



Invasion biologique & écologie de la santé vétérinaire : le cas des communautés de tiques et pathogènes associés au Bénin et au Burkina Faso à l'heure de leur invasion par la tique du bétail *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Abel Sènagbè Biguezoton

► To cite this version:

Abel Sènagbè Biguezoton. Invasion biologique & écologie de la santé vétérinaire : le cas des communautés de tiques et pathogènes associés au Bénin et au Burkina Faso à l'heure de leur invasion par la tique du bétail *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Montpellier; Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 2016. Français. NNT : 2016MONTT115 . tel-01646550

HAL Id: tel-01646550

<https://theses.hal.science/tel-01646550>

Submitted on 23 Nov 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré conjointement par
**l'Université de Montpellier &
l'Université d'Abomey-Calavi**

Préparée au sein des écoles doctorales
**Biodiversité, Agriculture, Alimentation,
Environnement, Terre (GAIA)
& Sciences de la Vie (SV)**

Et des unités de recherche
**Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie,
Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC) &
Unité de Recherche en Biotechnologie de la
Production et de la Santé Animales (URBPSA)**

Spécialité : **Biologie des Interactions (BDI)**
Présentée par **Abel Sènagbè BIGUEZOTON**

**Invasion biologique & écologie de la santé vétérinaire :
Le cas des communautés de tiques et agents pathogènes associés
au Bénin et au Burkina Faso à l'heure de leur invasion par la
tique du bétail *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.**

Soutenue le 16 mars 2016 à 14h30 devant le jury composé de

Mme Sarah Bonnet, DR INRA, UMR BIPAR
M. Olivier Plantard, DR INRA, UMR BIOEPAR
M. Guiguibaza-Kossigan DAYO, CR CAMES, CIRDES
M. Souaibou Farougou, Pr Université Abomey-Calavi
Mme Christine Chevillon, CR CNRS, UMR MIVEGEC

Présidente
Rapporteur
Chercheur invité
Co-directeur
Co-directrice

Résumé

L'élevage bovin représente un secteur économique clé en Afrique de l'ouest dont le développement est fortement contraint par les tiques et les agents pathogènes qu'elles transmettent. Cet état des lieux s'est aggravé depuis 2002 du fait de l'invasion de cette région par l'espèce de tique associée aux plus fortes pertes économiques au niveau mondial : *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Certains auteurs avaient même annoncé (sans véritablement le tester) que *R. microplus* était en train de remplacer les tiques natives du même sous-genre *Boophilus* au sud du Bénin et en Côte d'Ivoire. Nos travaux ont consisté à (i) tester les possibles effets de l'installation de *R. microplus* au Bénin et au Burkina Faso sur les communautés tant de tiques que des agents pathogènes qu'elles transmettent au bétail et (ii) à comprendre les mécanismes populationnels impliqués dans l'invasion de *R. microplus* en cours. Des collectes mensuelles de tiques et de sang ont été réalisées pendant 12 mois sur 144 vaches de ces deux pays. Nos analyses démontrent, que loin du remplacement d'espèces suspecté, l'installation de *R. microplus* s'est accompagnée d'une augmentation de la charge parasitaire réalisée par différentes espèces natives sur des bovins dans certaines régions. Le centre Burkina Faso fait exception : l'espèce invasive n'a pas réussi à s'installer dans cette région où les rares espèces natives ont vu leur abondance diminuer au cours de la dernière décennie. Les impacts de l'installation de l'espèce invasive sur les communautés d'agents pathogènes transmis par les tiques du bétail font appel à des processus plus complexes. Ainsi, nous avons mis en évidence principalement des interactions négatives entre les espèces d'agents pathogènes transmis au bétail par les tiques du sous-genre *Boophilus*. Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'existence de transmission transovarienne de l'agent de la coudriose (*Ehrlichia ruminantium*) chez *R. microplus* qui n'était pas censé être compétente pour cet agent pathogène dont les vecteurs appartiennent au genre *Amblyomma*. Ces analyses des conséquences de l'installation de l'espèce de tique invasive sont complétées par une première étude de génétique des populations de *R. microplus*. Les échantillonnages se sont effectués le long d'un transect nord-sud au Bénin ainsi qu'au sein de deux troupeaux burkinabés conduits par des éleveurs Peulh pratiquant une transhumance saisonnière à longue distance en saison sèche. Ceci nous a permis de montrer que, huit ans après l'importation accidentelle de *R. microplus* au sud Bénin, les populations installées avaient atteint des équilibres mutation/dérive et migration/dérive et que la transhumance saisonnière s'accompagnait bien de dispersion à longue distance de *R. microplus*. Ces résultats sont discutés tant vis-à-vis de la compréhension de la nouvelle situation vétérinaire des troupeaux bovins béninois et burkinabés que dans une perspective de protection de la santé des troupeaux.

Mots clés : *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, invasion, interactions, génétique des populations, Afrique de l'ouest.

Summary

The current invasion of West Africa by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* has reinforced the constraints imposed on the development of cattle production by ticks and tick-borne pathogens. Our studies were aimed at investigating the underlined processes by (i) testing the consequences of the settlement of this invasive tick on diversity and structure of the communities formed by the cattle ticks and tick-borne pathogens in Benin and Burkina Faso, and by (ii) understanding the population mechanisms involved in the *R. microplus* invasion in progress. Monthly collections of ticks and blood had been carried out for 12 months on 144 sentinel-steers in both countries. Our analyses revealed that far from the suspected species replacement, *R. microplus* installation came along with an increase in the burden realized by native tick species. We also highlighted the existence of transovarial transmission of heartwater agent (*E. ruminantium*) in *R. microplus* which was not supposed to be competent for this pathogen whose vectors belong to the genus *Amblyomma*. We also shown the negative interactions between pathogens transmitted to cattle by ticks (native & invasive) belonging to the subgenus *Boophilus*. Finally, we initiated a genetic study of *R. microplus* populations along a north-south transect conducted in Benin and within two Burkinabe Fulani herds, led by farmers who practice long-distance seasonal transhumance during dry season. Hence, we demonstrated that eight years after the accidental introduction of *R. microplus* in south Benin, installed populations had reached equilibrium mutation/drift and migration/drift and that seasonal transhumance was accompanied by *R. microplus* long distance dispersion. These results have been discussed related to the understanding of the new veterinary situation of Beninese's and Burkinabe's cattle herd as well as to the protecting perspective of the cattle herds health.

Key Words: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, invasion, interactions, population genetics, West Africa..



***A mon feu père, Dorothée, parti trop tôt de ce monde,
Tu seras toujours une source d'engagement et d'abnégation au
travail pour moi.***



Remerciements

Plusieurs personnes ont de près ou de loin contribué, de par leur apport scientifique (équipe d'encadrement et comité de suivi) et/ou soutien moral et spirituel (parents, amis et connaissances). Je dis donc un « Grand Merci » à chacun et à tous.

Mes remerciements vont avant tout à l'endroit de Dr Hassane Adakal, pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse dans le cadre du projet WECATIC qu'il a coordonné au CIRDES et financé par l'AusAid. Merci Dr pour la confiance et merci pour tous ces moments passés ensemble au CIRDES. Ce fut très instructif.

Mille fois merci à Christine Chevillon, ma co-directrice de thèse, que j'ai eu l'opportunité de connaître en 2012. Les mots ne me suffiront jamais assez pour t'exprimer toute ma reconnaissance pour ton encadrement et ton appui de tout de temps et ton soutien moral. Infiniment Merci.

Un grand Merci au Professeur Souaïbou Farougou, mon co-directeur de thèse, pour avoir supervisé mes travaux au Bénin et pour ses directives dans le cadre de cette thèse.

Je ne saurais oublier la DG CIRDES, Dr Valentine Yapi Gnaoré, pour m'avoir accueilli au CIRDES et votre soutien.

Merci à toute l'administration du CIRDES, au Directeur Scientifique, Dr Zackaria Bengaly, au CCFOR, Dr Augustin Bance et à tous les techniciens de laboratoire de l'URBIO.

Merci au Dr Guiguibaza-Kossigan Dayo, Chef d'Unité URBIO au CIRDES. Merci à vous pour vos contributions scientifiques à ma thèse.

Merci à Valérie Noël pour ton appui technique pour les manips dans les laboratoires MIVEGEC à Montpellier, pour ta disponibilité et pour ton soutien moral.

Merci à Olivier Duron, pour ton soutien scientifique et moral. Merci pour tous ces moments d'échanges scientifiques et de conseils.

Merci à Karen McKoy pour ton soutien. Le « Principe Divin » n'ayant de mains que les êtres humains, Merci à toi notamment pour avoir servi de canal à ce Principe, lors de cette étape délicate de la poursuite de ma thèse en 2014.

Un grand Merci aussi à Jean-François Guegan, pour ta contribution à la poursuite de cette thèse.

Merci à Patrice David, Frédéric Simard, Sophie Ravel, membres de mon comité de thèse. Merci pour vos apports scientifiques et orientation de cette thèse.



Mes remerciements vont également à l'endroit de l'AusAid & du CORAF, de l'ambassade de France au Bénin à travers son Programme de bourse SCAC, de la Fondation Internationale pour la Science (FIS), du Laboratoire Mixte International LAMIVECT, du laboratoire texan ARS-USDA et de l'IRD à travers son programme de bourse ARTS. Merci à chacun de ces organismes pour avoir financé une partie de ma thèse.

Je remercie très sincèrement Olivier Plantard et Sarah Bonnet pour avoir accepté d'être membres de mon jury.

Je remercie également les Professeurs Clément Agbangla et Corneille Ahanhanzo du Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies (Bénin) pour leur soutien.

Merci à Honorine Badolo et Mamadou Touré pour leur contribution à l'acquisition des données moléculaires de diagnostics des agents pathogènes transmis par les tiques.

Merci à Sébastien Zoungrana, Dramane Gninasse et François Dossa pour la réussite des missions de terrain. Grâce aux savoir-faire de chacun de vous, les missions de terrain de 12 mois se sont très bien déroulés. Merci.

Merci à Emilie, Hermann, Soumaïla, Bienvenu, Hamidou, Jacques, Aristide, Olivier, Inoussa, Ida, Médina, Béatrice et tous les étudiants stagiaires du CIRDES dont le soutien moral a toujours été un grand support au cours de ces quatre années de thèse.

Merci aussi à Adama, Elsa, Marcel, Malal, Illich, Anaïs, Marlène, Gildas, Romain, Jorian, Manon, Daniel, Taïssa, Jacky, Issaka, Roland et tous les étudiants de MIVEGEC et de l'IRD que j'ai connu durant mes séjours à Montpellier pour votre soutien moral.

Merci à Hermann, Kévin, Noël, Rodrigue pour votre soutien indéfectible de tout temps.

Merci à ma mère, Huguette Gaglozoun, pour ton soutien moral et spirituel.

Merci à Mr Rachid Abdel Orou-Guidou. Je ne saurais terminer ma liste de remerciement sans t'évoquer, de même que ta petite famille pour tout le soutien moral dont je bénéficie de votre part. Soyez-en vivement remerciés.

Je remercie également tous les membres de l'Association des Béninois de Montpellier, pour leur soutien. Mes remerciements vont particulièrement à l'endroit des membres du bureau de 2015, Nino, Riad, Carelle, Sorel et Donatien.

Loin d'avoir oublié les autres personnes, au risque de ne pouvoir finir, l'éthique de la rédaction de mémoire de thèse m'oblige à demander à tous de bien vouloir accepter recevoir sans être cités, mes remerciements.



TABLE DES MATIERES

Résumé	i
Summary	i
Remerciements	iii
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Glossaire	xi
Chapitre 1- Introduction : Problématique et Etat de l’art	1
Problématique	1
Plan du document	2
I.1 L'élevage bovin en Afrique de l'ouest	5
I.1.1 Les systèmes de production d'élevage en Afrique de l'ouest	6
I.1.1.1 Les systèmes pastoraux	6
I.1.1.2 Le système agropastoral	8
I.1.1.3 Le système de ranch et stations étatiques	8
I.1.1.4 Les systèmes hors-sols	8
I.1.2 Les races bovines en Afrique de l'ouest	9
I.1.3 Un bref aperçu de l'élevage au Burkina Faso et au Bénin	10
I.1.3.1 L'élevage au Burkina Faso	10
I.1.3.2 L'élevage au Bénin	11
I.2 Les tiques du bétail en Afrique de l'ouest	13
I.2.1 Les communautés de tiques du bétail	14
I.2.2 Dynamique saisonnière d'infestation	15
I.2.3 Les maladies associées aux tiques du bétail	16
I.2.4 La lutte contre les tiques et les agents pathogènes transmis	17
I.2.4.1 La lutte contre les tiques	17
I.2.4.2 Lutte contre les agents pathogènes transmis par les tiques	20

I.3 Deux espèces de tiques d'importance vétérinaire majeure au Bénin et au Burkina Faso -----	23
I.3.1 <i>Amblyomma variegatum</i> -----	24
I.3.2 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> -----	25
I.3.3 Conséquences des invasions de <i>R. (B.) microplus</i> -----	28
 Chapitre 2 : Actualisation des connaissances sur les communautés de tiques en Afrique de l'ouest -----	31
II.1 Progression de <i>R. (B.) microplus</i> -----	31
Encart N°1: Adakal H., Biguezoton A., Zoungana S., Courtin F., De Clercq E. Madder M. 2013 – Alarming spread of the Asian cattle tick <i>Rhipicephalus microplus</i> in West Africa-another three countries are affected: Burkina Faso, Mali and Togo. <i>Exp Appl Acarol</i> 61(3): 383-386-----	33
II.2 Abondance et incidence de <i>R. (B.) microplus</i> au Bénin et au Burkina Faso-----	38
II.3 Facteurs régulant les assemblages d'espèces de tiques du bétail -----	40
Encart N°2: Biguezoton A., Adehan S., Adakal H., Zoungana S., Farougou S., Chevillon C. 2016. Community structure, seasonal variations and interactions between native and invasive cattle tick species in Benin and Burkina Faso. <i>Parasites & Vectors</i>. 9 (43). -----	42
 Chapitre 3 : Agents pathogènes du bétail transmis par les tiques en Afrique de l'ouest -----	63
III.1 Diversité génétique d' <i>E. ruminantium</i> : une information utile ? -----	63
Encart N°3 : Biguezoton A, Adakal H, Farougou S, Agbangla C, Chevillon C. Genetic structure of <i>Ehrlichia ruminantium</i> based on MLST: particularities of West-Africa within the African continent.-----	67
En préparation pour soumission à Infection, Genetics and Evolution. -----	67
III.2 Communauté d'agents pathogènes transmis par les tiques du sous-genre <i>Boophilus</i> en Afrique de l'ouest-----	113
Encart N°4: Abel S Biguezoton, Safiou Adehan, Hassane Adakal, Honorine Badolo, Mamadou Toure, Sébastien Zoungana, Souaïbou Farougou, Christine Chevillon. Interaction between <i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> tick-borne pathogens in the cattle from Benin and Burkina Faso. En préparation. -----	115
III.3 Probable transmission d' <i>Ehrlichia ruminantium</i> par <i>R. (B.) microplus</i> -----	151
Encart N°5: Biguezoton A, Noël V, Adéhan S, Adakal H, Zoungana S, Farougou S, Chevillon C. <i>Ehrlichia ruminantium</i> infects <i>Rhipicephalus microplus</i> in West-Africa. Accepté pour publication dans <i>Parasites & Vectors</i> en tant que 'short note'. -----	153
 Chapitre 4 : Apport de l'analyse de la génétique des populations de <i>R. (B.) microplus</i> -----	170



