis was performed on the principal coordinate analysis of the DNA distance matrices using the `dudi.pco` function in the 'ade4' package.

Results

Polymorphism analyses

All the results of the polymorphism analyses are summarized in Table 1.

The sequence lengths of the alignments ranged from 333 to 837 bp, excluding gapped and missing sites (837 bp for *gyrA*, 630 bp for *groESL*, 654 bp for *ankA*, 597 bp for *pleD*, 462 bp for *typA*, 390 bp for *msp4*, 351 bp for *recG*, and 333 bp for *polA*). Haplotype diversity ranged from 0.565 to 0.983, with an average diversity of 0.827. The loci *msp4*, *gyrA*, *groESL*, and *ankA* demonstrated above-average haplotype diversity, while the haplotype diversity of *APH_1099-1100*, *recG*, and *pleD* was below average.

We treated *ankA* differently than the other loci because it is composed of four very divergent regions. Its overall average nucleotide diversity was 0.2; however, when we examined this locus more closely, we found that, while the start and the end regions of its sequences were obviously homologous, more than 50% of sites were polymorphic. As a result, it was difficult to estimate nucleotide diversity and the number of recombination events for the locus as a whole. Consequently, we chose to examine the sequences of the four clusters (named I to IV) separately.

When all loci were taken into account (including *ankA* I-IV), intralocus nucleotide diversity ranged from 4.7×10^{-3} to 2.3×10^{-2} , with an average of 1.8×10^{-2} nucleotides per site. The values for *msp4*, *groESL*, *pleD*, and *ankA* I-IV were higher than the mean, while *recG* and *gyrA* had the lowest diversity, with 4.7×10^{-3} and 4.3×10^{-3} nucleotide differences, respectively, per site between pairs of sequences.

Phylogenetic trees and analyses

The supertree was composed of 93 bacterial sequences, obtained from 72 cattle, 9 horses, 4 roe deer, and 3 dogs (Fig. 1). Within the tree, the cluster analysis revealed the presence of three genetic groups. Cluster A included all the roe deer and two cattle genotypes (BR-BO-46 and BR-BO-08); cluster B was composed exclusively of cattle genotypes; and cluster C was composed of the horse, dog, and remaining cattle genotypes. No obvious geographical patterns were observed in the clustering of the different genotypes (Fig. 2). However, we could not test the correlation between geographical and phylogenetic distance because of the

low number of individual samples per host species, as well as the dispersion and the lack of precise information about sample location.

The ankA phylogeny generated here was structured in four clusters (designated I, II, III, and IV), as has been previously described [13]. For 95% of the genotypes, the pattern of clustering in the ankA phylogeny highly resembled that of the supertree. In general, the genotypes of supertree cluster A grouped in ankA cluster II; the genotypes of supertree cluster B grouped in ankA cluster IV; and the genotypes of supertree cluster C grouped in ankA cluster I. Only four genotypes, all isolated from cattle, were found in a different cluster in the supertree than in the ankA phylogeny (BR-BO-09, RA-BO-03, BR-BO-14, and NO-BO-26). However, although the phylogenetic relationships were topologically similar between the supertree and the ankA tree, the phylogenetic distances between the clusters were very different. For example, we observed fewer than 0.05 substitutions per site between clusters B and C in the supertree, whereas the inferred divergence between clusters I and IV in the ankA tree (which contained the same genotypes) was nearly one substitution per site.

In the past, ankA cluster II had been reported to contain *A. phagocytophilum* genotypes isolated exclusively from ticks, roe deer, and red deer. However, our study found three cattle genotypes (BR-BO-46, BR-BO-08 and BR-BO-63) in this cluster, which, to our knowledge, is a novel finding. Our data concur with previously published results in supporting the idea that ankA cluster III only includes variants found in roe deer: six genotypes from roe deer (which were not included in the supertree) grouped in this cluster [13]. The discriminant analysis revealed an association between host species and phylogenetic distance between genotypes, which has not been found in the phylogenies of each of our other markers.

The different phylogenetic trees built from single gene alignments were not directly comparable to each other, because of both conflicting phylogenetic signals and missing data. Indeed, we only managed to sequence all nine loci for 11 genotypes. However, in each phylogenetic tree, the genotypes obtained from roe deer clustered in one or two branches that were only distantly related to most other genotypes (Suppl. Mat. 3). This clustering of roe deer genotypes was also supported by the discriminant analysis of all the loci (Suppl. Mat. 4). In general, the clusters identified in the supertree were not observed in the single-locus phylogenies, with the exception of the pleD phylogeny.

Discussion

Highly resolved genetic data are important in the quest to decipher potentially genotype-dependent components of epidemiological cycles, sources and chains of transmission, and spatial distributions of diseases. In this study, we characterized the diversity of *A. phagocytophilum* genotypes found in cattle employing a combination of three commonly used markers and six new ones; the new markers were included in order to improve the degree of resolution of our genotyping efforts. We constructed a supertree based on eight of those markers and compared its structure with that of a tree based on the *ankA* gene, which is linked to infection. In both trees, bovine *A. phagocytophilum* genotypes grouped into three major clusters. This finding strongly supports the existence of major genetic lineages in populations of *A. phagocytophilum*, a pattern that is probably due to host adaptation.

Our results support the value of these markers in studying the genetic diversity of *A. phagocytophilum*. Indeed, the degree of polymorphism present at the loci used in this study allowed us to characterize multilocus genotypes that correspond to most of the *ankA* groups described in the literature. The average pairwise divergence among genotypes (i.e., π) in our samples was lower for the new loci (*typA*, *gyrA*, *pleD*, *recG*, *polA*, and the intergenic spacer APH_1099-APH_1100) than it was for *groESL* and *msp4*, and it was much lower than *ankA* values, suggesting that the new genes we chose contain relevant phylogenetic information. Haplotype diversity, which represents the probability of finding different alleles in a pair of samples, was similar across most loci, with an average value of 0.8. This result also suggests that the added loci contributed to our ability to discriminate among genotypes of *A. phagocytophilum*.

Because of the unusual pattern of genetic diversity at the *ankA* locus, it was used to construct a separate tree, an approach that has been applied in other studies. The *ankA* locus is a widely used marker that enables large-scale genetic delineation among genotypes of *A. phagocytophilum*. Previous studies of *ankA* diversity have found that four highly divergent groups—designated groups I, II, III, and IV—exist within *A. phagocytophilum* [13]. The topology of our *ankA* phylogeny reflected this same grouping. However, the specific evolutionary constraints of *ankA* have resulted in a degree of genetic divergence among groups that is too high to allow detailed inference about phylogenetic relationships among *A. phagocytophilum* lineages (e.g., up to one substitution per site has been inferred between

clusters I and IV); likewise, within-group diversity is too low to provide an informative degree of resolution.

As expected from previous studies [31], the other single-gene phylogenetic analyses resulted in different topologies. However, regardless of the gene under consideration, alleles isolated from roe deer always grouped in one or two clusters that were distantly related to all other genotypes. There are several potential explanations for the phylogenetic incongruencies we observed among the single-tree phylogenies. First, they may reflect a lack of resolution resulting from the small number of informative sites per locus [23]. This could explain, for example, the presence of polytomies in the phylogenetic tree based on *typA*. Another potential explanation is the presence of recombination events. Indeed, when we calculated the minimum recombination values, we found that our different markers may have experienced recombination events, and this has the potential to bias the inference of phylogenetic relationships. This problem has already been reported in a phylogenetic study based on *msp4* and *ankA* markers [32, 33]. Finally, the incongruencies we observed could also be the result of some individuals being co-infected by multiple strains [34]. In such cases, the phylogenetic location of the sample isolated from an individual host would vary across the single-locus trees because the sequenced loci would have been obtained from different, co-infecting strains. In our data, the presence of ambiguous sites in some chromatograms suggests that multiple strains may have been present in some samples. This problem appeared to rarely affect the cattle samples but may have involved around 30% of the roe deer samples. We thus excluded all samples that presented ambiguous sites in at least one locus to avoid the risk of incongruence between loci.

While the single-gene phylogenies may have yielded inconsistent results because of these three factors, we employed another approach that uses several markers, and the phylogenetic information they contain, to generate robust genotype clusters [23]. Indeed, the supertree approach, here based on a Bayesian method of construction, was designed to highlight the common information revealed by markers while optimizing tree structure [29]. Moreover, building supertrees is commonly used to deal with the problem of missing data [35], which is another recurring problem in *A. phagocytophilum* studies, since amplification success in naturally infected samples can be lower than 30% [17]. However, the dataset used to build our supertree contained less missing data and thus allowed us to obtain an informative clustering pattern [30, 36].

In our supertree, we identified three divergence-based clusters that almost perfectly matched the topologies of ankA groups I, II, and IV [13]. Unfortunately, we were not able to include the roe deer genotypes assigned to ankA cluster III in our supertree; their inclusion would have allowed us to further investigate the distribution of ankA alleles among *A. phagocytophilum* lineages and represents an interesting future research goal. From a phylogenetic point of view, the relationships among strains were more clearly resolved in the supertree than in the ankA phylogeny. This was the case even though most of the inner branches of the supertree were not as robustly supported, which was to be expected given the issues discussed above [30]. However, the various divergence-based clusters do not represent monophyletic groups in the supertree. The discovery of a related outgroup or the acquisition of more phylogenetic information could give further insight into the evolution of lineages within *A. phagocytophilum*.

The similar genetic clusters formed in both the supertree and the ankA tree further support the idea that major genetic lineages exist within populations of *A. phagocytophilum*. The three clusters in our supertree appear to each be linked to a different community of host species: cluster B was composed exclusively of cattle genotypes; cluster C was composed of genotypes found in cattle, horses, and dogs; and cluster A was composed of the all roe deer genotypes and two genotypes found in cattle. The strain divergence we observed may be explained by three factors. First, there may be epidemiological differences (e.g., different host reservoirs or vector species) leading to different epidemiological cycles [17, 37, 38]. Second, hosts may differ in their susceptibility, which could lead to the emergence of bacterial genotypes with different levels of virulence [39]. Third, different lineages may have emerged or evolved in different geographical areas [40]. Among these three possibilities, the first—that strain epidemiology may differ—seems to be the most supported by our results.

The hypothesis that different strains have different epidemiological cycles is supported by the observation that the topologies of the single-gene trees based on pleD and ankA, two genes known to be involved in the infection process, showed the same clustering pattern as the supertree. The former is one of three response regulators of pleC, a gene predicted to encode a sensor kinase. Both pleC and pleD are synchronously upregulated during the exponential growth stage of *A. phagocytophilum* and downregulated prior to extracellular release in human patients [27]. The latter encodes an effector protein secreted by the type IV

secretion system that has been implicated in several infection processes; in particular, AnkA facilitates intracellular infection by activating the Abl-1 signaling pathway [41] and by manipulating host cell processes in its interactions with the *Anaplasma* translocated substrate 1 (Ats-1) protein [42]. Furthermore, ankA interacts with other gene regulatory regions of host chromatin to downregulate expression of key host defense genes like CYBB (gp91^{phox}) [43]. From a phylogenetic point of view, genes involved in the infection process are highly relevant because selective pressures applied to those genes could promote host specialization. Indeed, phylogenetic analyses of ankA have identified clusters that are strongly linked to specific communities of hosts, e.g., clusters II and III are composed predominantly of strains isolated from roe and red deer [13], while the recently described cluster V includes only strains obtained from rodents [33]. However, it may also be that the evolution of *A. phagocytophilum* as a species is driven by two opposing selective pressures, one towards specialization in a given host species and the other favoring a broader host range [44, 45]. The close association between the ankA-based genetic clusters and host communities indicates that there may be a barrier to cross-species transmission due to the host-specific nature of infection pathways. This relationship also suggests that the optimized fitness of a strain in one host species comes at the cost of lower fitness when the strain infects other species. An alternative evolutionary strategy could involve infecting a large number of susceptible species in order to persist longer in host communities, a strategy that could prove especially useful if the species composition of the community varies over time. Assuming that different bacterial variants have the opportunity to come in contact with different host species, the ability of a given *A. phagocytophilum* genotype to infect different host species would be key to its persistence in the local community. Selection may also favor an intermediate strategy—the maintenance of a diversity of variants with overlapping host ranges, which is what we found here, with three clusters of genotypes that each contained cattle-infecting strains. Other studies have shown that it is possible for populations of *A. phagocytophilum* to demonstrate co-existing epidemiological cycles, with different genotypes infecting different sets of hosts [12, 17, 37]. In this case, the divergence among strains would be linked to adaptation to different sets of hosts rather than to a single species [45].

The second hypothesis is that differences in host susceptibility have led to the emergence of divergent *A. phagocytophilum* genotypes demonstrating different degrees of virulence. If genetic variation underlies the virulence of *A. phagocytophilum* genotypes, this fact may explain the variety of symptoms that have been described in cattle, including edema,

fever, abortion, as well as acute or chronic symptoms [10]. Mathematical models support the idea that pathogen strains that differ in their degree of virulence can emerge within a single host species [39]. However, this outcome requires that a large variation exists in individual susceptibility within that species, as a result of vaccination, for example. In contrast, the emergence of polymorphism in virulence is easier to observe in multi-host systems [46], where a shift in the pathogen's host range would likely involve a concomitant evolutionary shift in virulence, as limited transmission between the respective reservoirs of different genotypes might eventually lead to variation in virulence. Consistent with this hypothesis is the observation that different *A. phagocytophilum* genotypes isolated from different host species showed different degrees of virulence when they were used to experimentally infect lambs [47] and mice [48]. In this study, we found that the phylogenetic clustering of genotype groups in the supertree mirrored that of the single-gene trees that were based on infection-related genes; this pattern strongly suggests that the evolution of *A. phagocytophilum* genotypes is influenced by selective pressures on genes that regulate infection. The genetic variation in these genes that we observed may well be linked to variation in virulence, and it is possible that the different strains sampled in our study provoke different symptoms that are related to the genotype clusters to which the strains were assigned. However, since we lacked sufficient detailed information about the individual symptoms of each host animal, we were not able to test this hypothesis.

The third hypothesis states that genetically divergent strains of *A. phagocytophilum* may have evolved in different geographic regions. However, this hypothesis is not supported by our data, as we did not observe clear, broad-scale heterogeneity in the spatial distribution of the genotypes (Fig. 2). It is nonetheless important to note that spatial (environmental or geographical) factors could structure pathogen populations through drift or through changes in the host community involved in the transmission cycle. For example, in the Camargue and in Sardinia, there exists a genotype of *A. phagocytophilum* that is very similar to genotypes found in the US, which suggests that environmental conditions due to the Mediterranean climate favor the dispersion of this genotype [32, 49]. Similarly, it has been hypothesized that host distribution and other environmental constraints influence the local distribution of *A. phagocytophilum* lineages in Sicily [50]. In this study, however, we did not observe any clear clustering of genotype groups that could be attributed to geographical boundaries. Divergence among clusters is thus more likely explained by a difference in host communities rather than by geographical factors.

Consequently, of the three hypotheses discussed above, this study found support only for the first: that the genotype clustering we observed stems from strains having different epidemiological cycles. Therefore, we will further discuss the three clusters of *A. phagocytophilum* genotypes found in cattle working from the assumption that they are the result of three independent epidemiological cycles.

In the supertree, clusters A, B, and C all included genotypes isolated from cattle. Within the latter, a subgroup of genotypes corresponded to those found in ankA cluster I. This subgroup contained genotypes associated with cattle as well as genotypes associated with dogs and horses. Although we had relatively few equine and canine samples, these results are consistent with those previously reported for ankA [13]. Furthermore, a recent study also showed that this cluster of ankA genotypes includes not only strains that infect horses and dogs, but also those that infect other hosts such as humans, wild boar (*Sus scrofa*), hedgehogs (*Erinaceus europaeus*), and red deer [24]. Since *A. phagocytophilum* has high levels of prevalence in red deer and hedgehogs (approximately 60% and 80% of individuals are infected, respectively [14, 51-53]), further quantitative surveys are needed to assess whether these hosts play a role in the spread of this *A. phagocytophilum* strain in cattle.

In our analysis, supertree genotype cluster B, corresponding to ankA cluster IV, contained only strains isolated from cattle, although previous studies have reported related genotypes in sheep and, rarely, in roe and red deer [13, 33]. The seemingly low level of prevalence of this bacterial lineage in wild mammals raises questions about the role of these animals in the spread of this genotype. Livestock are not generally thought of as reservoir species for *A. phagocytophilum* because they only sporadically exhibit clinical symptoms of anaplasmosis. However, a serological survey in cattle herds indicated that pathogen prevalence may be high—it varied from 31 to 77% at different times of the year [54]. Furthermore, longitudinal surveys in cattle herds have suggested that the immunity acquired following exposure to *A. phagocytophilum* does not suffice to prevent subsequent infection but is sufficient to prevent clinical signs of disease, which could result in a high proportion of asymptomatic carriers [55]. Interestingly, experimental studies have shown that *A. phagocytophilum* can persist in “reservoir tissues” in sheep; while they may be persistent carriers, PCR analyses of their blood will fail to detect infection [56]. It is possible that the bacteria present in “reservoir tissues” periodically circulate in the blood and infect feeding ticks. This possibility underscores the need for further experimental studies on

A. phagocytophilum infection in cattle: if the same process occurs in cattle, the bovine population could act as a reservoir.

Finally, a few bovine genotypes were found in cluster A of the supertree, which corresponds to ankA cluster II. In the multi-gene phylogeny, this group was relatively distantly related to the others and was dominated by genotypes from roe deer. From an epidemiological point of view, it is likely that roe deer contribute to the spread of *A. phagocytophilum*, if only because the pathogen is highly prevalent in roe deer populations [up to 70% of infection detected by PCR, 11, 12]. From a genetic point of view, a phylogenetic analysis of ankA indicated that the genotypes carried by roe deer and a few red deer were genetically distant from the genotypes carried by other host species [13]. Similarly, previous studies using groESL have indicated that the strains carried by roe deer are different from the strains found in other hosts [14]. Finally, a recent study showed that both MLST genotypes and ankA sequences supported the existence of a roe deer-associated group of *A. phagocytophilum* genotypes [24]. Taking into account more than 800 ankA sequences and 380 MLST-characterized sequences found in the literature, we report here, for the first time, that strains isolated from cattle are present within this cluster. Our results suggest that, however rare it may be, transmission can occur between cattle and roe deer and may be due to a spillover effect.

In conclusion, we used multilocus sequencing to describe the genetic diversity of *A. phagocytophilum* strains causing clinical illness in domesticated animals in France; in doing so, we discovered the presence of three groups of genotypes. These groups show a cross-country distribution and are probably associated with different host communities, an observation that suggests that *A. phagocytophilum* is propagated through different epidemiological cycles that involve different reservoir and host species. In order to gain further insights into the population dynamics of this bacterial pathogen, future epidemiological studies are needed that take place on a subregional scale and that focus on different potential reservoirs, domesticated hosts, and lineages of *A. phagocytophilum*. Furthermore, as such a sampling scheme would be difficult to carry out, epidemiological modeling is also required to determine the number of infected individuals that should be sampled within a potential reservoir species to adequately describe pathogen flow. In addition, the detection and characterization of asymptomatic cases in cattle, whether these

cases are due to variation in pathogen virulence or to differences in symptom manifestation in different hosts, represents an important research path to explore. In particular, the existence of healthy carriers that contribute to the maintenance and spread of virulent strains could have serious implications for efforts aimed at limiting bovine granulocytic anaplasmosis.

Authors' contributions

AL, XB, VG participated in the design and coordination of the study and drafting the manuscript. DT, VH, LL, BV, CL, JG, MR, BH-J, HN contributed to data collection and help to draft the manuscript. AC carried out all experiments and analysis, contributed to data collection and drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank the teams of the LABÉO – Frank Duncombe, LDA 22, and LVD 69 for generously providing DNA extracts and blood samples from domesticated animals; the members of SNGTV for actively helping us to obtain samples from domesticated animals; Magalie René-Martellet and Jeanne Chêne for providing the dog samples; the members of the SAGIR network, which collected the roe deer samples; Lindsay Higgings and Jessica Pearce-Duvet for proofreading the manuscript; Nelly Dorr for creating the databases used in this study; and Angélique Pion and Valérie Poux, who were involved in laboratory work. Finally, we thank the French National Research Agency, which funded this work through the OSCAR project.