Encart N°6: Biguezoton A, Noël V, Adéhan S, Adakal H, Zoungrana S, Farougou S, Chevillon C. Population genetics of the invasive tick <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> in Benin and Burkina Faso (West Africa). En préparation. -----	174
---	------------

Chapitre 5 : Discussion générale, perspectives & conclusions -----	209
---	------------

5.1 Dynamique spatio-temporelle et interactions complexes des tiques du bétail en Afrique de l'ouest -----	211
---	------------

5.1.1 Variations des abondances et de la richesse spécifique de tiques -----	211
--	-----

5.1.2 : Diminution temporelle de la charge parasitaire de tiques au Centre du Burkina Faso en dépit de l'absence de <i>R. (B.) microplus</i> -----	212
--	-----

5.1.3 Interactions complexes entre les espèces de tiques du bétail en Afrique de l'ouest -----	213
--	-----

5.1.4 Utilité des informations d'interactions de tiques : cas des prédictions de distribution géographique-----	215
---	-----

5.2 Agents pathogènes transmis par les tiques du bétail : interactions interspécifiques, diversité génétique et probable nouveau vecteur-----	216
--	------------

5.2.1 Disparité entre les patrons d'interactions entre agents pathogènes et tiques vectrices -	216
--	-----

5.2.2 Impact de l'invasion de <i>R. microplus</i> sur l'épidémiologie des maladies transmises en Afrique de l'ouest : des traces d'une co-introduction de souches de <i>B. bovis</i> . -----	217
--	-----

5.2.3 Absence de corrélation significative entre <i>R. (B.) microplus</i> & <i>B. bovis</i> dans les sites d'expansion (récemment envahis) par <i>R. (B.) microplus</i> : résultante d'une coévolution hôte-vecteur? -----	218
--	-----

5.2.4 <i>E. ruminantium</i> : de la diversité génétique chez le vecteur habituel à la transmission par une espèce invasive en Afrique de l'ouest -----	218
--	-----

5.2.4.1 Diversité génétique d' <i>E. ruminantium</i> en Afrique de l'ouest et développement de vaccin contre la cowdriose -----	218
---	-----

5.2.4.2 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : un nouveau vecteur de <i>Ehrlichia ruminantium</i> en Afrique de l'ouest ?-----	220
--	-----

5.3 Génétique des populations de <i>R. (B.) microplus</i> et intérêts pour la lutte en Afrique de l'ouest ---	221
--	------------

Références bibliographiques -----	225
--	------------



Liste des figures

Figure 1: Synthèse des mouvements de bétail en zone sahélienne. (Source : Diop et al. 2012).....	7
Figure 2: Cycle de développement d' <i>Amblyomma variegatum</i> (à gauche) et <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (à droite).	23
Figure 3: Distribution de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> dans le monde en 2013	27
Figure 4: Distributions relatives des différentes espèces de tiques en Côte d'Ivoire et au Bénin (exprimées en pourcentage des adultes collectés sur bovins).	29

Liste des tableaux

Tableau I: Nombre de bovins produits en Afrique de l'ouest de 1994 à 2013. (Source : FAOSTAT 2015)	6
Tableau II: Les races bovines en Afrique de l'ouest. Source : (Rege 1999)	10
Tableau III: Estimation des pertes économiques annuelles dues aux tiques et aux maladies à tiques. Source : (Mapholi <i>et al.</i> 2014)	14
Tableau IV: Principaux pathogènes et maladies transmises par les tiques du bétail de l'Afrique de l'ouest	17

Liste des abréviations

ANOPER	Association Nationale des Organisations Professionnelles d'Eleveurs de Ruminants du Bénin
CAPES	Centre d'Analyse des Politiques Economiques et Sociales du Burkina Faso
CEDEAO	Communauté Economique des États de l'Afrique de l'Ouest
CIRDES	Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES)
CORAF/WECARD	Conseil ouest et centre africain pour la recherche et le développement agricoles/ West and Central African Council for Agricultural Research and Development
CSAO	Club du Sahel et de l'Afrique de l'Ouest
FAO	Food and Agriculture Organisation (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
FCFA	Franc de la Communauté Financière Africaine
IEPC	Initiative « Elevage, Pauvreté et Croissance »
INSAE	Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique du Bénin
MAEP	Ministère de l'Agriculture de l'Élevage et de la Pêche du Bénin
MRA	Ministère des Ressources Animales du Burkina Faso
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement économiques
PIB	Produit Intérieur Brut
TCC	Taurins à Courtes Cornes
UEMOA	Union Economique et Monétaire Ouest-Africaine
URBIO	Unité de recherche sur les bases biologiques de la lutte intégrée
WECATiC	Assessment of emerging livestock ticks and tick-borne disease threats and integrated control strategies in West and Central Africa (Contrôle intégré des tiques et des maladies transmises émergentes en Afrique de l'Ouest et du Centre) ; la présente thèse ainsi que celle de Safiou Adéhan (Univ. Abomey-Calavi ; directeur de thèse Prof.S. Farougou) s'inscrivent dans ce projet WECATiC qui fut retenu pour financement par l'agence australienne AusAid.



Glossaire

Agro éleveur	Agriculteur qui pratique aussi l'élevage. Dans les enquêtes on distingue selon l'activité dominante agriculteur-éleveur et éleveur-agriculteur.
Agropasteur	Agriculteur qui élève du bétail par tradition et dont les pratiques, dans le domaine des animaux, s'apparentent à celles des pasteurs, comme pour la transhumance.
Elevage extensif	Elevage essentiellement fondé sur l'utilisation des ressources naturelles (eau, pâturage, etc.), en général sans améliorer d'une façon notable le biotope. Il en résulte une productivité (ou charge) à l'hectare très faible.
Intrant	Objet économique qui entre dans une ou plusieurs opérations de production (fabrication, transformation, commercialisation, etc.).
Système d'embouche	Système d'engraissement à l'herbage (grass fattening, fattening on pasture) et mise en condition pour la boucherie. Il s'agit d'accélérer la croissance pondérale d'un animal dans les limites compatibles avec la santé, grâce à une alimentation supplémentée ou différenciée, distribuée tout ou partie ; au sens strict, il s'agit d'un accroissement du poids net. L'animal doit prendre du muscle, mais aussi du gras pour que la viande soit savoureuse. Le produit de l'embouche est un animal engraisé ou simplement en état.

Chapitre 1- Introduction : Problématique et Etat de l'art

Problématique

Le démarrage de cette thèse a été motivé par la forte inquiétude pour la santé des bovins d'Afrique de l'ouest que souleva la confirmation au cours des années 2000 de l'invasion de la sous-région ouest africaine par la tique asiatique du bétail *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Madder *et al.* 2007, 2012). Au cours des 150 années précédentes, cette espèce s'était avérée particulièrement invasive dans toutes les zones où des importations de bovins l'avaient introduite (Barré & Uilenberg 2010). De plus, dans toutes ces régions récemment envahies, *R. (B.) microplus* est rapidement apparue comme l'espèce associée aux plus fortes pertes économiques en élevage bovin (Frisch 1999), et ce, pour trois raisons principales : **(i)** la très faible réponse immunitaire de certaines races taurines vis-à-vis de cette tique, **(ii)** sa compétence vectorielle pour des agents pathogènes virulents pour le bétail (i.e. *Babesia bigemina*, *B. bovis* et *Anaplasma marginale*), et **(iii)** le développement récurrent et rapide dans ses populations de résistances à tous les acaricides utilisés en lutte (Frisch 1999; Chevillon *et al.* 2007a). A titre d'exemple, les pertes économiques annuelles causées par *R. (B.) microplus* furent estimées, au niveau mondial, entre 13 et 18 milliards de dollars US (de Castro 1997), et pour le seul sud du continent africain, à 160 millions de dollars US (Dold & Cocks 2001). Parallèlement, son installation a parfois profondément modifié les situations épidémiologiques dans les élevages bovins. Ainsi, son invasion du sud de l'Afrique à la fin du XIX^{ème} siècle s'est-elle accompagnée de l'exclusion compétitive de l'espèce-sœur autochtone, *R. (B.) decoloratus* dont les effets délétères directs sur la santé et la croissance des bovins étaient plus modérés (Theiler 1962; Tønnesen *et al.* 2004). Ce remplacement d'espèces s'est en outre accompagné de l'émergence d'un agent pathogène d'origine asiatique particulièrement virulent pour le bétail africain et dont *R. (B.) microplus* s'avérait le seul vecteur : *B. bovis* (Theiler 1962; Tønnesen *et al.* 2004; Zeman & Lynen 2010).

Or, l'élevage constitue une ressource clef pour le développement économique de la région sub-saharienne. Si sa contribution aux produits intérieurs bruts (PIB) nationaux y varie de 5% en Côte d'Ivoire à 44% au Mali (CEDEAO & CSAO/OCDE 2008), l'élevage fournit 34% des revenus monétaires des ménages ruraux au Burkina Faso (CAPES 2003; Zonon 2004). Même s'il ne permet pas encore à chaque pays de l'Afrique de l'ouest d'atteindre son autosuffisance en protéines animales, l'élevage permet de partiellement satisfaire les



besoins internes à cette sous-région et d'exporter progressivement vers les marchés extérieurs (FAO 2012). Par ailleurs, la production de viande bovine en Afrique de l'ouest est à 95% fournie par des systèmes extensifs à faibles intrants qui ne peuvent en aucun cas soutenir les achats d'acaricides nécessaires aux programmes de lutte contre *R. (B.) microplus* (CEDEAO & CSAO/OCDE 2008; CORAF/WECARD 2010).

Dès lors, comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'installation de *R. (B.) microplus* dans ces élevages à faibles intrants et les conséquences épidémiologiques d'une telle installation devenait alors un enjeu prioritaire pour l'économie de l'élevage et la production de protéines animales nécessaires aux populations d'Afrique de l'ouest. Cette thèse avait donc pour objectif de relever ce défi sachant que, contrairement à d'autres régions africaines, les données sur les communautés de tiques du bétail et des agents pathogènes associés restaient encore relativement rares dans la littérature.

Plan du document

Les systèmes d'élevage d'Afrique de l'ouest sont assez différents de ceux d'autres régions où les problèmes de santé vétérinaire liés aux tiques et/ou les moyens de lutte ont été plus intensivement étudiés. Nous commencerons donc ce chapitre d'introduction par une présentation de la particularité de ces systèmes d'élevage avant de présenter les données disponibles sur les tiques du bétail en Afrique de l'ouest et les agents pathogènes qu'elles y transmettent. Nous poursuivrons par une revue de la littérature sur les méthodes utilisées - et celles en cours de développement- dans la lutte contre les tiques tropicales et les maladies vétérinaires associées. En conclusion de chacune de ces parties, nous préciserons les méthodes de lutte effectivement mises en place en Afrique de l'ouest, et plus spécifiquement au Bénin et au Burkina Faso. Nous finirons cette introduction par une présentation des connaissances acquises sur les deux espèces de tiques d'importance vétérinaire majeure dans ces pays : *Amblyomma variegatum* et *R. (B.) microplus*.

Les trois chapitres suivants présenteront nos travaux de thèse ainsi que, sous forme d'encarts, les articles issus de ces travaux. Nous aborderons dans le **Chapitre 2** les questions relatives à la progression de l'invasion de l'Afrique de l'ouest par *R. (B.) microplus*. Dans un premier temps, nous avons suivi cette progression sur un maillage géographique lâche basé sur les alarmes que des éleveurs confrontés à « la nouvelle tique » firent remonter au CIRDES. Ensuite, nous avons analysé les variations d'assemblage d'espèces de tiques au sein



de troupeaux bovins sentinelles et cherché à identifier les facteurs régulant les variations d'abondance et d'incidence de chaque espèce. Ces travaux ont fait l'objet de deux articles (insérés en encarts n°1 et 2). Le premier parut en 2013 dans '*Experimental & Applied Acarology*' ; il avait pour objectif d'alerter sur la rapidité et l'ampleur de la progression de *R. (B.) microplus* en Afrique de l'ouest. Le second, publié dans '*Parasites & Vectors*' en 2016, présente une analyse détaillée de la composition des communautés de tiques du bétail au Bénin et Burkina Faso, de leur variabilité spatio-temporelle et du rôle des interactions interspécifiques dans la détermination de la variation des abondances et incidences de ces ectoparasites.

Le **Chapitre 3** se focalisera sur trois questions relatives aux agents pathogènes que ces tiques transmettent aux bovins et ovins ; chacune a fait l'objet d'un article (soumis ou en préparation ; inséré en encart n°3, n°4 ou n°5). Premièrement, nous nous sommes intéressés à l'agent de la coudriose, *Ehrlichia ruminantium*, qui s'avère responsable de mortalité parfois très élevée (> 80%) chez les ovins les plus susceptibles. En Afrique de l'ouest, cet agent pathogène est transmis par *Amblyomma variegatum*, une espèce trixène autochtone qui fut longtemps l'espèce de tique la plus abondante dans les troupeaux de la région. Nous avons questionné l'intérêt des informations apportées par la structuration de polymorphisme de gènes dits de ménage (i.e., d'évolution sélectivement contrainte et non-directement dépendante des interactions tiques-hôtes-pathogène) d'*E. ruminantium* pour la compréhension de la situation épidémiologique et le développement de solutions vaccinales efficaces. Deuxièmement, nous nous sommes interrogés sur la circulation d'agents pathogènes connus pour être transmis par les tiques du sous-genre *Boophilus* : *Babesia bovis*, *B. bigemina*, et *Anaplasma marginale*. Une telle focalisation s'appuyait sur l'hypothèse que l'installation de *R. (B.) microplus* allait prioritairement impacter les espèces autochtones du même sous-genre, c'est à dire *R. (B.) annulatus*, *R. (B.) decoloratus* et *R. geygyi*. Cette hypothèse s'appuyait à la fois sur l'expérience acquise lors de l'invasion du sud du continent africain par *R. (B.) microplus* au début du XX^{ème} siècle et les résultats de travaux effectués un siècle plus tard au Bénin (Madder *et al.* 2007, 2011, 2012; De Clercq *et al.* 2012). Troisièmement, nous avons interrogé la possibilité de transmission d'*E. ruminantium* par *R. (B.) microplus*. Nous verrons que cette démarche a apporté quelques résultats inattendus qui font l'objet d'une note soumise pour publication dans '*Parasites & Vectors*'.



Le **Chapitre 4** présentera notre développement d’outils pour caractériser la structure génétique des populations de la tique invasive *R. (B.) microplus* afin de mieux appréhender sa dynamique d’invasion. Ces travaux avaient également pour objectif de compléter la recherche en cours de molécules issues de plantes locales pour leurs propriétés acaricides efficaces vis à vis de *R. (B.) microplus* (doctorat de Safiou Adéhan à l’Université Abomey-Calavi ; Unité de Recherche en Biotechnologie de la Production et de la Santé Animales (URBPISA), Abomey Calavi, Bénin) dans le but de proposer une maille géographique de distribution de ces molécules qui soit la moins favorable au développement de résistances chez de *R. (B.) microplus*.