References

1. van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M: **Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology.** Clinical Microbiology Reviews 2001, **14**:547-560.
2. Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS: **Effects of species diversity on disease risk.** Ecology Letters 2006, **9**:485-498.
3. Biek R, O'Hare A, Wright D, Mallon T, McCormick C, Orton RJ, McDowell S, Trewby H, Skuce RA, Kao RR: **Whole genome sequencing reveals local transmission patterns of Mycobacterium bovis in sympatric cattle and badger populations.** PLoS pathogens 2012, **8**:e1003008.
4. Anderson JF: **Epizootiology of Borrelia in Ixodes tick vectors and reservoir hosts.** Review of Infectious Diseases 1989, **11**:S1451-S1459.
5. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Omstein K, Strle F, Gray J: **Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe.** Clinical Microbiology and Infection 2011, **17**:69-79.
6. Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schäfer SM, Sewell H-S, Brade V, Kraiczy P: **Host association of Borrelia burgdorferi sensu lato—the key role of host complement.** Trends Microbiol 2002, **10**:74-79.
7. Woldehiwet Z: **The natural history of Anaplasma phagocytophilum.** Vet Parasitol 2010, **167**:108-122.
8. Stuen S, Granquist EG, Silaghi C: **Anaplasma phagocytophilum - a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies.** Frontiers in cellular and infection microbiology 2013, **3**.
9. Macleod J, Gordon WS: **Studies in tick-borne fever of sheep. I. Transmission by the tick, Ixodes ricinus, with a description of the disease produced.** Parasitology 1933, **25**:273-283.
10. Joncour G, Pouliquen G, Kaufmann P, Mayaux P: **Anaplasma phagocytophilum, agent de l'éhrlichiose granulocytaire bovine (EGB) et avortements chez les bovins.** Bulletin des GTV 2006, N°25:95 - 104.
11. Petrovec M, Bidovec A, Sumner JW, Nicholson WL, Childs JE, Avsic-Zupanc T: **Infection with Anaplasma phagocytophila in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages.** Wien Klin Wochenschr 2002, **114**:641-647.
12. Silaghi C, Hamel D, Thiel C, Pfister K, Passos LMF, Rehbein S: **Genetic variants of Anaplasma phagocytophilum in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria.** Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2011, **11**:355-362.
13. Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Petrovec M, Schaarschmidt-Kiener D, Liebisch G, Runge M, Ganter M, Kehl A, Dumler JS, et al: **Distinct host species correlate with Anaplasma phagocytophilum ankA gene clusters.** Journal of Clinical Microbiology 2011, **49**:790-796.
14. Rymaszewska A: **Divergence within the marker region of the groESL operon in Anaplasma phagocytophilum.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008, **27**:1025 - 1036.
15. Foley J, Nieto NC, Madigan J, Sykes J: **Possible differential host tropism in Anaplasma phagocytophilum strains in the Western United States.** Annals of the New York Academy of Sciences 2008, **1149**:94-97.
16. Rikihisa Y: **Mechanisms of obligatory intracellular infection with Anaplasma phagocytophilum.** Clinical Microbiology Reviews 2011, **24**:469-489.
17. Rejmanek D, Bradburd G, Foley J: **Molecular characterization reveals distinct genospecies of Anaplasma phagocytophilum from diverse North American hosts.** Journal of Medical Microbiology 2012, **61**:204-212.
18. Alberti A, Sparagano OA: **Molecular Diagnosis of Granulocytic Anaplasmosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia by PCR-RFLP.** Annals of the New York Academy of Sciences 2006, **1081**:371-378.
19. Dumler J, Asanovich K, Bakken J: **Analysis of genetic identity of North American Anaplasma phagocytophilum strains by pulsed-field gel electrophoresis.** Journal of Clinical Microbiology 2003, **41**:3392-3394.

20. Bown K, Lambin X, Ogden N, Petrovec M, Shaw S, Woldehiwet Z, Birtles R: **High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis.** J Clin Microbiol 2007, **45**:1771 - 1776.
21. Liz J, Anderes L, Sumner J, Massung R, Gern L, Rutti B, Brossard M: **PCR detection of granulocytic ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks and wild small mammals in western Switzerland.** J Clin Microbiol 2000, **38**:1002 - 1007.
22. De La Fuente J, Massung RF, Wong SJ, Chu FK, Lutz H, Meli M, von Loewenich FD, Grzeszczuk A, Torina A, Caracappa S, et al: **Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains.** Journal of Clinical Microbiology 2005, **43**:1309-1317.
23. Maiden MCJ, van Rensburg MJJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND: **MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics.** Nat Rev Micro 2013, **11**:728-736.
24. Huhn Christian , Winter Christina , Wolfspurger Timo , Wüppenhorst Nicole , Smrdel Katja Strašek , Skuballa Jasmin , Pfäffle Miriam , Pctncy Trevor , Silaghi Comelia , Dyachenko Viktor , et al: **Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing** Plos One 2014.
25. Rymaszewska A: **Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from Poland for Selected Genes.** Folia Biologica 2014, **62**:35-46.
26. Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF: **Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*.** Journal of Clinical Microbiology 2004, **42**:3164-3168.
27. Lai T-H, Kumagai Y, Hyodo M, Hayakawa Y, Rikihisa Y: **The *Anaplasma phagocytophilum* PleC Histidine Kinase and PleD Diguanylate Cyclase Two-Component System and role of Cyclic Di-GMP in host cell infection.** Journal of Bacteriology 2009, **191**:693-700.
28. R Development Core Team (2008). **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
29. Criscuolo A, Berry V, Douzery EJP, Gascuel O: **SDM: A Fast Distance-Based Approach for (Super)Tree Building in Phylogenomics.** Systematic Biology 2006, **55**:740-755.
30. Philippe H, Snell EA, Baptiste E, Lopez P, Holland PWH, Casane D: **Phylogenomics of Eukaryotes: Impact of Missing Data on Large Alignments.** Molecular Biology and Evolution 2004, **21**:1740-1752.
31. Silaghi C, Liebisch G, Pfister K: **Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases.** Parasites & Vectors 2011, **4**.
32. Chastagner A, Bailly X, Leblond A, Pradier S, Vourc'h G: **Single genotype of *Anaplasma phagocytophilum* identified from ticks, Camargue, France** Emerging Infectious Diseases 2013.
33. Majazki J, Wuppenhorst N, Hartelt K, Birtles R, von Loewenich F: ***Anaplasma phagocytophilum* strains from voles and shrews exhibit specific ankA gene sequences.** BMC Veterinary Research 2013, **9**:235.
34. Ladbury GAF, Stuen S, Thomas R, Bown KJ, Woldehiwet Z, Granquist EG, Bergström K, Birtles RJ: **Dynamic transmission of numerous *Anaplasma phagocytophilum* genotypes among lambs in an infected sheep flock in an area of anaplasmosis endemicity.** Journal of Clinical Microbiology 2008, **46**:1686-1691.
35. Bininda-Emonds OR: **The evolution of supertrees.** Trends in Ecology & Evolution 2004, **19**:315-322.
36. Wiens JJ: **Combining data sets with different phylogenetic histories.** Systematic Biology 1998, **47**:568-581.
37. Bown KJ, Lambin X, Ogden NH, Begon M, Telford G, Woldehiwet Z, Birtles RJ: **Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, Discrete enzootic cycles.** Emerging Infectious Diseases 2009, **15**:1948-1954.
38. Rejmanek D, Freycon P, Bradburd G, Dinstell J, Foley J: **Unique strains of *Anaplasma phagocytophilum* segregate among diverse questing and non-questing Ixodes tick species in the western United States.** Ticks Tick-Borne Dis 2013, **4**:482-487.

39. André JB, Gandon S: **Vaccination, within - host dynamics, and virulence evolution.** *Evolution* 2006, **60**:13-23.
40. Zhaoqing Y, Miao J, Huang Y, Li X, Putaporntip C, Jongwutiwes S, Gao Q, Udomsangpetch R, Sattabongkot J, Cui L: **Genetic structures of geographically distinct *Plasmodium vivax* populations assessed by PCR/RFLP analysis of the merozoite surface protein 3 β gene.** *Acta Tropica* 2006, **Vol. 100** Pages 205-212.
41. Lin M, Den Dulk-Ras A, Hooykaas PJJ, Rikihisa Y: **Anaplasma phagocytophilum Anka secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection†.** *Cell Microbiol* 2007, **9**:2644-2657.
42. Rikihisa Y, Lin M, Niu H: **Type IV secretion in the obligatory intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*.** *Cell Microbiol* 2010, **12**:1213 - 1221.
43. Garcia-Garcia JC, Rennoll-Bankert KE, Pelly S, Milstone AM, Dumler JS: **Silencing of Host Cell CYBB Gene Expression by the Nuclear Effector Anka of the Intracellular Pathogen *Anaplasma phagocytophilum*.** *Infection and Immunity* 2009, **77**:2385-2391.
44. Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, Hudson P, Jolles A, Jones KE, Mitchell CE: **Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases.** *Nature* 2010, **468**:647-652.
45. Viana M, Mancy R, Biek R, Cleaveland S, Cross PC, Lloyd-Smith JO, Haydon DT: **Assembling evidence for identifying reservoirs of infection.** *Trends in Ecology & Evolution* 2014.
46. Gandon S: **Evolution of multihost parasites.** *Evolution* 2004, **58**:455-469.
47. Stuen S, Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Bergström K, von Loewenich FD: **Experimental infection in lambs with a red deer (*Cervus elaphus*) isolate of *Anaplasma phagocytophilum*.** *Journal of Wildlife Diseases* 2010, **46**:803-809.
48. Massung RF, Priestley RA, Miller NJ, Mather TN, Levin ML: **Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice.** *Journal of Infectious Diseases* 2003, **188**:1757-1763.
49. Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Parpaglia MLP, Cubeddu T, Pintori G, Pittau M: **Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:6418-6422.
50. Torina A, Alongi A, Naranjo V, Estrada-Pena A, Vicente J, Scimeca S, Marino AMF, Salina F, Caracappa S, de la Fuente J: **Prevalence and Genotypes of *Anaplasma* Species and Habitat Suitability for Ticks in a Mediterranean Ecosystem.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:7578-7584.
51. Zeman P, Pecha M: **Segregation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* circulating among wild ruminants within a Bohemian forest (Czech Republic).** *International Journal of Medical Microbiology* 2008, **298**:203-210.
52. Silaghi C, Skuballa J, Thiel C, Pfister K, Petney T, Pfaffle M, Taraschewski H, Passos LMF: **The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) - A suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*?** *Ticks Tick-Borne Dis* 2012, **3**:49-54.
53. Stuen S, Pettersen KS, Granquist EG, Bergström K, Bown KJ, Birtles RJ: ***Anaplasma phagocytophilum* variants in sympatric red deer (*Cervus elaphus*) and sheep in southern Norway.** *Ticks Tick-Borne Dis* 2013, **4**:197-201.
54. Lempereur L, Lebrun M, Cuvelier P, Sépult G, Caron Y, Saegerman C, Shiels B, Losson B: **Longitudinal field study on bovine *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* infections during a grazing season in Belgium.** *Parasitol Res* 2012, **110**:1525-1530.
55. Pusterla N, Pusterla JB, Braun U, Lutz H: **Serological, hematologic, and PCR studies of cattle in an area of Switzerland in which tick-borne fever (caused by *Ehrlichia phagocytophila*) is endemic.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1998, **5**:325-327.
56. Stuen S, Casey AN, Woldehiwet Z, French NP, Ogden NH: **Detection by the polymerase chain reaction of *Anaplasma phagocytophilum* in tissues of persistently infected sheep.** *J Comp Pathol* 2006, **134**:101-104.