Le **Chapitre 5** clôturera ce document par une discussion de nos résultats et l’exposé des perspectives qu’ils ouvrent.



1.1 L'élevage bovin en Afrique de l'ouest

L'importance économique et sociétale de l'élevage en Afrique de l'Ouest se traduit par différents indicateurs. Ainsi, il fournit 34% des revenus monétaires des ménages ruraux contre 14% pour la production de végétaux au Burkina Faso (CAPES 2003; Zonon 2004). Sa contribution au PIB agricole national varie de 5% en Côte d'Ivoire à 44% au Mali (CEDEAO & CSAO/OCDE 2008). L'élevage permet à l'Afrique de l'ouest de partiellement satisfaire ses besoins internes et d'exporter progressivement vers les marchés hors de la sous-région, voire du continent (FAO 2012). Dans certains pays, la potentialité économique du secteur est considérable : c'est par exemple le cas du Niger où il a permis de dégager une valeur ajoutée de 155 milliards FCFA en 2004 (FAO 2012). Le Nigeria, le Mali et le Burkina Faso disposent aussi de fortes potentialités.

En 2013, le cheptel bovin de la sous-région ouest-africaine comptait 66 662 751 bovins, dont 51% (~20 000 000 têtes) au Nigéria, 13.63% (~8 800 000 têtes) au Burkina Faso et 3.17% (~2 116 000 têtes) au Bénin (FAOSTAT 2015). Ces nombres résultaient de deux décennies de croissance du cheptel, notamment du fait des grands pays pourvoyeurs de bovins que sont le Nigeria et le Mali (**Tableau I**).

En dépit de cet accroissement de la production, l'offre reste inférieure à la demande de viande du fait de la croissance démographique. Selon une étude conduite en 2005 (MRA 2005), on attend en 2016 un déficit entre l'offre et la demande de viande bovine de -97 000 tonnes dans le bassin ivoirien (Côte d'Ivoire, Ghana, Mali, Togo) et -226 000 tonnes dans le bassin nigérian (Bénin, Nigéria, Niger, Tchad, République centrafricaine, Cameroun).

Tableau I: Nombre de bovins produits en Afrique de l'ouest de 1994 à 2013. (Source : FAOSTAT 2015)

Pays	Nombre de bovins					Augmentation décennale (%)		
	1994	-	2003	2004	-	2013	1994-2003	2004-2013
Bénin	1286850		1680021	1722077		2116000	30.55	22.87
Burkina Faso	4849160		7311544	7457754		8800000	50.78	18.00
Cap Vert	18195		21823	22306		47500	19.94	112.95
Côte d'Ivoire	1231000		1392787	1420642		1585585	13.14	11.61
Gambie	348150		396000	408000		380000	13.74	-6.86
Ghana	1187000		1344000	1359000		1550000	13.23	14.05
Guinée	2031760		3375879	3561038		4965000	66.16	39.43
Guinée-Bissau	441530		520000	520000		670000	17.77	28.85
Liberia	36000		36000	36000		42000	0.00	16.67
Mali	5240860		6551799	6811473		10012966	25.01	47.00
Mauritanie	1100000		1600000	1650000		1850000	45.45	12.12
Niger	3864560		6529090	6929840		10200000	68.95	47.19
Nigeria	14881350		15163700	15700000		20000000	1.90	27.39
Sainte-Hélène, Ascension et Tristan da Cunha	673		695	695		700	3.27	0.72
Sénégal	2760000		3017513	3039472		3430000	9.33	12.85
Sierra Leone	370000		170000	200000		578000	-54.05	189.00
Togo	227100		285000	290000		435000	25.50	50.00
Afrique l'ouest	39874188		49395851	51128297		66662751	23.88	30.38

1.1.1 Les systèmes de production d'élevage en Afrique de l'ouest

La majorité des systèmes de production d'élevage de cette sous-région est traditionnelle (i.e., de types pastoraux et agro-pastoraux) et se caractérise par leurs faibles intrants. Il existe toutefois quelques systèmes impliquant de plus forts investissements en matière d'intrants.

1.1.1.1 Les systèmes pastoraux

Le Burkina Faso, le Mali, et le Niger sont les principaux pays concernés par ces systèmes de zones arides et semi-arides qui s'étendent jusqu'au nord du Sénégal et de la Mauritanie (FAO 2012). Ils représentent un tiers des élevages bovins et la moitié des élevages de petits ruminants, mais ils fournissent 60% de la viande de bovine, 40% de la viande de petits ruminants et 70% du lait de la sous-région (CORAF/WE CARD 2010). Il s'agit de systèmes traditionnels extensifs où la production animale dépend en grande partie de l'usage des ressources naturelles de terres non-appropriées aux cultures. Le bétail se retrouve dans des troupeaux généralement mixtes de bovins, moutons, chèvres, chameaux, ânes et/ou chevaux (CEDEAO & CSAO/OCDE 2008). Parmi les bovins, les zébus prédominent dans ces systèmes qui sont principalement contraints par les problèmes fonciers, les droits de propriété et la pénurie de ressources fourragères, notamment pendant la grande saison sèche s'écoulant d'octobre à

mai-juin selon les pays. Ici, c'est la disponibilité des zones de pâturage qui guide les mouvements des troupeaux (CORAF/WECARD 2010). Le nomadisme et la transhumance constituent les deux sous-systèmes majeurs. Le premier, en déclin, est caractérisé par un déplacement des éleveurs et de leur famille en fonction de la disponibilité locale de fourrages. La transhumance se définit par un mouvement saisonnier des troupeaux, bergers et éleveurs sur des distances plus longues. On distingue la petite et la grande transhumance. En majorité locale, la petite transhumance vise à valoriser les résidus de récoltes, à accéder aux meilleurs pâturages à tout moment ou à laisser place aux cultures de produits vivriers ou non. La grande transhumance correspond quant à elle à des mouvements de centaines de kilomètres de troupeaux de plus grandes tailles (FAO 2012). En Afrique de l'ouest, la grande transhumance se pratique en saison sèche et n'obéit à aucune structuration fixe du point de vue de ses modalités, de son organisation ou de sa fréquence. Les longues distances parcourues dépassent régulièrement les frontières du pays d'origine (transhumance transfrontalière ; cf la **figure 1** (Diop *et al.* 2012)). Par exemple, les bovins de Kayes (Mali) et leurs bouviers parcourent plus de 1 300 km pour rejoindre Dakar (Sénégal) (Sy 2010). Du fait de leurs demandes quantitatives et qualitatives en fourrages, les bovins sont les premiers concernés par la grande transhumance.

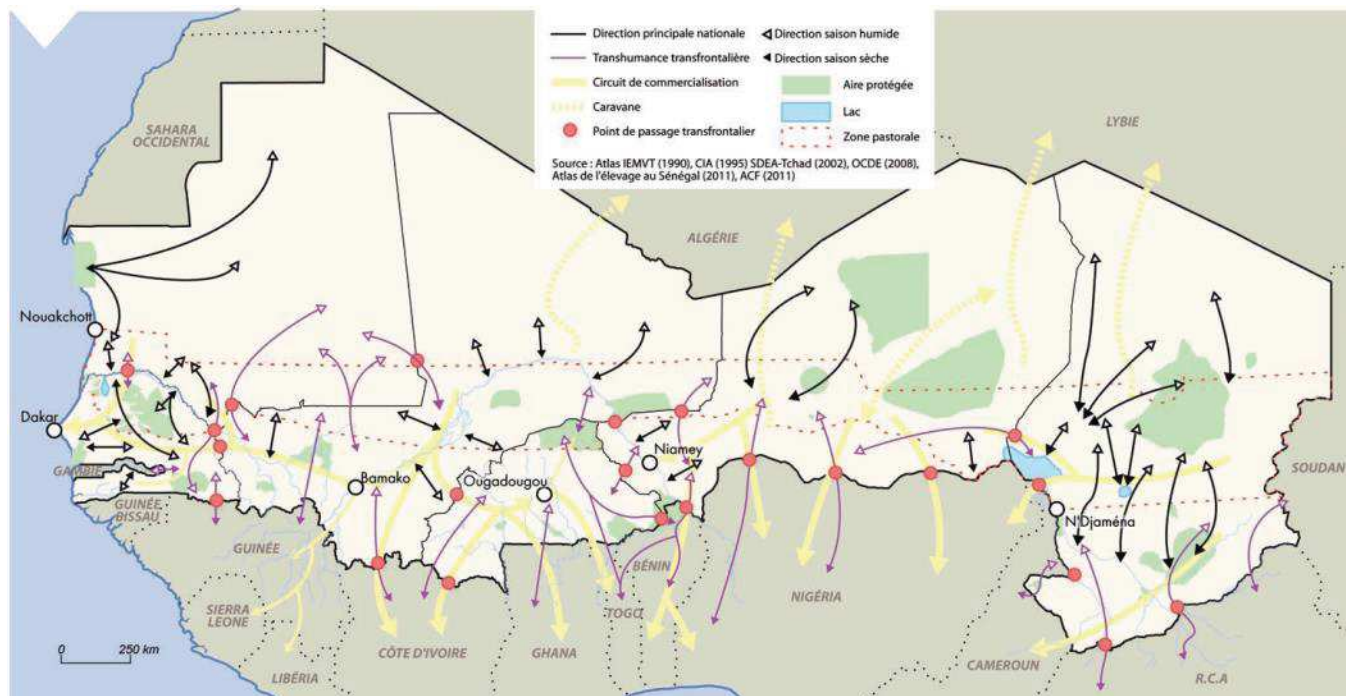


Figure 1: Synthèse des mouvements de bétail en zone sahélienne. (Source : Diop *et al.* 2012)

I.1.1.2 Le système agropastoral

Les agropasteurs sont des éleveurs qui pratiquent l'agriculture (voir Glossaire). Le système agropastoral est constitué de petits systèmes mixtes d'agriculture et d'élevage (CORAF/WECARD 2010) qui permettent d'augmenter la production animale tout en préservant les ressources naturelles. L'intégration de l'élevage dans les systèmes d'agriculture intensive facilite l'utilisation de fumier comme engrais et celle des animaux pour la traction et le transport des productions végétales. L'intégration favorise aussi l'utilisation des résidus de cultures comme aliments du bétail. De plus, l'argent de la vente d'animaux peut être réinvesti dans l'agriculture. Un des facteurs assurant le succès d'un tel système est la proximité des centres urbains favorisant l'écoulement des produits. Ce système est de plus en plus pratiqué par des éleveurs qui adoptaient jusque-là des systèmes pastoraux (CORAF/WECARD 2010). En Afrique subsaharienne, le système agro-pastoral contribue à 35% de la production de viande bovine et à 20% de viande de petits ruminants (CEDEAO & CSAO/OCDE 2008).

I.1.1.3 Le système de ranch et stations étatiques

Ce système, qui reste rare en Afrique de l'ouest, se pratique sur des pâturages privés ou étatiques (CORAF/WECARD 2010). Les États peuvent y avoir recours dans l'objectif de développer et encourager l'élevage d'une race spécifique. Ainsi le ranch de Marahoué en Côte d'Ivoire qui exploite le potentiel génétique des taurins N'Dama, le ranch de Madina-Diassa au Mali, ou celui de Toukounous au Niger exploitent le potentiel génétique du zébu Azawak ; une race bovine commune au Mali et au Niger (CORAF/WECARD 2010). Citons également la ferme d'Etat de Kpinnou au Bénin où des bovins Girolando (descendants de croisements Gir X Holstein) sont surtout exploités pour leurs performances laitières.

I.1.1.4 Les systèmes hors-sols

Ces systèmes se développent dans les villes ou à leurs périphéries. En Afrique subsaharienne, ils existent principalement dans les pays côtiers du Sénégal au Cameroun (CORAF/WECARD 2010). Ils ont pris de l'essor au cours des dernières années marquées par une urbanisation croissante et l'insatisfaction de la demande en produits animaux par les petits systèmes agricoles ou pastoraux de milieux ruraux. Indépendants de tout usage agricole, ces systèmes n'utilisent que le fourrage cultivé, les sous-produits agro-industriels, les céréales, les tourteaux de graines ainsi que le son, le foin et la paille. Ils se développent généralement en étroite collaboration avec les compagnies étrangères qui leur fournissent formules



d'alimentation, aliments concentrés, animaux reproducteurs et conseils. Ces systèmes sont toutefois confrontés à des difficultés dont le coût élevé des aliments du bétail et la concurrence des importations de viande bon marché d'Europe et d'Amérique Latine (CORAF/WECARD 2010).

1.1.2 Les races bovines en Afrique de l'ouest

L'Afrique de l'ouest héberge une grande diversité zoo-génétique de bovins domestiques. Outre les hybrides 'taurins x zébus', 13 races taurines et 12 races de zébu sont répertoriées (**Tableau II**). Les races taurines sont représentées par les Ndama, Kouri ainsi que le groupe multiforme des Taurins à Courtes Cornes (TCC) (Missohou & Adakal 2004). Leur aire de répartition est délimitée par les isohyètes 750 mm et 4000 mm, excepté pour le taurin Kouri qui vit en zone plus sèche. La N'dama et les TCC sont des animaux de petite taille (0,8 -1,2 m de hauteur) et de robe fauve (N'dama), noire ou pie noire (TCC). Les taurins ont un poids vif adulte minimum de 115 kg chez la femelle de race Somba du Bénin ou du Togo. Leur poids maximal peut atteindre 750 kg chez le mâle de race Kouri au Niger et au Nigeria (FAO 2012).

Les zébus – classés en zébus à courtes cornes, à cornes en lyre moyenne et haute – se rencontrent entre les isohyètes 200 mm et 600 mm dans la bande sahélienne. Ils sont plus grands que la plupart des taurins (1.1 m à 1.52 m) et plus productifs avec des robes de couleur variée (Missohou & Adakal 2004). Leur poids vif adulte minimum varie entre 240 kg, pour une femelle de race Sokoto, et 660 kg pour un mâle de la même race (FAO 2012).

Le rendement de la production laitière des races bovines locales est faible (de 0.5 à 2 litres/jour ; (FAO 2012)). Toutefois, une amélioration de la conduite et de l'alimentation devrait suffire à augmenter les productions de 0.5 litre/jour autour de 2 litres/jour de plus.

La faible productivité des races locales, tant en production de viande que de lait, incite au développement de programmes d'amélioration génétique qui font appel à des importations de reproducteurs en provenance d'Amérique Latine et d'Europe. C'est ainsi que les acteurs d'une ferme d'Etat au sud du Bénin (Kpinnou) et une ferme privée ivoirienne ont importé du Brésil des bovins sur pieds de race Girolando (Gir x Holstein) respectivement en 2002 et 2004, permettant ainsi une double introduction accidentelle de la tique invasive *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Afrique de l'ouest (Madder *et al.* 2011, 2012).

Tableau II: Les races bovines en Afrique de l'ouest. Source : (Rege 1999)

Type	Races	Localisation/Pays
Taurin	Baoulé	Côte d'Ivoire
	Forest Muturu	Nigeria
	Ghana Dwarf Muturu	Ghana
	Ghana shorthorn	Ghana
	Kouri	Niger, Nigeria
	Lagunaire	Bénin, Côte d'Ivoire, Togo
	Liberia Dwarf Muturu	Liberia
	Lobi	Burkina Faso
	Manjaca	Guinée Bissau
	N'Dama	Dans tous les pays Côtiers + Mali et Burkina Faso
	Savana Muturu	Nigeria
	Senegambia shorthorn	Sénégal, Gambie
	Somba	Benin, Togo
	Azawak	Burkina Faso, Mali, Niger
	Banyo	Nigeria
Zébu	Djelli (Diali)	Niger, Nigeria
	Gobra	Sénégal
	Maure	Mauritanie, Mali
	Ngaundéré	Nigeria
	Red Fulalli/ Mborro	Nigeria
	Shuwa	Nigeria
	Sokoto/Goudali	Nigeria
	White Fulani	Nigeria
	Yola	Nigeria
	Zébu Peul	Mali, Burkina Faso

1.1.3 Un bref aperçu de l'élevage au Burkina Faso et au Bénin

Les travaux développés au cours de cette thèse se sont focalisés sur les situations de deux pays : le Bénin (9°30' N, 2°15' E ; 114.620 km²) et le Burkina Faso (13° 00' N, 2° 00' W ; 275 000 Km²). Il s'agit de deux pays frontaliers, l'un côtier (Bénin) et l'autre Sahélien (Burkina Faso). Les productions annuelles de bovins s'y élevaient en 2013 à 2 116 000 têtes au Bénin et 8 800 000 têtes au Burkina Faso alors qu'elles n'étaient que de 1 722 077 et 7 457 754 têtes en 2004 (FAOSTAT 2015).

1.1.3.1 L'élevage au Burkina Faso

Le secteur rural occupe une place primordiale au Burkina Faso où 86% de la population totale (12.6 millions d'habitants en 2004) vit en milieu rural. L'élevage représente 27.2% de la valeur ajoutée nationale, constituant la deuxième ressource du secteur primaire burkinabé. Il s'agit d'un élevage extensif (voir Glossaire) dont les résultats paraissent éloignés des potentialités réelles du pays. En 2005, le cheptel était estimé à 7.6 millions de bovins, 17.7 millions d'ovins et caprins et 32 millions de volailles. En 2013, le cheptel bovin burkinabé se place au 4^{ème} rang

des pays de l'UEMOA (Union Economique Monétaire Ouest Africaine) derrière ceux du Nigeria, du Niger et du Mali (**Tableau I**). Il a connu une augmentation de plus de 600 000 têtes entre 2006 et 2010 (FAOSTAT 2015). Le cheptel bovin est essentiellement constitué de zébus peuls, de taurins (Baoulé, Lobi, N'dama) et d'une faible proportion de races introduites (Azawak, Sokoto/Goudali, Gir et Girolando).

Au Burkina Faso, la filière bovine compte sept systèmes d'élevage différents. Les systèmes à grande et petite transhumance pratiqués principalement par les ethnies peuls, représentent 60 % de la production nationale de viande. Les autres systèmes sont les élevages sédentaires, les élevages de bovins de traction utiles pour la culture du coton, les systèmes semi-intensifs laitiers de zébus peuls et métis, et le système d'embouche (voir Glossaire) souvent péri-urbaine. Ce dernier joue un rôle de régulation dans l'approvisionnement des grands centres urbains et des marchés d'exportation en animaux de bonne qualité. Le Burkina Faso exporte des animaux sur pieds principalement vers le Nigéria, le Ghana et la Côte d'Ivoire. Le Burkina Faso a exporté 428 000 têtes de bovins en 2005 contre 102 000 en 2003 (soit une progression de 46% en deux ans). Suite à la crise ivoirienne en 2001, un renversement de destinations d'exportation s'est opéré au profit du bassin nigérian (Bénin, Nigéria, Niger, Tchad, République Centrafricaine, Cameroun). Cette tendance tend à perdurer du fait que ce bassin nigérian reste déficitaire en production de viande contrairement au bassin ivoirien (Mali, Côte d'Ivoire, Ghana, Togo) (MRA 2006).

I.1.3.2 L'élevage au Bénin

L'élevage occupe une place prépondérante dans le dispositif de production agricole béninois. Il se situe à la seconde position après la production végétale en termes de ressources naturelles potentiellement convertibles en devises. La population agricole (les éleveurs, respectivement) représente 70% (60%, respectivement) de la population nationale. L'élevage contribue aussi aux services de l'agriculture à travers la production de fumier et l'apport de force de traction, notamment en zones cotonnières. En 2004, l'élevage a contribué à hauteur de 25% au PIB du secteur primaire et pour 6% du PIB national (MAEP 2004). Cette participation a connu une évolution irrégulière, n'atteignant que 5.5 % en 2012 (INSAE 2015). Avec une participation de 77% au PIB du sous-secteur de l'élevage, l'élevage bovin représente un maillon majeur de ce sous-secteur (MAEP 2004). Il se localise principalement dans le nord du pays. En 2013, la production bovine du Bénin représente la 7^{ème} de la sous-région en nombre de têtes d'animaux (**Tableau I**). Avec un taux d'accroissement annuel de 3.6%, le



cheptel bovin béninois est composé pour 31% de taurins de races Lagunaire et Somba, pour 7.7% de zébus M'bororo, Goudali et Foulani blanc ainsi que de 61.3% d'individus issus de croisements taurin x zébu (MAEP 2004). S'y ajoutent depuis 2004 quelques descendants de bovins Gir et Girolando importés du Brésil (Madder *et al.* 2012).

L'agropastoralisme transhumant est la forme d'élevage la plus pratiquée et celle qui contribue le plus fortement à l'économie nationale (ANOPER 2014). 75% de la production bovine provient des animaux élevés par des agropasteurs (voir Glossaire) contre 20% pour les bovins élevés par les agro-éleveurs (voir Glossaire). A titre de comparaison, les fermes publiques ou privées n'ont produit que 0.13% de la production bovine en 2013 (ANOPER 2014). Par ailleurs, on note que l'élevage de ruminants, initialement concentré dans le nord-Bénin, tend peu à peu à se développer au centre et au sud du pays.

1.2 Les tiques du bétail en Afrique de l'ouest

Les tiques sont des arthropodes (Camicas *et al.* 1998), dont le sous-ordre *Ixodina* (ou tiques dures) compte 702 espèces et 14 genres : *Amblyomma* (130 espèces), *Anomalohimalaya* (3), *Bothriocroton* (7), *Cosmiomma* (1), *Cornupalpatum* (1), *Compluriscutula* (1), *Dermacentor* (34), *Haemaphysalis* (166), *Hyalomma* (27), *Ixodes* (243), *Margaropus* (3), *Nosomma* (2), *Rhipicentor* (2) et *Rhipicephalus* (82 espèces dont 5 espèces appartenant au sous-genre *Boophilus*) (Guglielmone *et al.* 2010).

En régions tropicales, les tiques du bétail sont responsables des plus grandes pertes économiques connues en élevage (Uilenberg 1995). L'estimation des pertes économiques annuelles occasionnées par les tiques et les agents pathogènes dont elles sont vectrices varient de 1.5 million de dollars US en Ethiopie à 2 milliards de dollars US au Brésil (Newson 1991; Grisi *et al.* 2002) (**Tableau III**). Au niveau mondial, ces pertes furent évaluées à 7 milliards de dollars US en 1979 (McCosker 1979) et de 13 à 18 milliards de dollars US en 1997 (de Castro 1997) (**Tableau III**). Ces pertes résultent, d'une part, des effets délétères directs de ces ectoparasites. En effet, l'infestation de tiques est la cause d'anémie, de stress, de réduction de croissance et de production de lait, d'hypersensibilité ainsi que d'intoxication par la salive de tique qui peut de plus favoriser des infections secondaires (Jongejan & Uilenberg 2004). Ajouter à cela, l'infestation des tiques entraîne souvent la dépréciation de la peau/cuir des animaux. D'autre part, les tiques imposent des effets délétères indirects à leurs hôtes du fait de leur rôle de vecteur d'agents pathogènes dont certains peuvent être particulièrement virulents (e.g. *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Ehrlichia ruminantium*, etc.) pour le bétail présent en Afrique Sub-saharienne (Young *et al.* 1988).



Tableau III: Estimation des pertes économiques annuelles dues aux tiques et aux maladies à tiques.Source : (Mapholi *et al.* 2014)

Région/Pays	Coût (en dollars US)	Références
Monde	7 milliards	McCosker (1979)
Monde	13–18 milliards	de Castro (1997)
Afrique	160 millions	Dold et Cocks (2001)
Ethiopie	1.5 millions	Newson (1991)
Afrique du Sud	92 millions	Farmer's weekly (1998)
Brésil	2 milliards	Grisi <i>et al.</i> (2002)
Australie	184 millions	Playford <i>et al.</i> (2005)
Inde	498.7 millions	Minjauw et MacLeod (2003)

1.2.1 Les communautés de tiques du bétail

L'Afrique de l'ouest bénéficie encore de peu de données sur la structure des communautés de tiques du bétail. Avant l'introduction de *R. (B.) microplus*, les études se sont essentiellement focalisées sur *A. variegatum* pour deux raisons. D'une part, des suivis annuels de charges parasitaires de bovins ou d'ovins ont montré qu'elle constituait l'espèce la plus abondante (Kaboré *et al.* 1998; Farougou *et al.* 2006). D'autre part, elle est vectrice de l'agent de la coudriose (*E. ruminantium*), une maladie touchant ovins, caprins et bovins et pouvant induire de très fortes mortalités (>80%) chez certains ovins (Adakal *et al.* 2004). Au bilan, *A. variegatum* constituait donc l'espèce de tique autochtone responsable des plus fortes pertes économiques (Bayer & Maina 1984; Gueye *et al.* 1990; Koney *et al.* 1996; Kaboré *et al.* 1998; Farougou *et al.* 2006). En guise d'illustration, une étude comparative menée sur des bovins au Burkina Faso concluait à une perte de poids comprise entre 55g et 76 g par femelle *A. variegatum* gorgée (Stachurski *et al.* 1993). De plus, nous avons pu montrer au cours de mon master que la prévalence d'*E. ruminantium* chez les nymphes et adultes *A. variegatum* se stabilisait autour de 10% au sein de quatre régions béninoises (Farougou *et al.* 2012).

Trois espèces autochtones appartenant au sous-genre *Boophilus* [*R. (B.) annulatus*, *R. (B.) decoloratus*, *R. (B.) geigy*] représentaient aussi une menace pour la productivité des élevages bovins du fait de leur rôle de vecteurs d'agents pathogènes tels que *B. bigemina* et *A. marginale* (Uilenberg 1970; Bock *et al.* 2004; Aubry & Geale 2011). Enfin, trois espèces du genre *Hyalomma* (*H. impressum*, *H. marginatum rufipes*, *H. truncatum*) et quatre autres espèces du genre *Rhipicephalus* (non *Boophilus*) (*R. muhsamae*, *R. sanguineus*, *R. senegalensis*, *R. sulcatus*) représentaient de faibles pourcentages (< 5%) des tiques collectées

lors de suivis longitudinaux de charges parasitaires sur des troupeaux bovins béninois ou burkinabé (Kaboré *et al.* 1998; Farougou *et al.* 2006).

Malgré cette diversité d'espèces de tiques coexistant au sein des mêmes troupeaux d'Afrique de l'ouest, aucune étude antérieure ne s'était encore intéressée aux patrons de co-infestations que ce soit à l'échelle de l'individu-hôte ou du troupeau, ni au poids des interactions interspécifiques dans la variation spatio-temporelle des abondances et incidences de ces ectoparasites. Nous nous attacherons à cette question dans le **chapitre 2**.

1.2.2 Dynamique saisonnière d'infestation

L'activité saisonnière des tiques dépend de leur type de cycle de vie dit monoxène, dixène ou trixène. Ces distinctions caractérisent le nombre d'individu(s)-hôte(s) sur lequel un individu-tique se gorge au cours de son cycle de vie (un, deux ou trois, respectivement). Les espèces du sous-genre *Boophilus* sont des tiques monoxènes qui accomplissent donc l'ensemble de leur vie parasitaire sur le même individu-hôte. A l'exception de l'espèce du Moyen-Orient *R. kohlsi* et de cas d'évolution secondaire vers l'exploitation de Cervidés ponctuellement observés chez *R. (B.) microplus* (De Meeûs *et al.* 2010; Busch *et al.* 2014), les tiques monoxènes du sous-genre *Boophilus* sont spécialisées dans l'exploitation d'espèces-hôtes du genre *Bos* (Walker *et al.* 2003).

Les tiques *H. marginatum rufipes* et *H. truncatum* sont dixènes : elles exploitent bovins, ovins, chevaux et ongulés sauvages (Walker *et al.* 2003). Les autres tiques parasites des bovins et ovins d'élevage en Afrique de l'ouest (*A. variegatum*, *R. muhsamae*, *R. sanguineus*, *R. senegalensis*, *R. sulcatus*, *H. impressum*) sont des espèces trixènes dont le spectre d'hôte comprend également des buffles, des camélidés, des chiens, des rongeurs et des oiseaux (Centurier 1982; Walker *et al.* 2003).

Chartier *et al.* (2000) ont relevé qu'en zones tropicales, à l'exception des tiques du sous-genre *Boophilus* qui ont plusieurs générations par an, la majorité des espèces voient leurs stades adultes apparaître en saison des pluies. Ceci a été confirmé en Afrique de l'ouest par les suivis annuels de charges parasitaires de bovins et ovins qui furent effectués avant cette thèse : les saisons des pluies correspondaient à des pics d'abondance d'adultes *A. variegatum* (Kaboré *et al.* 1998; Farougou *et al.* 2006; Adakal 2009), *H. rufipes* (Kaboré *et al.* 1998; Adakal 2009) et de certaines espèces de *Rhipicephalus* à l'exception de *R. (B.) geigy* (Farougou *et al.* 2006).

Nous avons complété ces analyses en suivant non seulement la dynamique annuelle des abondances et incidences de ces tiques natives et de l'espèce invasive *R. (B.) microplus* en fonction de la géographie, de paramètres climatiques, mais également des patrons de co-infections des troupeaux. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le **chapitre 2**.

1.2.3 Les maladies associées aux tiques du bétail

Les maladies vectorielles à tiques les plus diagnostiquées chez les bovins et les ovins en Afrique de l'ouest sont la cowdriose, l'anaplasmose, la babésiose, et la theileriose (Gueye *et al.* 1990; Koney *et al.* 1996, 2004, Farougou *et al.* 2007c, 2012; Mbengue *et al.* 2007; Nwoha *et al.* 2013; Djakaridja *et al.* 2014). Ces maladies vectorielles impliquent des agents pathogènes bactériens et eucaryotes ; le **Tableau IV** récapitule ci-dessous les relations vecteurs-pathogènes-maladies.

La cowdriose, dont l'agent pathogène est la bactérie *E. ruminantium*, a été pendant longtemps la plus étudiée en Afrique de l'ouest. Cet intérêt provient non seulement de la forte mortalité qu'elle peut induire chez les ovins mais également du fait que son vecteur, *A. variegatum*, est l'espèce native de la sous-région la plus abondante (Bayer & Maina 1984; Gueye *et al.* 1990; Koney *et al.* 1996; Kaboré *et al.* 1998; Farougou *et al.* 2006). On notera toutefois que l'espèce *A. variegatum* peut également transmettre d'autres agents pathogènes tels les agents de theileriose que sont *Theileria mutans* et *Theileria velifera* aux bovins (Uilenberg *et al.* 1974; Saidu *et al.* 1984).