Table 1: Genetic diversity measured in all loci with DnaSP. (Nb indiv: number of sample analyzed by loci, long bp: length of the alignment in bp, Nb site poly and % site poly: number and proportion of polymorphic site in the alignment, Nb haplo: number of haplotype, Hd : haplotype diversity, π : nucleotide diversity and Rm number of recombination events estimated).

	APH 1099- 1100	<i>Msp4</i>	<i>RecG</i>	<i>PoiA</i>	<i>GyrA</i>	<i>TypA</i>	<i>GroESL</i>	<i>PleD</i>	<i>AnkA</i>	<i>AnkA I</i>	<i>AnkA II</i>	<i>AnkA III</i>	<i>AnkA IV</i>	Mean
Nb indiv	98	136	88	79	54	114	100	63	101	34	6	16	45	
long bp	435	390	351	333	837	462	630	597	654	661	753	710	702	
Nb site poly	19	38	12	21	20	27	35	27	352	47	22	36	74	
% site poly	3.37	9.74	3.41	6.30	2.39	5.84	5.55	4.52	53,82	7,11	2,92	5,07	10,54	6,575
Nb haplo	9	30	17	22	24	33	36	10	64	22	4	9	31	
Haplo Div (Hd)	0,565	0,875	0,807	0,838	0,93	0,86	0,923	0,661	0,983	0,961	0,8	0,908	0,958	0,827
Nucleo div (π)	0,0084	0,0237	0,0047	0,0106	0,0043	0,0087	0,01156	0,0168	0,2083	0,0176	0,0123	0,0076	0,0185	0,0178
Rm	1	7	1	5	6	7	7	2	NA	8	0	1	12	

Figure legends

Figure 1: Unrooted supertree (a) & unrooted ankA tree (b). Each tree was built using a maximum likelihood approach. The supertree was built from parameters optimized by MCMCMC with MrBayes and the ankA phylogeny was built using parameters optimized with phymtest in R. Each sample is identified by a symbol representing its host animal: \square for cattle, \circ for horse, \diamond for roe deer, and Δ for dog; colors indicate the supertree cluster to which the sample was assigned.

Figure 2: Geographical distribution of supertree clusters. Samples are grouped into their French region (“departement”) of origin; the shape of each symbol corresponds to the host animal from which the samples were recovered, while the color corresponds to the supertree cluster to which samples were assigned. The number of isolates represented by each symbol is presented within the symbol.

Additional files legends

Additional file 1: Description of the host and geographical origin of samples, classification of ankA and supertree clusters to which they were assigned.

Additional file 2: Primers and information for the nested PCRs.

Additional file 3: Unrooted trees based on sequences of the locus a) *groEL*, b) *msh4*, c) *gyrA*, d) *pleD*, e) *polA*, f) *recG*, g) *typA* and h) the intergenic region *CtrA-APH_1100*. Each tree was built using a maximum likelihood approach with parameters optimization performed with *phym1test* in R. Colors indicate the supertree cluster to which the samples were assigned: green for the cluster A, red for the cluster B and blue for the cluster C.

Additional file 4: Discriminant analysis by host based on the principal coordinates analysis of the locus a) *msh4*, b) *polA*, c) *typA*, d) *groEL*, e) *recG*, f) *CtrA-APH_1100*, g) *gyrA* and h) *pleD*.