R. (B.) annulatus et *R. (B.) decoloratus* sont deux espèces natives du sous-genre *Boophilus* qui transmettent aux bovins *B. bigemina* (l'agent autochtone de babésiose) en Afrique de l'ouest ainsi que les agents d'anaplasmose que sont *A. marginale* et *A. centrale* (Uilenberg 1970; Bock *et al.* 2004; Aubry & Geale 2011). Les deux espèces natives *R. (B.) annulatus* et *R. (B.) geigy*, partagent avec l'espèce invasive *R. (B.) microplus* la propriété d'être compétentes pour la transmission des deux agents de babésiose : l'espèce africaine, *B. bigemina*, ainsi que l'espèce asiatique qui s'avère beaucoup plus virulente pour les bovins africains, *B. bovis* (Bock *et al.* 2004).

Les fortes infestations de tiques conduisent par ailleurs à la formation de "granuloma" (tissu cicatriciel) aux sites d'attachement sur leurs hôtes (Walker *et al.* 2003).

Nous traiterons dans le **Chapitre 3** comment l'épidémiologie des agents pathogènes transmis par les tiques du bétail a été impactée par l'installation de la tique invasive *R. (B.) microplus* en Afrique de l'ouest.

Tableau IV: Principaux agents pathogènes et maladies transmises par les tiques du bétail de l'Afrique de l'ouest

Agents Pathogènes		Maladies	Vecteurs	Référence
Eubactérie	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Cowdriose	<i>Amblyomma variegatum</i>	(Uilenberg <i>et al.</i> 1979)
	<i>Anaplasma marginale</i>	Anaplasmose	<i>Hyalomma marginatum rufipes</i> <i>Rhipicephalus (B.) annulatus</i> <i>R. (B.) decoloratus</i> <i>R. (B.) microplus</i> <i>R. senegalensis</i>	(Potgieter 1979; Uilenberg 1995; Futse <i>et al.</i> 2003; Aubry & Geale 2011)
	<i>A. centrale</i>	Anaplasmose	<i>R. (B.) annulatus</i> <i>R. (B.) decoloratus</i> <i>R. senegalensis</i>	(Uilenberg 1995; Aubry & Geale 2011)
Apicomplexe	<i>Theileria mutans</i>	Theilériose	<i>A. variegatum</i>	(Uilenberg <i>et al.</i> 1974; Saidu <i>et al.</i> 1984)
	<i>T. velifera</i>	Theilériose	<i>A. variegatum</i>	(Uilenberg 1981)
	<i>T. annulata</i>	Theilériose	<i>H. marginatum rufipes</i>	(Jongejan <i>et al.</i> 1983)
	<i>Babesia occultans</i>	Babésiose	<i>H. marginatum rufipes</i>	(Blouin & van Rensburg 1988)
	<i>B. bigemina</i>	Babésiose	<i>R. (B.) annulatus</i> <i>R. (B.) decoloratus</i> <i>R. (B.) geygyi</i> <i>R. (B.) microplus</i>	(Bock <i>et al.</i> 2004)
	<i>B. bovis</i>	Babésiose	<i>R. (B.) annulatus</i> <i>R. (B.) geygyi</i> <i>R. (B.) microplus</i>	(Akinboade & Dipeolu 1981; Uilenberg 1995)
?	"Toxine"	Suette	<i>H. truncatum</i>	(van Amstel <i>et al.</i> 1987)

1.2.4 La lutte contre les tiques et les agents pathogènes transmis

Il existe différentes méthodes de lutte contre les tiques et les agents pathogènes qu'elles transmettent. Des plus classiques aux plus technologiquement avancées, la science s'intéresse aux moyens de maîtriser la charge parasitaire des tiques et la circulation d'agents pathogènes qu'elles transmettent.

1.2.4.1 La lutte contre les tiques

Le détiqage manuel, la lutte acaricide ou encore l'utilisation de vaccins anti-tiques constituent les méthodes usuelles de lutte. Le détiqage manuel pratiqué par certains éleveurs sur des animaux faiblement infestés est souvent la première méthode de lutte dans les systèmes à faibles intrants (voir Glossaire) (Adakal *et al.* 2013b). La lutte acaricide, quant à elle, est celle à laquelle la majorité des éleveurs a recours notamment en périodes de forte

infestation. Les produits acaricides peuvent être appliqués sous forme de spray, de pulvérisation ou de bain. Dans le cadre de la lutte contre *A. variegatum*, Stachurski et Lancelot (2006) ont démontré l'efficacité du pédiluve acaricide qu'ils ont mis au point. Ce moyen de lutte reste néanmoins peu usité dans la sous-région. L'utilisation inadéquate et non contrôlée de beaucoup de produits chimiques aboutit souvent à la sélection de génotypes résistants au sein des populations de tiques, et conduisent donc à plus long terme à des échecs de lutte (Beugnet *et al.* 1994; Turkson & Botchey 1999; Baffi *et al.* 2008). Ce n'est toutefois pas le cas chez *R. (B.) geigy* (une espèce dont le court temps de génération en fait une espèce sentinelle de choix pour détecter ce type d'évolution indésirable) au Burkina Faso en dépit du fait que les éleveurs pratiquent fréquemment un recyclage de pesticides phytosanitaires à des fins de lutte acaricide (Adakal *et al.* 2013b).

A l'utilisation classique d'acaricides chimiques s'est récemment ajouté un essor spectaculaire de la recherche de molécules acaricides à partir d'extraits de plantes (Ghosh *et al.* 2011, 2013; Ravindran *et al.* 2012; Barbosa *et al.* 2013). Des extraits d'environ 55 plantes appartenant à 26 familles ont déjà été expérimentés pour lutter contre *R. (B.) microplus* (Borges *et al.* 2011). Il s'avère nécessaire de mentionner, également, l'usage par des éleveurs d'Afrique de l'ouest de différentes parties de certaines plantes locales. Ainsi, une étude réalisée en 2006 par Dossou-Gbete *et al.* (2006) dans le nord-Bénin a démontré que 58% (N = 51 sur 87) des éleveurs interrogés utilisaient des extraits de plantes traditionnelles préparées sur place selon différents procédés. Une étude en cours au Bénin sur ces savoirs autochtones a été menée dans le cadre du projet WECATiC (Contrôle intégré des tiques et des maladies transmises émergentes en Afrique de l'Ouest et du Centre) ; elle a montré que certains extraits végétaux induisent *in vitro* jusqu'à 100% de mortalité sur des larves de *R. (B.) microplus* (Adehan Safiou, communication personnelle).

Les vaccins à base d'antigènes de tiques, pratiqués dans certains systèmes à forts investissements, constituent des alternatives à l'usage d'acaricides chimiques ou extraits de plantes (Kimaro & Opdebeeck 1994). Ces vaccins induisent une réduction du nombre de femelles gorgées, de leur poids et de leur fertilité (Willadsen 2006). Etant données les grandes pertes économiques occasionnées, *R. (B.) microplus* fut l'une des premières espèces de tiques ciblées par ces recherches qui ont conduit au développement d'un vaccin basé sur l'antigène BM86 (de la Fuente *et al.* 2000). Ce vaccin, malgré ces limites dues notamment à la variation du gène BM86 a fourni des résultats satisfaisants dans certaines régions, et ce, y compris vis-



à-vis d'autres espèces de tiques (e.g. *R.(B.) annulatus* ; *R.(B.) decoloratus* ; *H. anatolicum* ; *H. dromedarii*) que *R. (B.) microplus* (De Vos *et al.* 2001; Pipano *et al.* 2003). Ce vaccin est commercialisé notamment à Cuba et en Australie. Le développement de vaccins anti-tiques continue (Schuijt *et al.* 2011; de la Fuente *et al.* 2015; Dogo *et al.* 2015), notamment du fait de la démocratisation des outils de génomique et protéomique pour la caractérisation des antigènes d'intérêt (de la Fuente & Contreras 2015). D'autres méthodes de lutte contre les tiques sont également expérimentées à partir de l'utilisation des ennemis naturels des tiques, telles que des guêpes parasitoïdes (Samish *et al.* 2004), des vers nématodes ou des spores de champignons (Angelo *et al.* 2012; Monteiro *et al.* 2013).

Mis à part ces moyens de lutte, des dispositions pratiques telles que la modification des plans de pâturage réduisant le contact tiques-bétail semblent relativement efficaces (Corson *et al.* 2003; Stachurski & Adakal 2010). L'utilisation d'animaux résistants naturellement à l'infestation des tiques est également un moyen de lutte intégrée contre les tiques. Même si peu d'éleveurs y adhèrent et que peu de données scientifiques s'y réfèrent (Frisch & O'Neill 1998; Frisch 1999), cette méthode de lutte pourrait s'avérer très utile au vu des effets secondaires potentiels des autres méthodes de lutte.

En outre, une étude récente conduite au Burkina Faso a révélé, qu'au côté des 15% d'agro-éleveurs recyclant des produits phytosanitaires dans la lutte acaricide, certains éleveurs (i.e. 12% ; N= 7 sur 60) ont recours à des méthodes non conventionnelles telles que le plâtrage des bovins par de la bouse de vache ou de l'huile de vidange (Adakal *et al.* 2013b). Au Bénin, Dossou-Gbété *et al.* (2006) ont conduit une étude au Nord du pays sur les méthodes endogènes de lutte contre les tiques. Parmi les méthodes traditionnelles de lutte citées par les participants, 58% se rapportaient à l'utilisation d'extrait de plantes, 89% aux mélanges de produits animaux et 35% à des procédés mécaniques (Dossou-Gbete *et al.* 2006). Les extraits de plantes sont utilisés non seulement sous formes de broyats de feuilles (mélangés avec de la cendre de cuisine ou délayés dans de l'eau) mais également de filtrats de feuilles, de fleurs ou de sève. Les mélanges de produits animaux comprennent de la bouse de vache (utilisée seule ou enfumée avec des herbes vertes) et de l'urine de bovins mélangée à du sable. Les procédés mécaniques quant à eux regroupent l'usage des pierres, du feu, du fer chauffé au rouge, du charbon ou de morceaux de pierre incandescent(e), du feu de brousse précoce (contre les tiques dans les pâturages) et des solutions concentrées de crésyl (Dossou-Gbete *et al.* 2006).

Néanmoins depuis l'arrivée de *R. (B.) microplus* en Afrique de l'Ouest l'utilisation, parfois intensive, de produits acaricides devient de plus en plus courante (Madder *et al.* 2011).

I.2.4.2 Lutte contre les agents pathogènes transmis par les tiques

Si la lutte anti-vectorielle constitue un premier pas dans la lutte contre les agents pathogènes transmis par les tiques, elle est complétée par l'utilisation de produits antimicrobiens et de vaccins ciblant ces agents pathogènes.

La lutte contre les agents d'anaplasmoses fait ainsi appel à la chimiothérapie et la vaccination (Demessie & Derso 2015). L'application de tétracycline (5-10 mg/Kg), d'imidocarbe (Taylor *et al.* 2007) ou de médicaments stimulant la production d'hématies ou protégeant le foie (Lefevre *et al.* 2010) constituent les traitements administrés en cas de déclenchement d'anaplasmose. Les animaux introduits en zone d'enzootie sont vaccinés au préalable. Il existe deux grandes familles de vaccins contre les *Anaplasma* spp : ceux à base de souches vivantes et ceux à base de souches inactivées - c'est-à-dire mortes ou du moins incapables de se reproduire (Demessie & Derso 2015)- lesquels induisent une réponse immunitaire de plus courte durée chez les bovins que les vaccins à base de souches vivantes (Radostits *et al.* 2007).

Les moyens de prévention et de lutte contre les babésioses incluent la lutte anti-vectorielle, l'immunisation du bétail et la chimio-prophylaxie (Demessie & Derso 2015). Le succès des traitements chimiques dépend de la rapidité et de la pertinence du diagnostic. L'utilisation d'une combinaison d'imidocarbe et du diminazene (trypanocide) protège les bovins pendant plusieurs mois. Le « Trypan blue » est très efficace contre *Babesia bigemina* mais n'a aucun effet sur *B. bovis* (Demessie & Derso 2015). L'imidocarbe, quant à lui, est efficace contre *B. bigemina* et *B. bovis*. La combinaison de l'imidocarbe dipropionate et de l'oxytétracycline est le moyen de traitement le plus efficace contre les *Babesia* spp chez le mouton et la chèvre (Ijaz *et al.* 2013). Par ailleurs, l'importance relative des espèces de *Babesia* influe sur la composition des cocktails vaccinaux. *B. bigemina* cause plus de maladies que *B. bovis* dans plusieurs régions africaines (dont l'Afrique de l'ouest), alors qu'en Australie, *B. bovis* est responsable de 20 fois plus de pertes économiques que *B. bigemina* (Bock *et al.* 2004). Des vaccins à bases de souches vivantes peuvent fournir plus de 95% de protection chez les animaux (Bock *et al.* 2004). Des recherches sur des vaccins recombinants (Norimine *et al.*

2002; Wilkowsky *et al.* 2003) et de vaccins dérivés de souches cultivées (Pudney 1992) ont également été entreprises.

Les principaux moyens de lutte contre les agents pathogènes de la theileriose (*T. parva* notamment) comprennent : (i) d'une part, la lutte anti-vectorielle, le contrôle des déplacements de bovins, l'immunisation des animaux ou la chimiothérapie, et (ii) d'autre part, les méthodes intégrées qui combinent tous ces moyens de lutte (Gachohi *et al.* 2012). Il existe deux types de vaccins contre les *Theileria* spp : les vaccins à base de sporozoïtes, et ceux, privilégiés, à base de schizontes (Mandal 2012). La vaccination contre *T. parva* est basée sur le couplage d'une infection volontaire et d'un traitement curatif. Ceci correspond donc à une vaccination des bovins avec une solution dérivée de sporozoïtes issus de tiques qui est doublée d'un traitement à base de tétracycline. Il s'ensuit une réaction apparente de theileriose suivie d'une guérison (Morisson & Mc Keever 2006)). L'oxytétracycline constitue un moyen efficace de lutte contre la theileriose si elle est appliquée au même moment que la vaccination afin de bloquer à la fois le parasite et la maladie (Nambota *et al.* 1994).