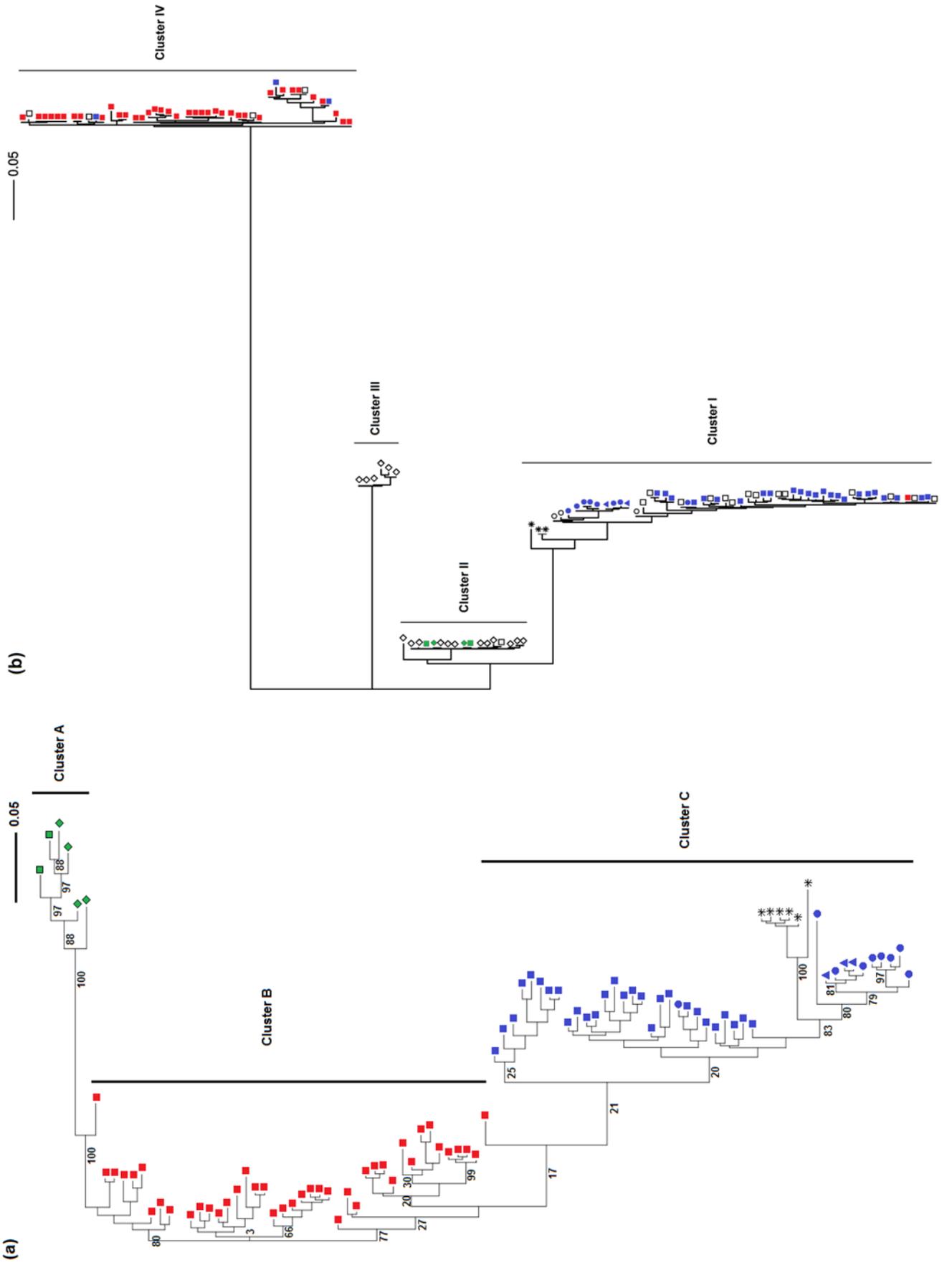


Figure 1

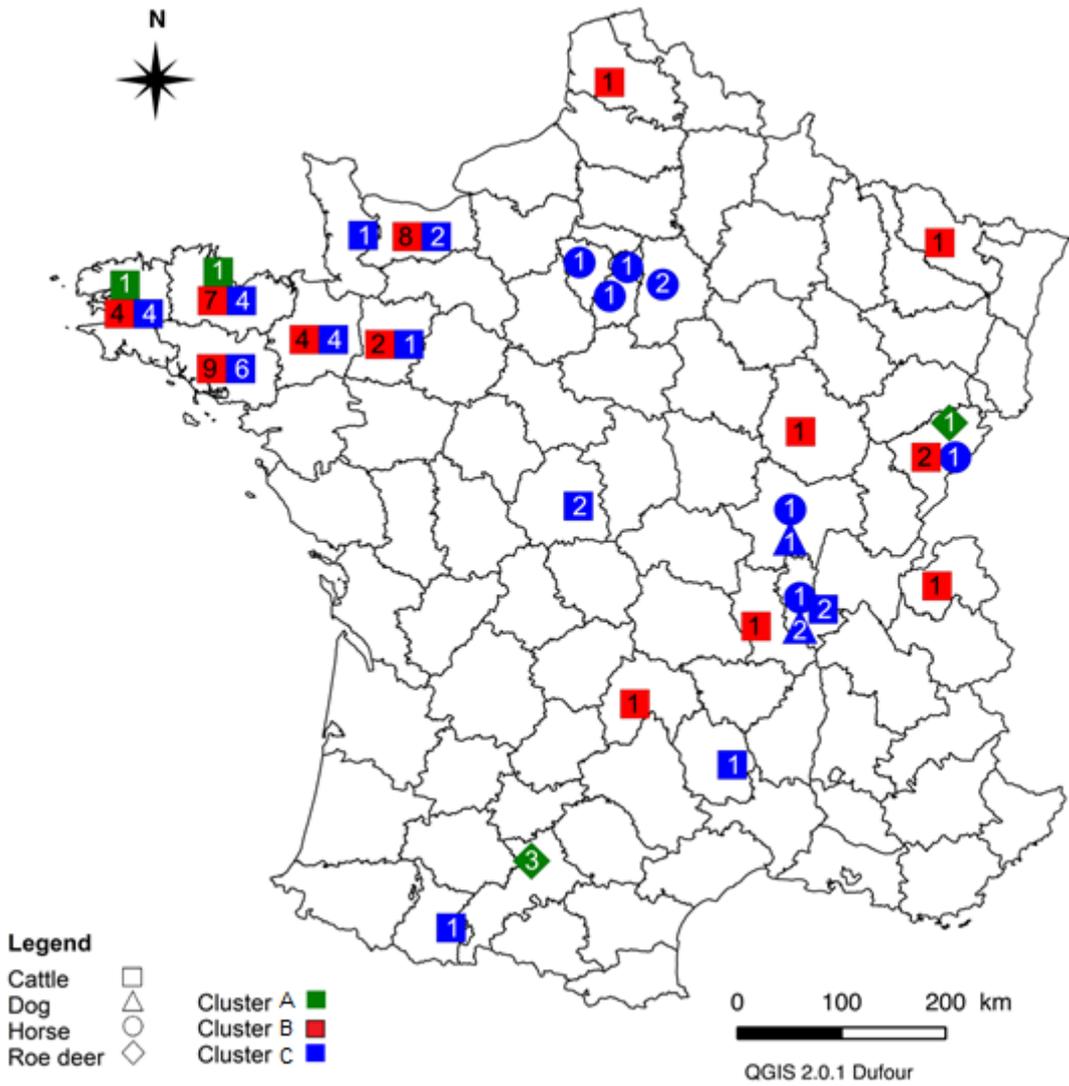


Figure 2

Additional file 1: Description of the host and geographical origin of samples, classification of ankA and supertree clusters to which they were assigned.

Sequence_Id	Species	Tissue	French region (« département »)	ankA cluster	Supertree cluster
AU-BO-01	CATTLE	blood	Cantal (15)	4	B
BL-HO-01	HORSE	blood	BELGIUM	1	-
BL-HO-02	HORSE	blood	BELGIUM	-	C
BO-BO-01	CATTLE	blood	Côte-d'Or (21)	4	B
BR-BO-02	CATTLE	blood	Idre (36))	4	-
BR-BO-03	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	1	C
BR-BO-04	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	4	B
BR-BO-05	CATTLE	blood	Tarn-et-Garonne (82)	1	-
BR-BO-06	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	1	C
BR-BO-07	CATTLE	blood	Ille-et-Vilaine (35)	1	C
BR-BO-08	CATTLE	blood	Finistère (29)	2	A
BR-BO-09	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	4	C
BR-BO-10	CATTLE	blood	Ille-et-Vilaine (35)	-	C
BR-BO-11	CATTLE	blood	Morbihan (56)	1	C
BR-BO-12	CATTLE	blood	Aveyron (12)	1	-
BR-BO-13	CATTLE	blood	Morbihan (56)	-	-
BR-BO-14	CATTLE	blood	Lozère (48)	4	C
BR-BO-15	CATTLE	blood	Finistère (29)	4	B
BR-BO-16	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	4	B
BR-BO-17	CATTLE	blood	Morbihan (56)	4	B
BR-BO-19	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	4	-
BR-BO-20	CATTLE	blood	Finistère (29)	4	B
BR-BO-21	CATTLE	blood	Finistère (29)	1	C
BR-BO-22	CATTLE	blood	Finistère (29)	1	C
BR-BO-23	CATTLE	blood	Morbihan (56)	4	B
BR-BO-24	CATTLE	blood	Morbihan (56)	4	B
BR-BO-25	CATTLE	blood	Morbihan (56)	4	B
BR-BO-26	CATTLE	blood	Morbihan (56)	1	C
BR-BO-27	CATTLE	blood	Morbihan (56)	1	C
BR-BO-28	CATTLE	blood	Morbihan (56)	1	C
BR-BO-29	CATTLE	blood	Finistère (29)	1	C
BR-BO-30	CATTLE	blood	Ille-et-Vilaine (35)	1	C
BR-BO-31	CATTLE	blood	Ille-et-Vilaine (35)	4	B
BR-BO-32	CATTLE	blood	Ille-et-Vilaine (35)	4	B
BR-BO-33	CATTLE	blood	Ille-et-Vilaine (35)	4	B
BR-BO-34	CATTLE	blood	Ille-et-Vilaine (35)	4	B
BR-BO-35	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	4	B
BR-BO-36	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	1	C
BR-BO-37	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	1	-
BR-BO-38	CATTLE	blood	Morbihan (56)	4	B

BR-BO-39	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	1	-
BR-BO-40	CATTLE	blood	Morbihan (56)	1	C
BR-BO-41	CATTLE	blood	Morbihan (56)	4	B
BR-BO-42	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	4	B
BR-BO-43	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	4	B
BR-BO-44	CATTLE	blood	Morbihan (56)	4	B
BR-BO-45	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	4	B
BR-BO-46	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	2	A
BR-BO-47	CATTLE	blood	Finistère (29)	-	B
BR-BO-48	CATTLE	blood	Finistère (29)	1	C
BR-BO-49	CATTLE	blood	Mayenne (53)	4	-
BR-BO-50	CATTLE	blood	Finistère (29)	-	-
BR-BO-51	CATTLE	blood	Morbihan (56)	4	B
BR-BO-52	CATTLE	blood	Finistère (29)	1	-
BR-BO-54	CATTLE	blood	Finistère (29)	-	B
BR-BO-55	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	1	-
BR-BO-56	CATTLE	blood	Morbihan (56)	4	B
BR-BO-58	CATTLE	blood	Morbihan (56)	1	C
BR-BO-59	CATTLE	blood	Ille-et-Vilaine (35)	1	C
BR-BO-60	CATTLE	blood	Morbihan (56)	1	-
BR-BO-62	CATTLE	blood	Ille-et-Vilaine (35)	4	-
BR-BO-63	CATTLE	blood	Côtes-d'Armor (22)	2	-
BR-BO-64	CATTLE	blood	Finistère (29)	1	-
CE-BO-01	CATTLE	blood	Idre (36)	1	C
CE-BO-02	CATTLE	blood	Idre (36)	-	-
CE-BO-03	CATTLE	blood	Idre (36)	1	C
CRL-12	ROE DEER	blood	Doubs (25)	-	-
CRL-19	ROE DEER	blood	Doubs (25)	-	-
CRL-22	ROE DEER	blood	Doubs (25)	3	-
CRL-3	ROE DEER	blood	Doubs (25)	-	A
CRL-7	ROE DEER	blood	Doubs (25)	-	-
FC-BO-01	CATTLE	blood	Doubs (25)	4	B
FC-BO-02	CATTLE	blood	Doubs (25)	4	B
IF-HO-02	HORSE	blood	Seine-et-Marne (77)	1	-
IF-HO-04	HORSE	blood	Seine-et-Marne (77)	1	C
IF-HO-05	HORSE	blood	Seine-et-Marne (77)	1	-
IF-HO-08	HORSE	blood	Essone (91)	1	C
IF-HO-09	HORSE	blood	Seine-et-Marne (77)	-	-
IF-HO-10	HORSE	blood	Val-de-Marne (94)	1	C
IF-HO-11	HORSE	blood	Yvelines (78)	1	C
LI-BO-33	CATTLE	blood	Haute-Vienne (87)	-	-
LI-BO-55	CATTLE	blood	Haute-Vienne (87)	1	-
LI-BO-80	CATTLE	blood	Haute-Vienne (87)	-	-
LO-BO-04	CATTLE	blood	Moselle (57)	-	B
MP-BO-01	CATTLE	blood	Hauts-Pyrénées (65)	1	C

MP-BO-02	CATTLE	blood	Lot (46)	-	-
MP-CH-02	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-05	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-06	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	3	-
MP-CH-08	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-10	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	3	-
MP-CH-11	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-12	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	3	-
MP-CH-14	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	3	-
MP-CH-15	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-16	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-17	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-19	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	3	-
MP-CH-24	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-25	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-26	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-29	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-32	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-33	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-34	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-35	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-39	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-40	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	A
MP-CH-41	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-58	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	A
MP-CH-61	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-63	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-64	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	-
MP-CH-65	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	2	A
MP-CH-66	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-68	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-69	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
MP-CH-70	ROE DEER	blood	Haute-Garonne (31)	-	-
NO-BO-01	CATTLE	blood	Calvados (14)	4	B
NO-BO-02	CATTLE	blood	Calvados (14)	4	B
NO-BO-03	CATTLE	blood	Pas-de-Calais (62)	4	B
NO-BO-04	CATTLE	blood	Calvados (14)	1	C
NO-BO-05	CATTLE	blood	Calvados (14)	1	C
NO-BO-06	CATTLE	blood	Calvados (14)	4	B
NO-BO-07	CATTLE	blood	Calvados (14)	4	B
NO-BO-09	CATTLE	blood	Calvados (14)	1	-
NO-BO-10	CATTLE	blood	Calvados (14)	-	-
NO-BO-12	CATTLE	placenta	Calvados (14)	-	-
NO-BO-14	CATTLE	mucus	Calvados (14)	-	-
NO-BO-15	CATTLE	placenta	Calvados (14)	1	-

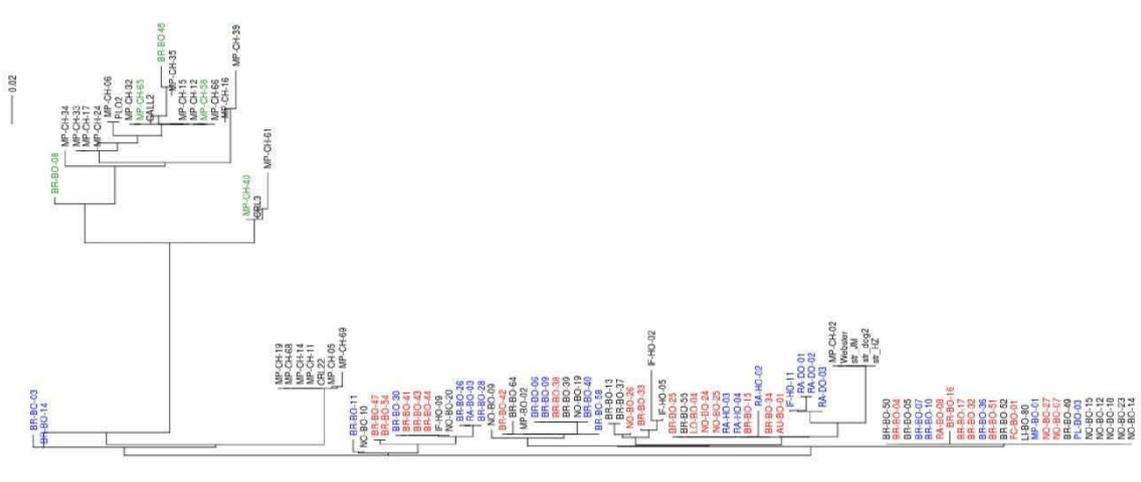
NO-BO-16	CATTLE	placenta	Calvados (14)	-	-
NO-BO-18	CATTLE	placenta	Calvados (14)	4	-
NO-BO-19	CATTLE	placenta	Calvados (14)	1	B
NO-BO-20	CATTLE	placenta	Calvados (14)	1	-
NO-BO-21	CATTLE	blood	Calvados (14)	-	-
NO-BO-22	CATTLE	blood	Manche (50)	1	C
NO-BO-23	CATTLE	blood	Calvados (14)	-	-
NO-BO-24	CATTLE	blood	Calvados (14)	4	B
NO-BO-25	CATTLE	blood	Calvados (14)	4	B
NO-BO-26	CATTLE	blood	Calvados (14)	1	B
NO-BO-27	CATTLE	blood	Calvados (14)	4	B
PL-BO-01	CATTLE	blood	Mayenne (53)	4	B
PL-BO-02	CATTLE	blood	Mayenne (53)	4	B
PL-BO-03	CATTLE	blood	Mayenne (53)	1	C
RA-BO-01	CATTLE	blood	Haute-Savoie (74)	4	B
RA-BO-02	CATTLE	blood	Rhône (69)	-	-
RA-BO-03	CATTLE	blood	Rhône (69)	4	C
RA-BO-04	CATTLE	blood	Rhône (69)	1	-
RA-BO-05	CATTLE	blood	Rhône (69)	1	C
RA-BO-08	CATTLE	blood	Loire (42)	4	B
RA-DO-01	DOG	blood	Rhône (69)	-	C
RA-DO-02	DOG	blood	Saône-et-Loire (71)	1	C
RA-DO-03	DOG	blood	Rhône (69)	1	C
RA-HO-02	HORSE	blood	Doubs (25)	1	C
RA-HO-03	HORSE	blood	Rhône (69)	1	C
RA-HO-04	HORSE	blood	Seine-et-Marne (77)	1	C
RA-HO-05	HORSE	blood	Saône-et-Loire (71)	1	C
CALL2	ROE DEER	blood	Côtes-d'Armor (22)	-	-
PLO2	ROE DEER	blood	Côtes-d'Armor (22)	-	-
PLU	ROE DEER	blood	Côtes-d'Armor (22)	-	-

Additional file 2 : Primers and information for the nested PCRs

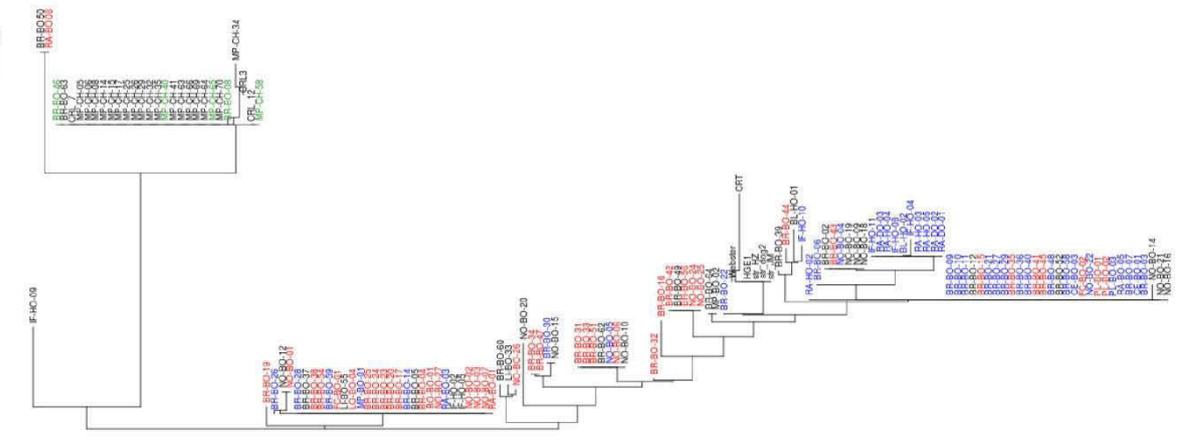
Locus	Primers	Sequence en 3'→ 5'	Annealing temperature
ankA external	Fi_ankA Ri_ankA	ATRTTACGCTGTRRTRGCAT CATCTRCHGGTGTYYTCCCTC	58 °C
ankA internal	Fe_ankA Re2_ankA	TATGCGRTTCGTGAAGCA TTAAAAAGCATYTTTCTGWAAC	58 °C
msp4 external	msp4_Fb1 msp4_Rb1	ATAATGATGCGTCTGATGTTAGCG CCTTTCCTCTATAAGCCAACTT	59 °C
msp4 internal	msp4_Fb1 msp4_Rb2	ATAATGATGCGTCTGATGTTAGCG CAGGCAAGTCAGTATGCATAAC	59 °C
groEL external *	HS1a HS6a	AZTGGGCTGGTAZTGAAAT CCZCCZGGZACZACCTTC	48 °C
groEL internal *	HS43 HSVR	ATWGCWAARGAAGCATAGTC CTCAACAGCAGCTCTAGTAGC	48 °C
polA external	F1_pola_deg R3_pola_deg	GCAGATTAYTCVCARATGGARC GCVGTACCYTGKATTGGWG	57 °C
polA internal	F1_pola_deg R4_pola_deg	GCAGATTAYTCVCARATGGARC GTACCYTGKATTGGWGCRTT	57 °C
typA external	E2_typA_F E2_typA_R	CCTGGACATGCTGACTTCGG CGGCGGAACCTAACCTCACAG	66 °C
typA internal	F-typA R-typA	TGCCTCTGAGGGCCCTATGCC AGCCCTTCCAGCCCTGCAAC	69 °C
recG external	recG_degF1 recG_degR2	CGRCTTGTAGTYATAGATG TCRATGACAATKATSGTWGC	57 °C
recG internal	recG_degF2 recG_degR2	GATGARCARCARMGSTTYGG TCRATGACAATKATSGTWGC	57 °C
pleD external	E2_pleD_R R_pleD	ACAAGTGGCCCTGAAGCAAT TGCGTCGTAGCCTGTCTGCA	66 °C
gyrA external	Fint-gyrA Rext-gyrA	GATAGTCAGGGAACTTCGG GGCATGACACTAGTAATGGTC	61 °C
gyrA internal	Fint-gyrA Rint-gyrA	GATAGTCAGGGAACTTCGG CATGTACGCTCCCTAAGCG	64 °C
ctrA-APH_1100 external	E1_aph1099-1100_F E1_aph1099-1100_R	ACAGTGCCCAACCTAGACGA TGGAAGAACACGGTGGTTGC	64 °C
ctrA-APH_1100 internal	f_aph1099-1100 r_aph1099-1100	GTTGCACATCCTGCTGGGGTGT GCCCCCTCTGCAGACAAAGAAGC	69 °C

* developed by Lotrič-Furlan S, et al : **Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia.** *Clinical Infectious Diseases* 1998, **27**:424-428.

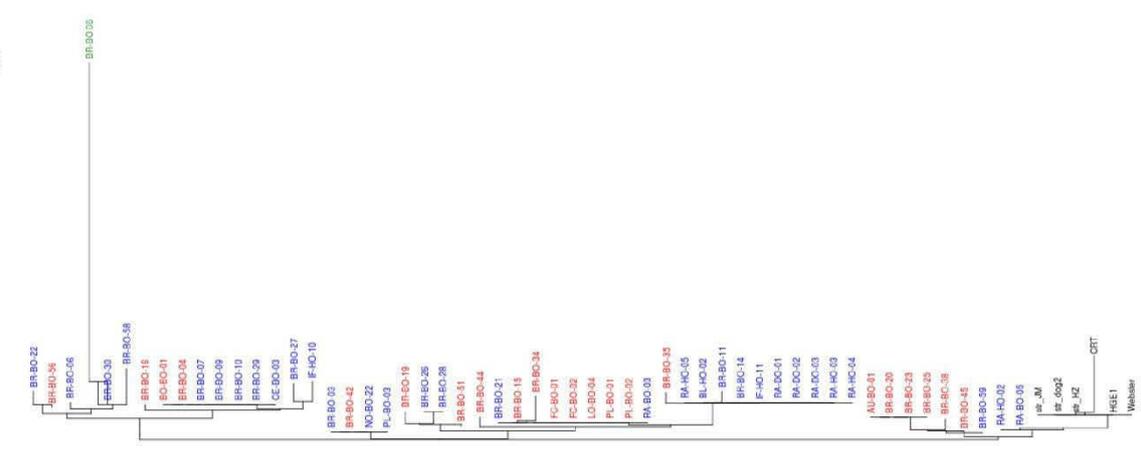
a)