La lutte contre *E. ruminantium* (agent pathogène de la cowdriose) est basée sur la lutte contre la tique vectrice (*A. variegatum*), le couplage de l'injection volontaire de l'agent pathogène et d'un traitement curatif, ainsi que sur l'administration régulière d'antibiotiques (tétracyclines) (Allsopp 2009). Ces différentes méthodes ont montré leurs limites, ce qui a incité à des expérimentations de trois types de vaccins : des vaccins à base de souches inactivées (Jongejan 1991; Martinez *et al.* 1994; Totté P *et al.* 1997; Mahan *et al.* 1998; Adakal *et al.* 2010b), de souches atténuées (Zweygarth *et al.* 2005, 2008) ou d'ADN recombinants (Nyika *et al.* 1998; Collins *et al.* 2003; Simbi *et al.* 2006). Malgré des résultats très satisfaisants obtenus en conditions de laboratoire [induisant jusqu'à 100% de protection dans certains cas, (Collins *et al.* 2003)], ces vaccins induisent souvent des résultats bien moins satisfaisants sur le terrain, c'est-à-dire pour des animaux confrontés à l'infection par des souches sauvages. Ces insuccès révèlent donc une forte variabilité antigénique dans les populations naturelles d'*E. ruminantium*, et ce, au sein d'un même village burkinabé (Adakal *et al.* 2004). Toutefois, il s'avère difficile de caractériser ce niveau de variabilité antigénique- et donc d'adapter les cocktails vaccinaux en conséquence – puisque la base génétique des antigènes d'*E. ruminantium* reste encore inconnue. Pour autant, la structure génétique observée à partir de gènes de ménage d'*E. ruminantium* est-elle totalement inutile à la compréhension de la

situation épidémiologique et/ou à la lutte contre cet agent pathogène ? Nous adresserons ces questions dans le **chapitre 3** en nous focalisant sur le cas du Bénin et du Burkina Faso.

Les méthodes traditionnelles de lutte contre les maladies à tiques en Afrique de l'Ouest rejoignent pour la plupart celles utilisées pour lutter contre les tiques (Cf. section II.4.1). Il n'existe pas de méthode spécifique à chaque agent pathogène transmis par les tiques. Cependant, les plantes utilisées pour les traitements varient souvent selon l'affection en cause. De plus, le jus d'écorce ou le décocté de l'écorce de *Khaya senegalensis* mélangé à l'urine de bovin cicatrise ou accélère la cicatrisation des plaies causées par la fixation des tiques (Dossou-Gbete *et al.* 2006). Toutefois, l'utilisation d'antibiotiques conventionnels pour lutter contre les maladies à tiques rentre de plus en plus dans la pratique des éleveurs au Bénin et au Burkina Faso.

1.3 Deux espèces de tiques d'importance vétérinaire majeure au Bénin et au Burkina Faso

L'expansion de la distribution géographique des tiques est liée non seulement aux déplacements de leurs hôtes, mais aussi à de nombreux facteurs d'origine anthropique tels que les échanges commerciaux à longues distances, l'aménagement des territoires et/ou les effets des changements climatiques (Léger *et al.* 2013). *A. variegatum* et *R. (B.) microplus* (**Figure 2**) sont deux espèces de tiques d'importance vétérinaire majeure dans nos zones d'études que sont le Bénin et le Burkina Faso.

Les analyses biogéographiques servent à retracer l'histoire démographique des espèces. Elles consistent en des analyses phylogénétiques de séquences obtenues pour des gènes très conservés (i.e. à faible taux de mutation et évoluant principalement sous l'action de pressions de sélection purifiante) et localisés dans des régions non-recombinantes du génome de l'espèce étudiée. Il s'ensuit l'identification des lignées évolutives regroupant, chacune, les séquences les plus apparentées, puis l'inférence des mouvements de dispersion à partir de l'aire de distribution de chaque lignée évolutive (Chevillon & Huber 2016).

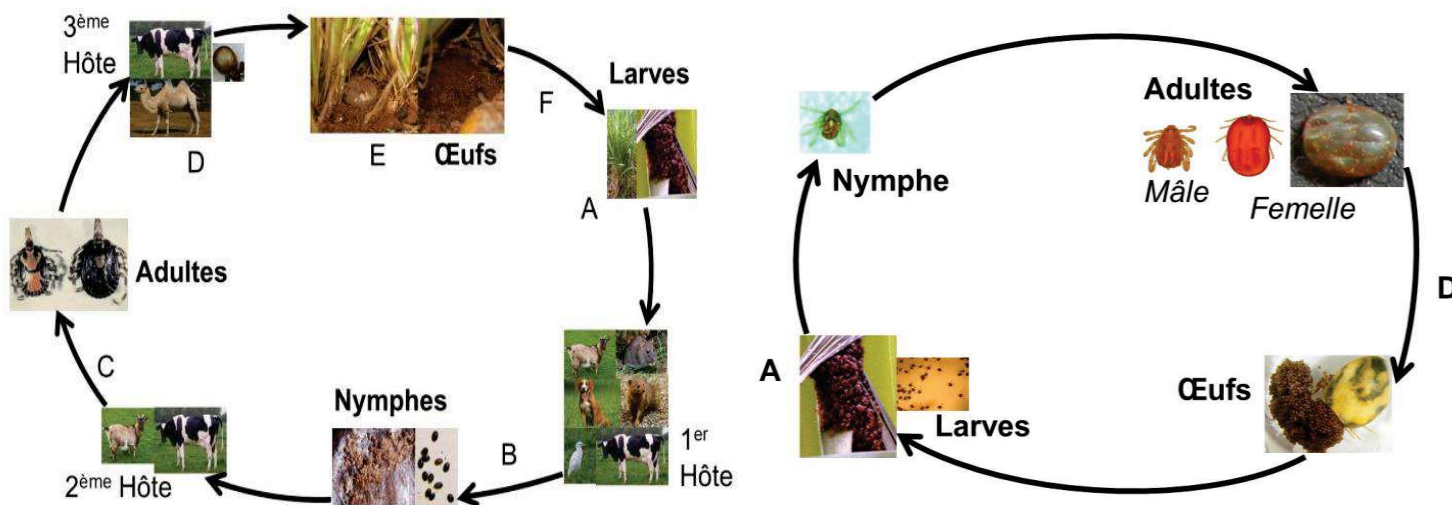


Figure 2: Cycle de développement d'*Amblyomma variegatum* (à gauche) et *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (à droite).

La première est une espèce trixène, c'est-à-dire qu'elle exploite trois individus-hôtes différents au cours de son cycle, tombant à terre pour muer ou pondre après chaque repas sanguin. La seconde est une espèce monoxène, c'est-à-dire qu'elle accomplit l'ensemble de sa vie parasitaire sur le même individu-hôte. Ces deux espèces diffèrent également par leur gamme d'hôtes : la première parasite l'ensemble des ruminants domestiques ou sauvages. La seconde est plutôt spécialisée sur les espèces du genre *Bos* bien que sa présence sur des hôtes cervidés sauvages soit rapportée en Nouvelle Calédonie & au sud des Etats-Unis. Les lettres réfèrent aux événements suivants. **A** : Après éclosion des œufs les larves se mettent en grappe dans les herbes à l'affût d'un hôte. **B** : Après le repas sanguin sur le 1^{er} hôte les larves chutent au sol où elles se métamorphosent en nymphes. **C** : Après gorgement sur le 2^{ème} hôte les

nymphes chutent au sol où elles se métamorphosent en adultes. **D** : Les adultes se gorgent sur le 3^{ème} hôte. Les femelles gravides chutent pour pondre à terre. **E** : Les femelles pondent des œufs (10 à 20 000, *A. variegatum* et 500, *R. (B.) microplus*) sous une touffe d'herbe ou une pierre. **F** : Eclosion.

1.3.1 *Amblyomma variegatum*

A. variegatum est l'espèce du genre *Amblyomma* présentant la plus large distribution géographique, laquelle couvre l'ensemble de la zone sub-saharienne du Sénégal à l'Ethiopie, l'Afrique centrale, une grande partie de l'Afrique de l'est ainsi que diverses îles de l'océan indien et des Caraïbes (Walker & Olwage 1987). En Afrique, cette tique parasite des ruminants tant sauvages que domestiques.

Les études phylogéographiques menées sur cette espèce suggèrent que l'histoire du développement de l'élevage bovin en Afrique et l'importation plus récente de bovins africains aux Caraïbes ont contribué à l'expansion de son aire géographique (Beati *et al.* 2012; Stachurski *et al.* 2013; Chevillon & Huber 2016). Ces données mettent effectivement en évidence deux subdivisions complémentaires de l'espèce en lignées mitochondriales. Un premier jeu de marqueurs identifie une subdivision entre une lignée « Afrique de l'ouest », présente en Afrique de l'ouest et aux Caraïbes, et une lignée « Afrique de l'est », présente au sud et à l'est du continent africain (Beati *et al.* 2012). Un second jeu de marqueurs distingue une lignée « mondiale », distribuée sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce, et une lignée « Afrique de l'est », présente à l'est du continent et dans les îles de l'océan indien (Stachurski *et al.* 2013). Dans les deux cas, la subdivision est-ouest du continent africain est parallèle à celle observée au sein des géotypes des bovins domestiques (Hanotte *et al.* 2002). Cette analyse phylogéographique des bovins domestiques africains met en exergue que ce cheptel résulte de la superposition de deux grands pans historiques : (i) la diffusion de l'élevage des taurins depuis l'Égypte vers l'Afrique de l'ouest puis le sud du continent, et (ii) le couplage d'une importation régulière de zébus le long de la côte orientale du continent et de la diffusion depuis cette côte vers le sud du continent de descendants de croisements 'taurins x zébus' (Hanotte *et al.* 2002). Dès lors, compte-tenu également du large spectre d'hôtes sauvages de cette tique, certains auteurs suggèrent qu'*A. variegatum* fut une tique de ruminants africains sauvages qui a réussi à capturer les bovins domestiques comme nouveaux hôtes au début de l'histoire africaine du développement de l'élevage bovin, et que c'est cette capture, couplée aux échanges culturels et commerciaux, qui lui a permis de coloniser l'ensemble du continent (Chevillon & Huber 2016).

La sortie d'Afrique d'*A. variegatum* peut être retracée en couplant les résultats des études biogéographiques (Beati *et al.* 2012; Stachurski *et al.* 2013) aux quelques données historiques (Estrada-Peña *et al.* 2007; Stachurski *et al.* 2013; Chevillon & Huber 2016). Sa présence aux Caraïbes résulte de l'importation de bétail d'Afrique de l'ouest durant le commerce triangulaire (Barré & Uilenberg 2010; Beati *et al.* 2012; Chevillon & Huber 2016). *A. variegatum* a colonisé la Guadeloupe, Marie-Galante, Antigua et la Martinique en 1948, puis la quasi-totalité des Petites Antilles et Porto-Rico (Grandes Antilles) entre 1967 et 1988. Cette colonisation s'explique par des déplacements de bétails entre îles. Toutefois, la dispersion du héron garde-bœuf, *Bubulcus ibis* qui a proliféré dans les années 1970-1980 a constitué un facteur supplémentaire de dispersion (Corn *et al.* 1993). Dans les îles de l'Océan Indien les données historiques sur l'introduction de *A. variegatum* restent peu informatives (Stachurski *et al.* 2013). Sa présence est reportée pour la première fois à Madagascar en 1899, à la Réunion en 1949, sur l'île Maurice fin XIX^{ème} alors qu'elle est bien plus tardive aux Comores et à Mayotte (Stachurski *et al.* 2013). L'hypothèse d'une introduction d'*A. variegatum* dans tous ces territoires depuis l'Afrique orientale est confirmée par l'observation de la coexistence des lignées mitochondriales « Afrique de l'est » et « mondiale » dans les populations malgaches (Stachurski *et al.* 2013). Bien que les conditions climatiques de Rodrigues lui soient favorables, elle ne semble pas (encore) s'y être installée (Barré & Morel 1983). De même, elle ne semble pas avoir terminé la colonisation de tous les habitats malgaches favorables (Stachurski *et al.* 2013).

1.3.2 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Les travaux de Murrell *et al.* (2000, 2001) et de Beati & Keirans (2001) ont démontré que la conservation d'un genre *Boophilus* rendrait paraphylétique le genre *Rhipicephalus* du fait de l'inclusion du premier dans le second. Rendre cohérente la systématique demandait donc : **(i)** soit de créer des genres monophylétiques pour chaque sous-clade de *Rhipicephalus* spp apparaissant frère du clade *Boophilus* ; **(ii)** soit de considérer *Boophilus* comme un sous-genre de *Rhipicephalus*. Cette seconde solution, proposée par Murrell *et al.* (2001) et Murrell & Backer (2003), fut finalement acceptée par les acarologues. Les cinq espèces du sous-genre *Boophilus* se nomment donc aujourd'hui *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus (Boophilus) geigyi*, *Rhipicephalus (Boophilus) kohlsi*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Dans ce document les nomenclatures abrégées de ces espèces sont respectivement désignées par *R. (B.) annulatus*, *R. (B.) decoloratus*, *R. (B.) geigyi*, *R. (B.) kohlsi* et *R. (B.) microplus*.



Le berceau d'origine de *R. (B.) microplus* correspond à celui de diversification d'espèces de bovins domestiques asiatiques : banteng (*Bos javanicus*), gaur (*B. frontalis*) et kouprey (*B. sauveli*). Ce berceau correspondrait aux actuels Vietnam, Malaisie, Philippines et/ou Indonésie (Barré & Uilenberg 2010). Cette partie du monde héberge effectivement la plus grande diversité des lignées mitochondriales du complexe *R. (B.) microplus sensu lato* (Burger *et al.* 2014; Low *et al.* 2015) alors qu'une même lignée mitochondriale qualifiée de *R. australis* a colonisé la région pacifique (Labruna *et al.* 2009) et qu'une autre lignée mitochondriale remarquablement peu diverse que nous qualifierons donc de *R. (B.) microplus sensu stricto* est présente dans certaines localités australiennes (Estrada-Peña *et al.* 2012) ainsi que dans toutes les régions africaines et américaines colonisées par ce complexe (Labruna *et al.* 2009; Burger *et al.* 2014; Low *et al.* 2015 ; Chevillon et Duron, résultats non publiés).

L'histoire complexe de la domestication des bovins en Asie et de la diffusion de cette pratique dans ce continent est impliquée dans la diffusion probable de différentes lignées mitochondriales du complexe vers l'Afghanistan oriental, le Bangladesh, l'Inde, le sud de la Chine, la Corée du Sud, le Japon et la Papouasie Nouvelle-Guinée (Barré & Uilenberg 2010). En revanche, ce sont les échanges commerciaux de bovins domestiques descendants des taurins et des zébus (*B. taurus* et *B. indicus*, respectivement) qui expliquent probablement la formidable expansion géographique de la lignée mitochondriale *R. (B.) microplus sensu stricto* sur les continents africain, américain, et, dans une moindre mesure, australien ainsi que dans diverses îles de l'océan indien (Barré & Uilenberg 2010).