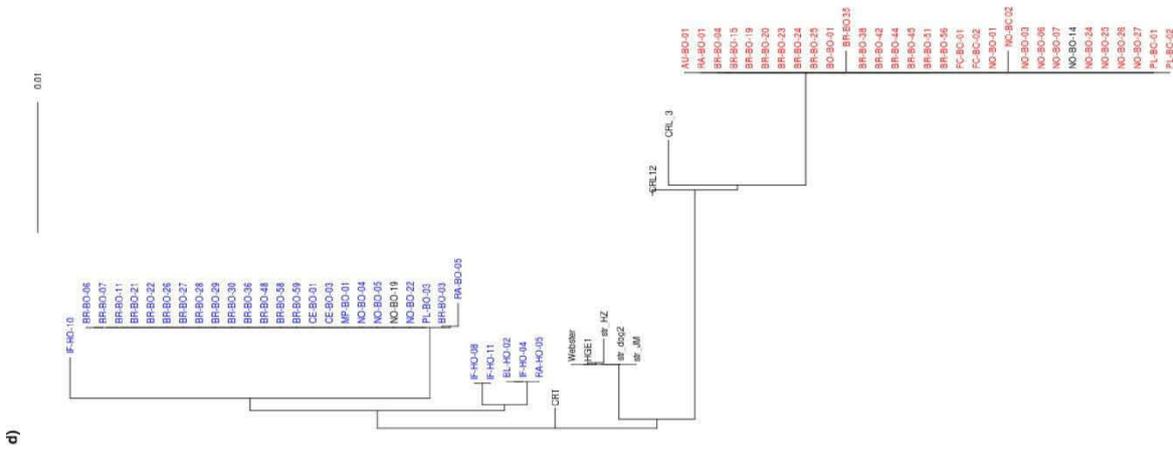
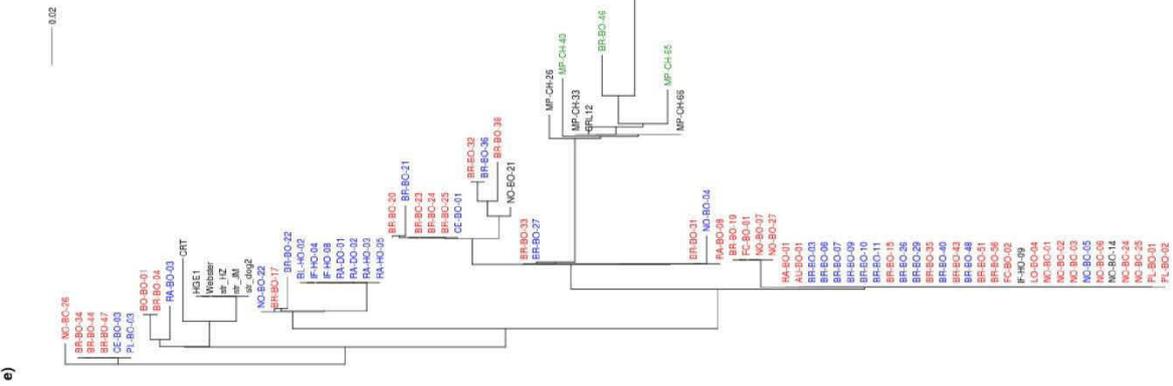
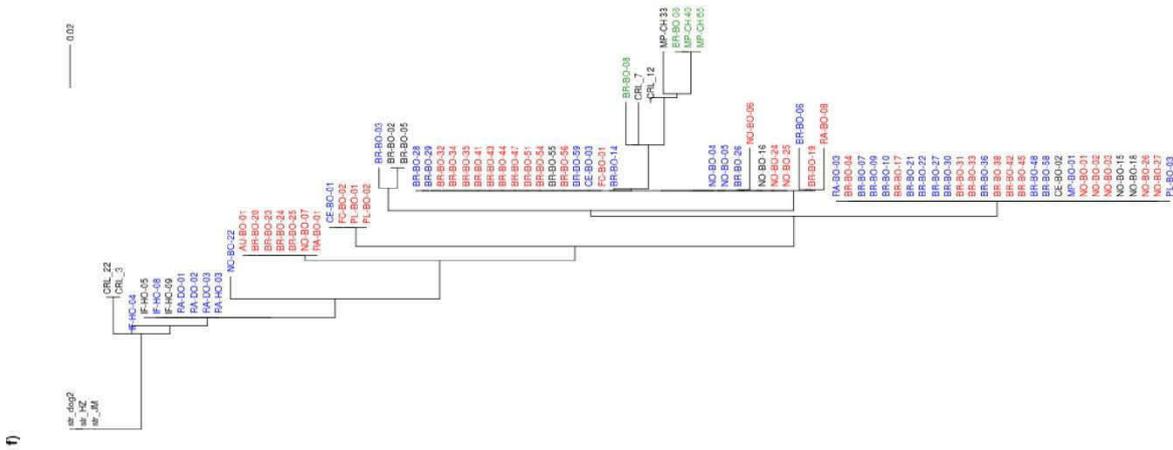


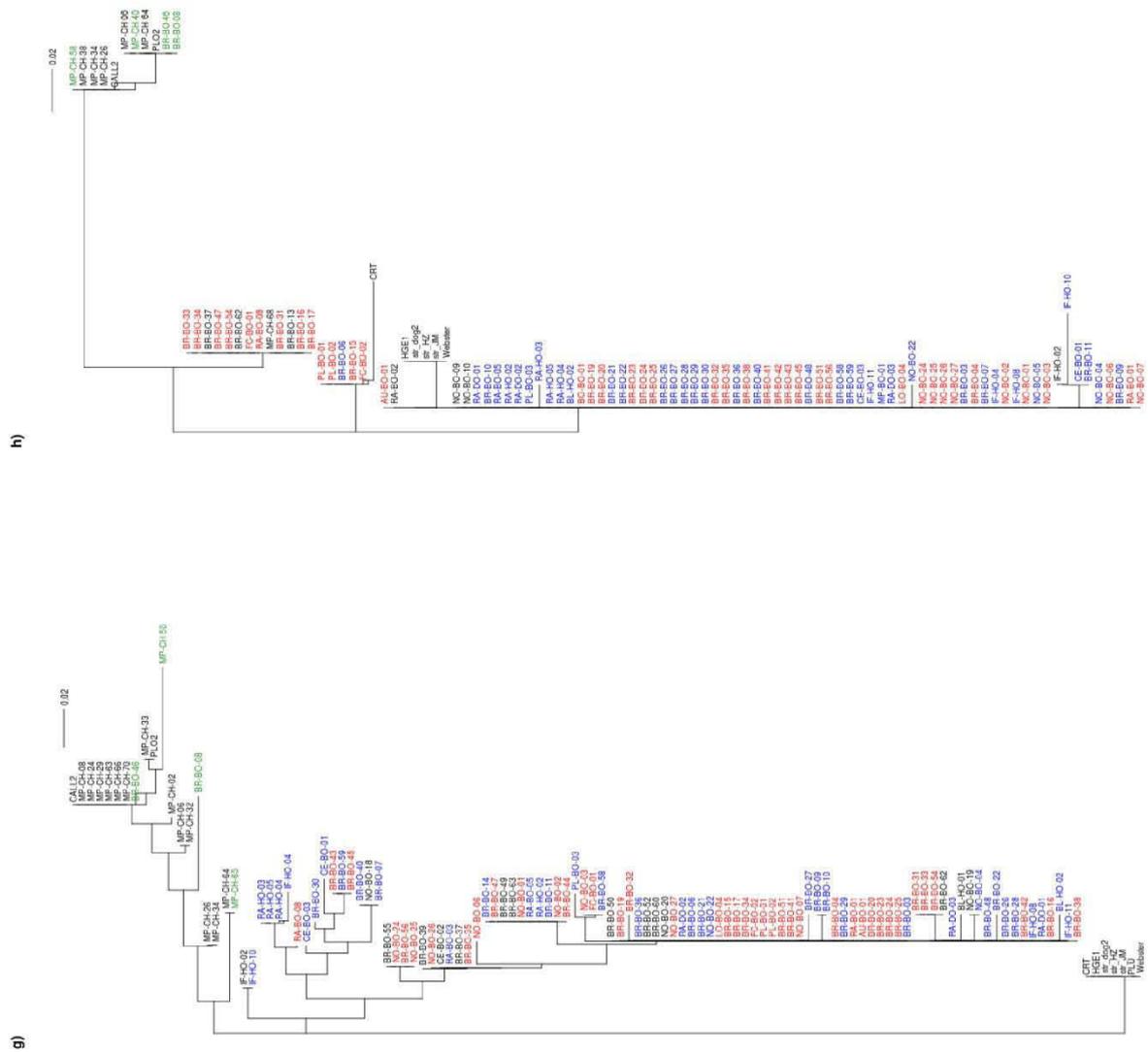
b)