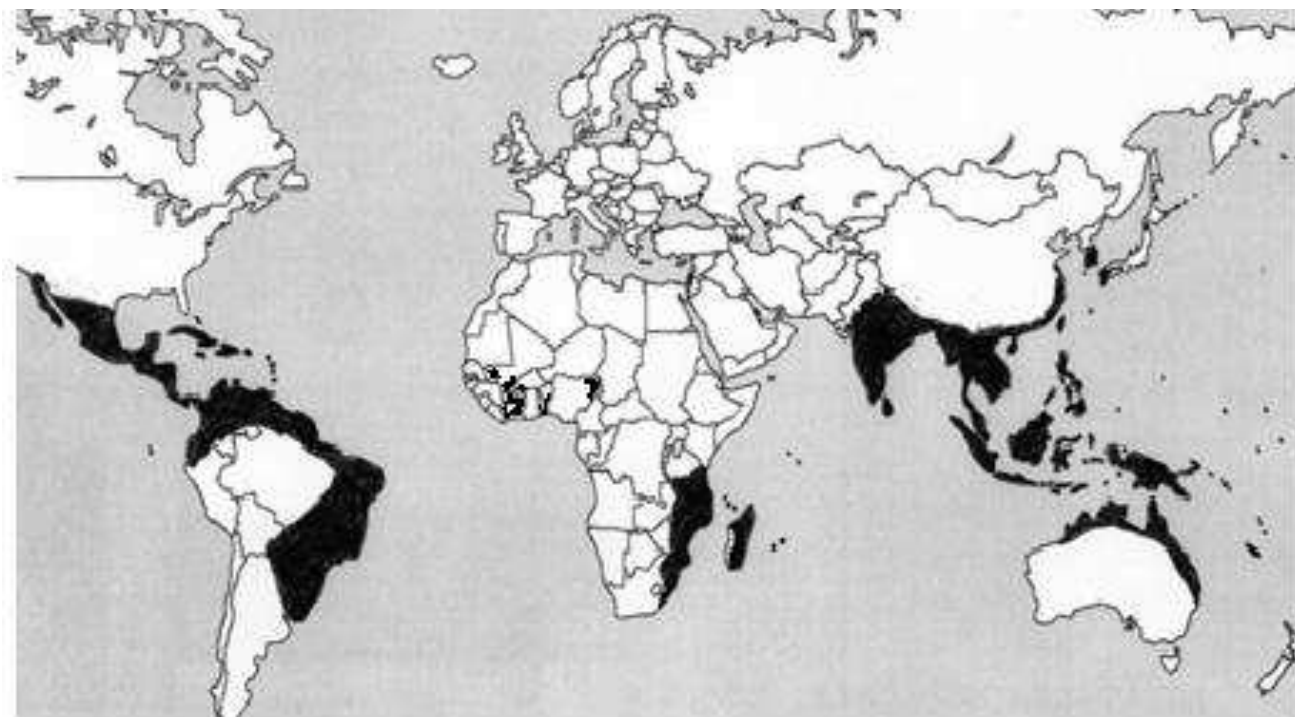


Figure 3: Distribution de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* dans le monde en 2013

(Sources : Barré et Uilenberg 2010 ; Madder et al 2011 ; Toure et al 2014 ; Adakal et al 2013 ; Opara et Ezech 2011)

Les premières observations formelles de *R. (B.) microplus* à Madagascar datent de 1899 (Barré & Uilenberg 2010). En Afrique, elle a été mise en évidence au sud du continent à partir de la fin XIX^{ème} (Zeman & Lynen 2010) et à l'ouest dans la première décennie du XXI^{ème} (Madder *et al.* 2007, 2011, 2012; Adakal *et al.* 2013a). L'origine de *R. (B.) microplus* en Amérique pourrait être multiple (Barré & Uilenberg 2010). En 1907, *R. (B.) microplus* était installée en Californie, au Nord de la Caroline et au Texas suite à l'invasion – conjointe avec *R. (B.) annulatus* – du Sud des Etats-Unis. L'éradication de ces tiques a eu lieu au sud des Etats-Unis pour la première fois en 1943 (Bram & Gray 1979). Mais, suite à de nouvelles invasions en provenance du Mexique, de nouveaux programmes de lutte ont dû être mis en place (George 1987). *R. (B.) microplus* a également envahi l'ensemble de l'Amérique Centrale, la Colombie et le territoire du Venezuela s'étendant jusqu'à l'Uruguay et l'Argentine (Estrada-Peña *et al.* 2006). La présence de l'espèce au Brésil proviendrait de l'introduction en 1870-1895 des zébus d'origine indienne tels que les Girs (1890), le zébu Kankrej (appelé Gujerà au Brésil) (~1870), et les zébus Ongole (Nelore au Brésil) (~1895) (Barré & Uilenberg 2010). En Australie, il y a eu plusieurs introductions de buffles, bantengs et zébus d'origines indiennes et/ou indonésiennes entre 1824 et 1850, ce qui explique la coexistence actuelle des lignées *R. australis* et *R. (B.) microplus sensu stricto*. *R. (B.) microplus* parvint à coloniser tous les habitats australiens favorables en moins d'un siècle

(Angus 1996) avec une vitesse de colonisation proche de 4.5 km/an (Barré & Uilenberg 2010). Elle a été introduite d'Australie en Nouvelle Calédonie en 1942 par les troupes américaines pendant la deuxième guerre mondiale avec leurs équidés (Rageau & Vervent 1959; Bennett 2004). Des analyses de génétique des populations ont ensuite confirmé que cette introduction en Nouvelle Calédonie résultait bien d'un très petit nombre d'individus du fait de la persistance de la signature de « goulot d'étranglement » au sein des populations néocalédoniennes (De Meeûs *et al.* 2010).

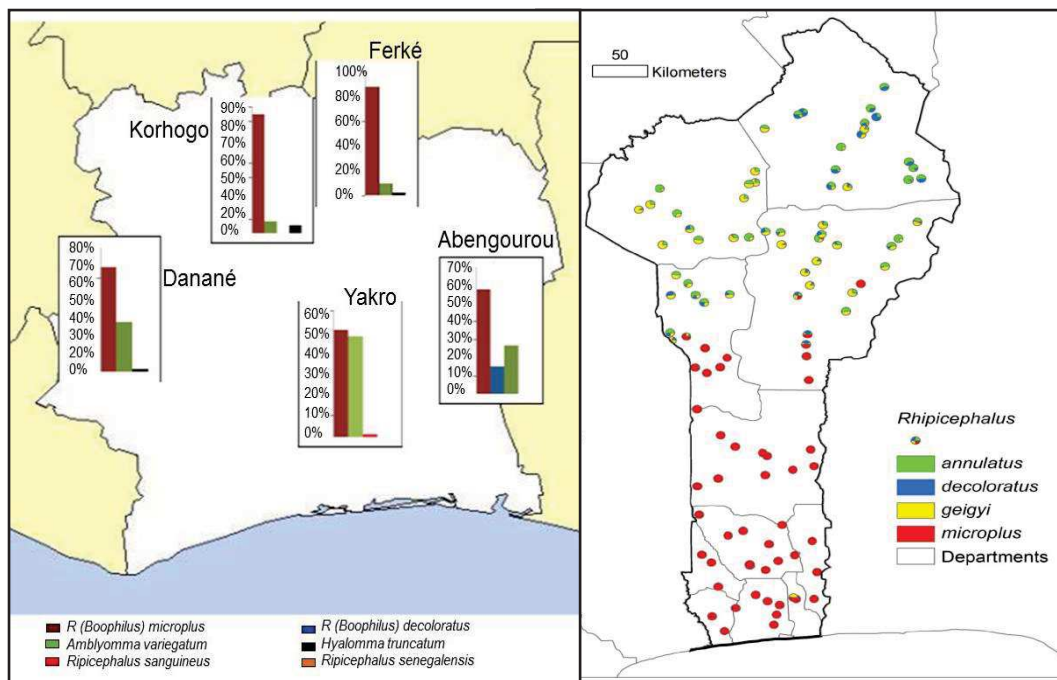
1.3.3 Conséquences des invasions de R. (B.) microplus

En Afrique du sud, l'installation de *R. (B.) microplus* a conduit à une compétition interspécifique résultant en une modification des communautés de tiques du bétail. Dans cette région, son installation a conduit au déplacement compétitif de l'espèce-sœur native, *R. (B.) decoloratus* [voir pour revue (Zeman & Lynen 2010)]. La plus grande fertilité de *R. (B.) microplus* en élevage bovin et son plus fort potentiel d'évolution vers des phénotypes résistants aux acaricides expliqueraient ces résultats. Toutefois, comparativement à *R. (B.) microplus*, *R. (B.) decoloratus* serait plus capable d'exploiter les ruminants sauvages et moins sensible aux conditions climatiques d'altitude. C'est ainsi que l'on explique qu'en Tanzanie l'espèce native ait été repoussée dans les élevages bovins d'altitude et réduite à l'exploitation de ruminants sauvages à basse altitude (Lynen *et al.* 2008). Ailleurs pourtant, *R. (B.) microplus* s'est avéré capable d'exploiter des Cervidés sauvages, que ce soit aux Etats Unis (Busch *et al.* 2014) ou en Nouvelle Calédonie (De Meeûs *et al.* 2010). En Afrique de l'ouest, l'installation de *R. (B.) microplus* semble également se faire au détriment des espèces natives de tiques du bétail. Elle semble par ailleurs s'accompagner de phénomènes évolutifs inédits jusque-là : l'hybridation de *R. (B.) microplus* avec les espèces natives *R. (B.) annulatus* et *R. (B.) decoloratus* (M. Madder, communication personnelle). La fréquence de tels croisements est d'environ 1% au Bénin (Sungirai 2012), mais la fertilité ou non des hybrides, l'impact de ces phénomènes sur le succès d'invasion de l'Afrique de l'ouest par *R. (B.) microplus* sont autant de points non encore élucidés.

L'installation de *R. (B.) microplus* peut modifier la communauté locale des agents pathogènes transmis par les tiques du bétail. Ce fut le cas en Afrique du Sud où l'introduction de la tique invasive s'est accompagnée de l'apparition de foyers du plus virulent des agents pathogènes de babésiose (*Babesia bovis*) dont elle était la seule espèce vectrice (Zeman & Lynen 2010).



Les études, décrites dans les **chapitres 2 et 3**, que nous avons respectivement développées au niveau des communautés de tiques du bétail ou des communautés d'agents pathogènes transmis par ces tiques nous permettront de faire un point de la situation en Afrique de l'ouest.



Le développement de résistance aux produits acaricides couramment utilisés en lutte (alourdissant donc d'autant les coûts économiques de la lutte contre cette espèce) est une autre caractéristique de *R. (B.) microplus*. Cette espèce a développé des résistances vis-à-vis de 43 molécules différentes ; ce qui en fait l'une des 20 espèces d'arthropodes présentant les plus larges spectres de résistance (Whalon *et al.* 2008). Du fait de la forte charge parasitaire réalisée par *R. (B.) microplus* et de la mortalité qu'elle induit chez les bovins, y compris en l'absence de toute transmission d'agents pathogènes, les éleveurs peuvent être amenés à utiliser beaucoup plus de produits – autorisés ou non - contre cette espèce que contre d'autres espèces de tiques. Cet usage inadéquat et non contrôlé de produits chimiques peut contribuer à accélérer la sélection de génotypes résistants au sein des populations (Beugnet *et al.* 1994; Baffi *et al.* 2008). Toutefois, on notera que *R. (B.) microplus* se caractérise également par des apparitions récurrentes de mutations conduisant à une résistance et donc sélectionnées par les traitements acaricides (Chevillon *et al.* 2007a). Ces apparitions de mutations se doublent d'événements de duplication de gènes où ces derniers restent fonctionnels (Guerrero *et al.* 2012; Chevillon &

Huber 2016). De plus, les mutations impliquées dans la résistance à ces acaricides chimiques paraissent associées à de très faibles coûts de résistance- c'est-à-dire de pertes de valeur sélective relativement aux génotypes sensibles au sein d'environnement exempt de pesticides (Chevillon *et al.* 2007a). Ainsi, les échecs de traitements ne s'expliquent-ils pas seulement par une gestion inappropriée des molécules acaricides relativement à l'équilibre entre avantage/coût des résistances et structure des populations de tiques (Chevillon *et al.* 1995; Raymond *et al.* 1998) mais également par des caractéristiques propres à l'évolution génomique de *R. (B.) microplus* et/ou des tiques en général.

Des études de génétique des populations de *R. (B.) microplus* collectées en Afrique du sud (Boucher 2013) et en Nouvelle Calédonie (Koffi *et al.* 2006a; Chevillon *et al.* 2007b; De Meeûs *et al.* 2010) ont permis de déterminer les mécanismes populationnels mis en œuvre dans ces régions que *R. (B.) microplus* a colonisé respectivement fin XIX^{ème} ou mi-XX^{ème}. Des différences furent observées entre ces régions. Notamment, une différence importante pour la gestion des résistances acaricides et donc la définition de la distribution géographique optimale des produits acaricides : la définition de l'unité démographique de *R. (B.) microplus* – c'est-à-dire de ce qui délimite une population. Cette définition correspond à l'individu-hôte le long de la frontière orientale du Parc Kruger en Afrique du Sud (Boucher 2013) mais au troupeau en Nouvelle-Calédonie (Chevillon *et al.* 2007b). Cette différence s'explique aisément par les différences de pratiques d'élevage. Dans la zone étudiée en Afrique du sud, une famille n'a pas de terre mais fait paître ses bêtes sur des terres communales et ne détient que quelques têtes de bétail. En Nouvelle-Calédonie, les éleveurs possèdent des troupeaux de plusieurs centaines de têtes qui sont enclos sur les terres de leur exploitation. Qu'en est-il au sein des systèmes traditionnels d'Afrique de l'ouest ? Nous traiterons cette question au sein du **chapitre 4**.

Chapitre 2 : Actualisation des connaissances sur les communautés de tiques en Afrique de l'ouest

II.1 Progression de *R. (B.) microplus*

Ces résultats font partie de l'article n°1 inséré en encart n°1 en page 33

En Afrique de l'ouest, *A. variegatum* constitue l'espèce autochtone de tique associée aux plus grandes pertes économiques. Elle a donc fait l'objet du plus grand nombre d'études qui portaient aussi bien sur sa distribution (Gueye *et al.* 1990; Koney *et al.* 1994; Awa 1997; Kaboré *et al.* 1998; Farougou *et al.* 2006), les agents pathogènes qu'elle transmet (Farougou *et al.* 2007c, 2012; Mbengue *et al.* 2007) que sur la lutte contre la cowdriose dont elle est vectrice (Adakal *et al.* 2004, 2010b; Faburay *et al.* 2004). Cependant l'importance vétérinaire de *A. variegatum* pourrait avoir été reléguée au deuxième rang depuis l'introduction accidentelle et l'installation de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Madder *et al.* 2011, 2012; De Clercq *et al.* 2012).

Fin 2011, suite à des plaintes d'échec de traitement acaricides d'éleveurs du Burkina Faso, du Mali et du Togo, des collectes ponctuelles de tiques ont été réalisées par l'équipe de recherche sur les tiques du Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES, basé à Bobo-Dioulasso, Burkina Faso) et les centres de recherches associés (Mali, Togo). Toutes les tiques ont été convoyées vers le CIRDES où leur identification morphologique a été effectuée selon la clef décrite par Walker *et al.* (2003). J'ai été en charge de réaliser l'identification moléculaire permettant de confirmer les résultats de l'identification morphologique par une PCR-RFLP (Lempereur *et al.* 2010).

Ceci nous a permis de confirmer la présence de la tique invasive dans nos échantillons, ce qui a porté à six (i.e. Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Mali, Nigeria et Togo) le nombre de pays envahis en huit ans. Cette expansion contredit les prédictions antérieures de zones de distribution favorables à cette espèce dans la région (Estrada-Peña *et al.* 2006). Cette expansion, qui s'est notamment effectuée à la faveur des transhumances frontalières, ne laisse pas présager d'une diminution des menaces qui pèsent sur la santé du cheptel ouest-africain si aucune disposition n'est prise. Dans cette partie du continent Africain, les systèmes d'élevages sont en majorité de type pastoral et agropastoral (CEDEAO & CSAO/OCDE 2008; CORAF/WECARD 2010). Aussi en période de sécheresse les éleveurs amènent-ils les troupeaux vers des sites favorables au pâturage, lesquels sites se trouvent parfois à plusieurs centaines de kilomètres au sud des lieux de départ (FAO 2012). Ainsi, la capacité d'adaptation de *R. (B.) microplus* ajoutée aux



systèmes d'élevage d'Afrique de l'ouest (i.e. pastoral et agropastoral) conduisent à une augmentation des risques vétérinaires. La suite de nos travaux aura, entre autres, pour objet de préciser l'importance de cette augmentation et la nature des risques vétérinaires à surveiller.