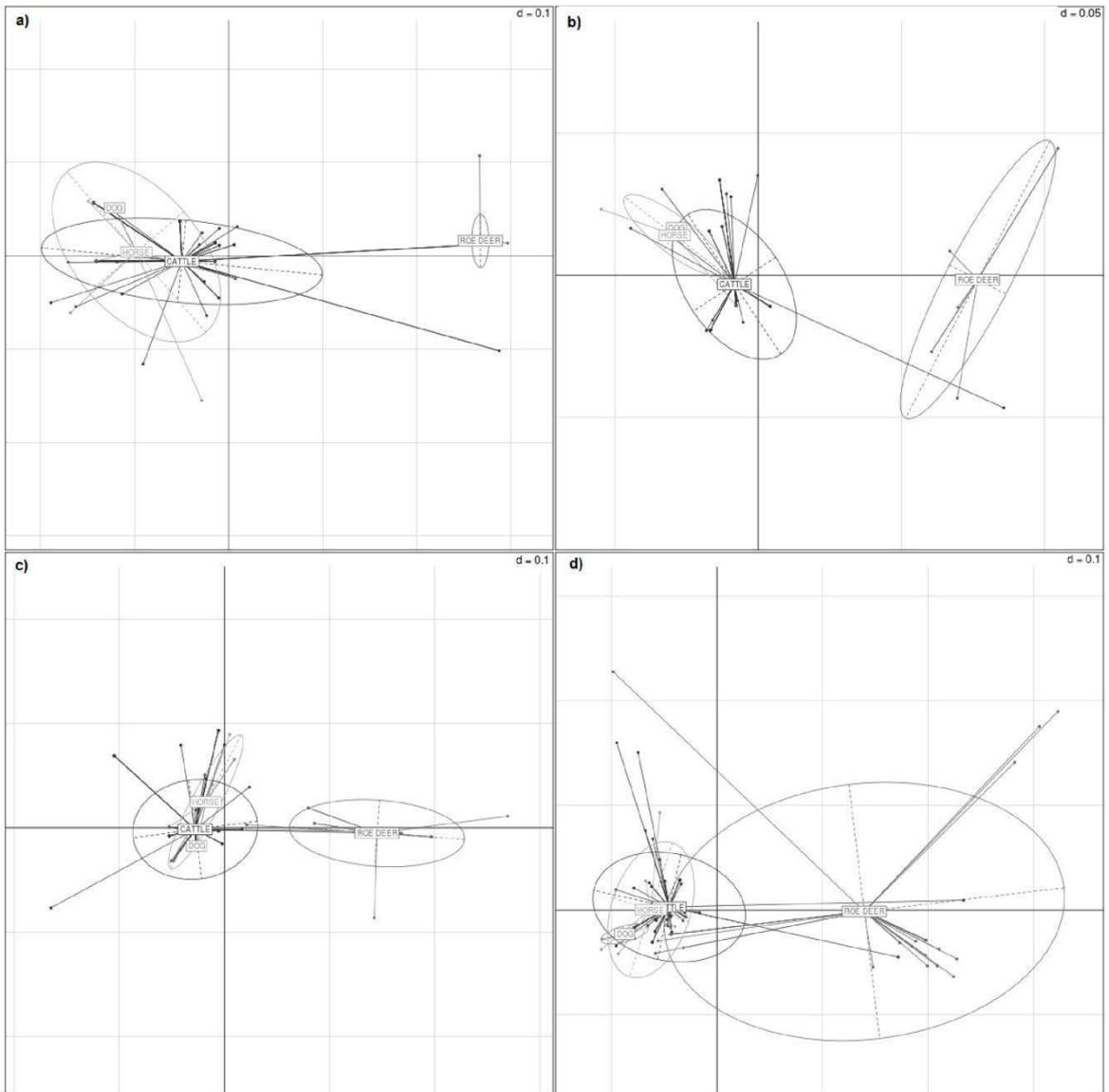
c)

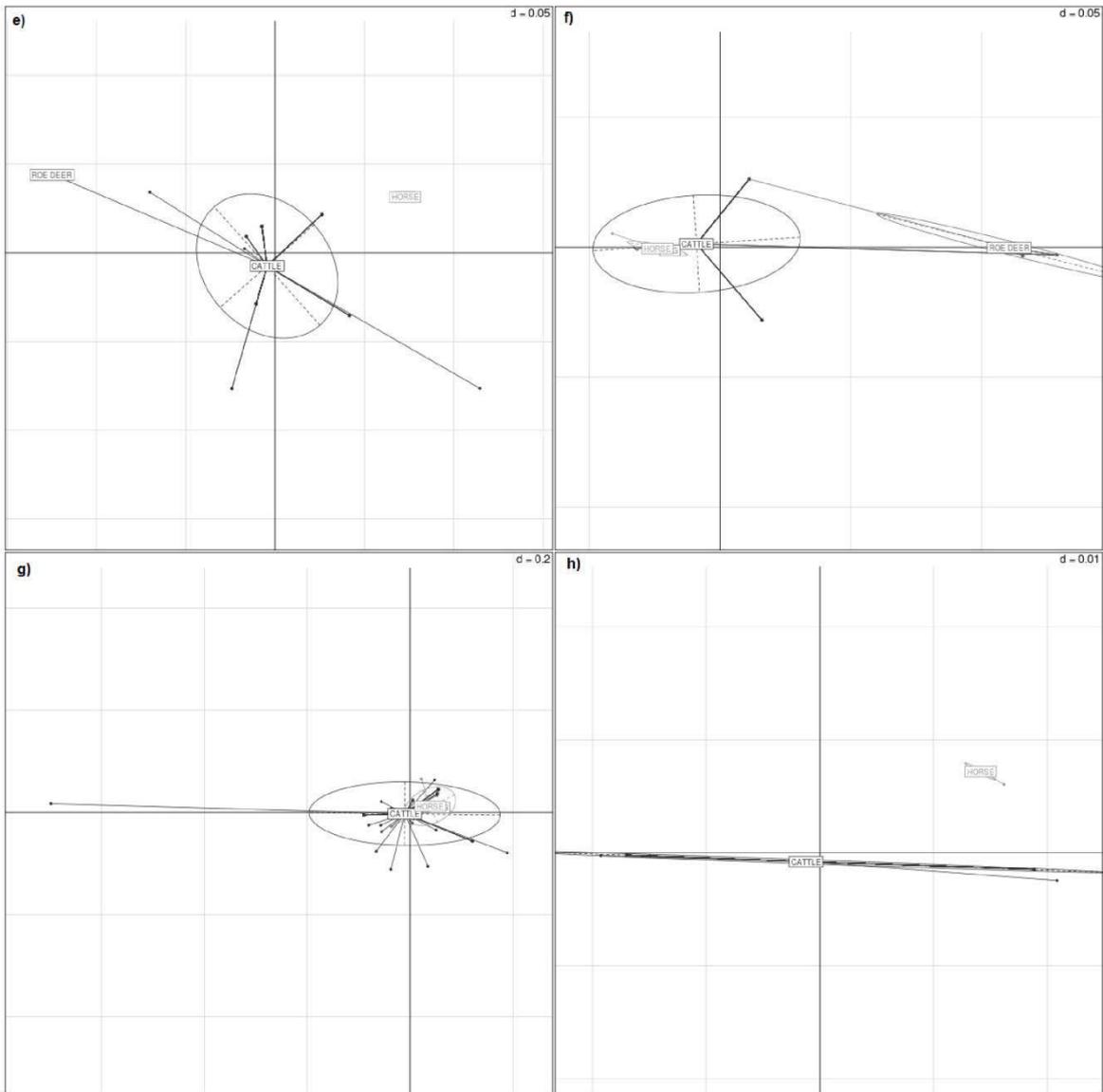






Additional file 3: Unrooted trees based on sequences of the locus a) *groEL*, b) *msp4*, c) *gyrA*, d) *pleD*, e) *poIA*, f) *recG*, g) *typA* and h) the intergenic region *CtrA-APH_1100*. Each tree was built using a maximum likelihood approach with parameters optimization performed with *phymTest* in R. Colors indicate the supertree cluster to which the samples were assigned: green for the cluster A, red for the cluster B and blue for the cluster C.





Additional file 4: Discriminant analysis by host based on the principal coordinates analysis of the locus a) *msp4*, b) *polA*, c) *typA*, d) *groEL*, e) *recG*, f) *CtrA-APH_1100*, g) *gyrA* and h) *pleD*.

Etude des cycles épidémiologiques d'*Anaplasma phagocytophilum* en France : Apport des approches de caractérisation génétique

A. phagocytophilum, une bactérie transmise par les tiques, est responsable de l'anaplasmose granulocytaire, une maladie émergente qui infecte une large gamme de mammifères dont l'homme. Actuellement, la description des cycles épidémiologiques de cette bactérie est incomplète. L'objectif de cette thèse est de caractériser la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* chez différentes espèces d'hôtes, afin de déterminer quelles espèces participent au même cycle épidémiologique. D'abord, nous avons caractérisé la diversité génétique d'*A. phagocytophilum* chez les animaux domestiques malades à l'aide d'une MLSA. Nous avons identifié trois groupes de génotypes infectant les bovins, dont un groupe est partagé avec les chevaux et les chiens, et un avec les chevreuils. Ensuite, nous avons recherché quelles espèces de tiques pouvaient transmettre la bactérie, et quels pouvaient être les réservoirs parmi les mammifères sauvages. En Camargue, un génotype au fort potentiel zoonotique a été identifié chez cinq espèces de tiques du genre *Rhipicephalus*, *Dermacentor* et *Hyalomma*. La prévalence chez des rongeurs suggère qu'ils peuvent être réservoirs, mais la présence de génotypes infectant les bovins chez les mulots est à vérifier. Enfin, la comparaison des génotypes obtenus chez les tiques et les chevreuils par séquençage 454, a montré que la contribution des chevreuils à l'infection des tiques était faible sur le site des Vallons de Gascogne. L'absence de rongeurs infectés sur ce site suggère que d'autres mammifères réservoirs sont présents. Cette étude montre la complexité des cycles d'*A. phagocytophilum* et l'intérêt des outils moléculaires.

Mots clés : *A. phagocytophilum*, épidémiologie moléculaire, MLSA, hôte réservoir, vecteur, animaux domestiques, bovins, chevreuils, rongeurs, tiques.

Study of epidemiological cycles of *Anaplasma phagocytophilum* in France : Contribution of characterization by genetic approaches

A. phagocytophilum, a tick-borne bacterium, is responsible of the granulocytic anaplasmosis, an emerging disease that infects a large range of mammals including humans. Currently, the description of the epidemiological cycles of this bacterium is incomplete. The objective of this thesis was to characterize the genetic diversity of *A. phagocytophilum* in different host species to determine those involved in the same epidemiological cycle. First, we characterized the genetic diversity of *A. phagocytophilum* in sick domestic animals with a MLSA. We identified three groups of genotypes infecting cattle, including one group shared with horses and dogs, and another shared with roe deer. Then, we investigated what species of ticks can transmit the bacteria, and what wild mammals could be reservoirs. In Camargue, a genotype with high zoonotic potential was identified in five species of ticks of the genus *Rhipicephalus*, *Dermacentor* and *Hyalomma*. The prevalence in French rodents suggests that they may be reservoir hosts, but the presence of genotypes infecting cattle in rodents must be checked. Finally, comparing the bacterial genotypes in ticks and roe deer by 454 sequencing, showed that the contribution of the roe deer to tick infection was low in the site of "Vallons de Gascogne". The absence of infected rodents in this location suggests that other reservoir mammals are present. This study demonstrates the complexity of the *A. phagocytophilum* cycle and the contribution of molecular tools.

Key-words : *A. phagocytophilum*, molecular epidemiology, MLSA, reservoir host, vector, domestic animals, cattle, roe deer, rodents, ticks.

Laboratoire d'accueil : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR 346 Epidémiologie animale, 63122 Saint Genès Champanelle, France