Encart N°1: Adakal H., Biguezoton A., Zoungrana S., Courtin F., De Clercq E. Madder M. 2013 – Alarming spread of the Asian cattle tick *Rhipicephalus microplus* in West Africa-another three countries are affected: Burkina Faso, Mali and Togo. *Exp Appl Acarol* 61(3): 383-386

Alarming spread of the Asian cattle tick *Rhipicephalus microplus* in West Africa—another three countries are affected: Burkina Faso, Mali and Togo

H. Adakal · A. Biguezoton · S. Zoungrana · F. Courtin ·
E. M. De Clercq · M. Madder

Received: 13 April 2013 / Accepted: 20 May 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is known for its invasive character and fast displacement of other species of the same subgenus. The most striking invasions were the ones observed in Ivory Coast (Madder et al. 2007, 2011) and Benin (Madder et al. 2012; De Clercq et al. 2012). Several years after being introduced through importation of exotic Brazilian cattle, *R. microplus* replaced local blue ticks and most importantly did not respond to the acaricide treatment becoming thus for farmers and veterinary services an uncontrollable ectoparasite affecting animal production in general, apart from being an efficient vector of *Babesia bovis*.

Soon after its discovery in West Africa, several projects were initiated to address the issue. The TickRisk project (assessing ecological suitability for the spread of *R. microplus* in West Africa) (2011–2013) was implemented in Benin to determine the current spread of this species and develop habitat suitability maps of the region while the WECATiC project (assessment of emerging livestock ticks and tickborne disease threats and integrated control strategies in West and Central Africa) (2011–2014) encompasses Benin, Burkina

H. Adakal (✉) · A. Biguezoton · S. Zoungrana · F. Courtin
Centre international de recherche-développement sur l'élevage en zone subhumide (CIRDES),
01 B.P. 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso
e-mail: hassaneadakal@yahoo.fr

F. Courtin
Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR 177 IRD-CIRAD, Montpellier, France

E. M. De Clercq
Georges Lemaître Centre for Earth and Climate Research, Earth and Life Institute, Université
Catholique de Louvain, Place L. Pasteur 3, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

M. Madder
Unit of Veterinary Entomology, Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine,
Nationalestraat 155, 2000 Antwerp, Belgium

M. Madder
Department of Veterinary Tropical Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria,
Private Bag X04, Onderstepoort, Pretoria 0110, South Africa

Faso and Cameroon to study acaricide resistance properties and adapted control strategies against the tick. Both projects share experts both in the steering committee and experts group.

Several training programs of these two projects have facilitated the information flow on the possible occurrence of *R. microplus*. It was then observed that a gradual spread northwards occurred over the last years (2008–2012) with *R. microplus* now being present in the northern departments of Benin. In Burkina Faso, despite two successive phases in 1999 and 2004 of importations of Gir and Girolando cattle (MRA 2003), no *R. microplus* ticks had been recorded throughout the country by 2011. The first complaints of acaricide treatment failures were reported in 2010 and by the end of 2011 heavy tick infestations were recorded in the southwestern part bordering Ivory Coast and Mali. Even after acaricide treatment large tick numbers were still found attached all over the animals' body. Subsequent tick collections one month after the first collection around Kimini confirmed the presence of the tick *R. microplus* in seven more villages (Table 1). Also in Mali and Togo similar observations concerning acaricide failures were made and ticks were collected and transferred to CIRDES for identification, both morphologically, according to the key of Walker et al. (2003), and molecularly, using the PCR–RFLP test developed by Lempereur et al. (2010). Unfortunately, no detailed information is available about the acaricides used in these countries.

The presence of *R. microplus* has now been confirmed in three additional countries in West Africa (Table 1; Fig. 1), illustrating the great ease with which this tick can establish itself and spread to far distant areas in the north in a short time. This rapid spread is most likely a result of transhumance of cattle, as hypothesized by local farmers.

According to recently developed habitat suitability maps (Regassa 2012), the tick has spread to areas previously identified as unsuitable. Studies on acaricide resistance

Table 1 Number of male and female *Rhipicephalus microplus* ticks collected in 2011 in Burkina Faso, Mali and Togo, on an average of two cattle per location

	Village of detection	Latitude	Longitude	Date of collection	Females	Males	Collected by
Burkina Faso	Kimini	10,100000	−4,783330	24/11	nd	nd	CIRDES
	Yendere	10,198680	−5,000260	23/12	16	46	
	Tiemberba	10,165670	−4,936690	23/12	14	41	
	Niangoloko	10,245000	−4,997970	23/12	41	51	
	Farnifasso	10,297310	−5,029650	23/12	40	101	
	Bouko	10,176280	−4,718010	22/12	42	58	
	Nafona	10,176290	−4,717360	22/12	55	114	
	Ouangolodougou	10,065297	−4,809536	22/12	76	119	
Mali	Fakola	10,545930	−6,915261	05/11	1	17	Y. Sanogo, LCV, Bamako
	Manankoro	10,466348	−7,450511	24/11	4	8	
	Fangala	13,600572	−10,066812	23/11	2	7	
Togo	Kolokopé	7,796954	1,291473	22/09	4	19	A. A. Kabissa, ICAT-DG, Lomé

nd number of ticks not determined due to heavy infestation with huge number of ticks collected on cattle

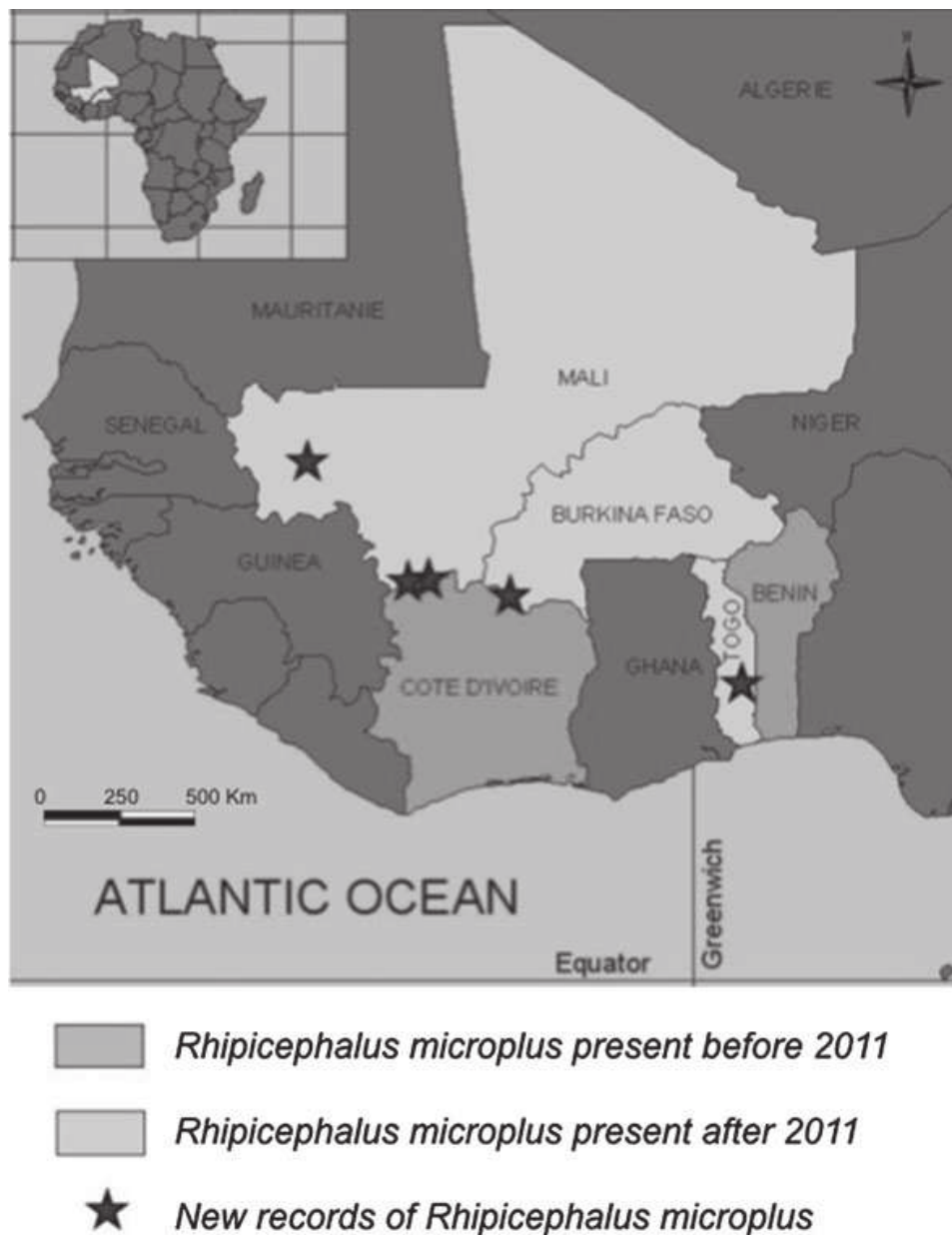


Fig. 1 Distribution of *Rhipicephalus microplus* before and after 2011 in West Africa

diagnosis conducted in Burkina Faso in 2005 and in 2006 in Mali showed no evidence of resistance in field populations of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) ticks (*R. geigy*; at that moment no *R. microplus* was recorded in Mali and Burkina Faso) (Adakal et al. 2012). The situation should now be different given the increase of treatment failures reported by farmers.

Indeed, the threat to livestock industries in this region by the introduction of a tick population resistant to almost all families of available acaricides needs special attention. One of the priorities is to assist farmers and veterinary services in the control of *R. microplus* and to determine the most effective control system. The degree of acaricide resistance to the various products available in the area should be analyzed, as well as animal movements, especially transhumance.

The confirmation of *R. microplus* in Togo was expected, based on the distribution and density in the neighboring country Benin (De Clercq et al. 2012) suggesting the same exposition for all other countries in West Africa. Unfortunately, introduction and further

spread of *R. microplus* in West Africa results from avoidance of elementary veterinary public health. For many decades everything necessary to avoid this disaster easily and completely has been known about. It will only be contained by improved veterinary awareness and public health measures.

Acknowledgments This research was funded by Australian Aid (AusAID). The authors acknowledge the support of their research partners in the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) and in the West and Central African Council for Agricultural Research and Development (CORAF/WECARD).

References

- Adakal H, Stachurski F, Chevillon C (2013) Tick control practices in Burkina Faso and acaricide resistance survey in *Rhipicephalus (Boophilus) geigy* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 59(4):483–491
- De Clercq EM, Vanwambeke SO, Sungirai M, Adehan S, Lokossou R, Madder M (2012) Geographic distribution of the invasive cattle tick *Rhipicephalus microplus*, a country-wide survey in Benin. *Exp Appl Acarol* 58:441–452
- Lempereur L, Geysen D, Madder M (2010) Development and validation of a PCR-RFLP test to identify African *Rhipicephalus (Boophilus)* ticks. *Acta Trop* 114:55–58
- Madder M, Thys E, Geysen D, Baudoux C, Horak I (2007) *Boophilus microplus* ticks found in West Africa. *Exp Appl Acarol* 43:233–234
- Madder M, Thys E, Achi L, Toure A, De Deken R (2011) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a most successful invasive tick species in West-Africa. *Exp Appl Acarol* 53:139–145
- Madder M, Adehan S, De Deken R, Adehan R, Lokossou R (2012) New foci of *Rhipicephalus microplus* in West Africa. *Exp Appl Acarol* 56:385–390
- MRA (2003) Rapport National sur l'état des ressources génétiques animales au Burkina Faso. Ministère des Ressources Animales, Burkina Faso 73 pp
- Regassa SL (2012) Analysis of habitat suitability for *Rhipicephalus (Boophilus)* ticks in Benin. MSc thesis No 168, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium
- TickRisk (2011–2013). Assessing ecological suitability for the spread of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in West Africa. Project funded by the Belgian Science Policy Programs (Belspo, SR/00/144)
- Walker AR, Bouattour A, Camicas J-L, Estrada-Peña A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG, Preston PM (2003) Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Bioscience Reports, Edinburgh

II.2 Abondance et incidence de *R. (B.) microplus* au Bénin et au Burkina Faso

Ces résultats font partie de l'article n° 2 inséré en encart n°2 en page 42

Dans le but de mieux appréhender les risques vétérinaires causés par les tiques du bétail et leur évolution potentielle nous avons entrepris un suivi longitudinal des communautés de tiques du bétail dans quatre régions du Bénin et du Burkina Faso. Ces régions diffèrent notamment par leur historique de colonisation par *R. (B.) microplus*. Il s'agit de deux régions béninoises - la côte où *R. (B.) microplus* fut introduite en 2004 et une région septentrionale colonisée avant 2008 - et de deux régions burkinabè - l'une atteinte par *R. (B.) microplus* fin 2011 et l'autre qui restait indemne de *R. (B.) microplus* jusqu'au démarrage de notre étude en 2012. Les différences climatiques entre ces régions correspondent à une diminution des précipitations au Burkina Faso relativement au Bénin, et du sud au nord dans chacun de ces pays. Au sud-Bénin prévaut un climat guinéen qui se définit par une alternance d'une longue saison de pluies d'avril à juillet, d'une courte saison sèche en août, d'une courte saison de pluies de septembre à novembre et d'une longue saison sèche de décembre à mars. Plus au nord (région#2 dans l'article présenté en encart n°2), les climats soudano-guinéen (nord de la région #2, Gogounou) et sud-soudanien (sud de la région #2, Okpara) sont caractérisés par une alternance d'une saison des pluies de mai à octobre et d'une saison sèche de novembre à avril. Au Sud-Ouest (région #3) et au centre (région #4) du Burkina Faso, la saison des pluies dure de juin à septembre et alterne avec une unique saison sèche (d'octobre à mai).

Notre suivi longitudinal s'est effectué durant 12 mois consécutifs selon le plan d'échantillonnage suivant. Nous avons choisi de deux à quatre troupeaux par région et 12 bovins-sentinelles par troupeau. Chaque mois, nous avons échantillonné toutes les tiques adultes présentes sur une moitié du corps de chaque bovin-sentinel (l'autre flanc étant plaqué au sol). Les relevés mensuels de pluviométrie et de température moyenne complétaient ces données. Les tiques ont été identifiées d'après la clef de Walker et al. (2003). L'analyse des variations d'abondances et de taux d'incidences mensuels s'est faite sous R à l'aide de modèles linéaires généralisés de structure binomiale ou binomiale-négative, respectivement (Cf. **Encart N°2** pour détails).

Sur les 32 148 tiques adultes collectées sur les 144 bovins le long de notre suivi, 22 491 étaient des *R. (B.) microplus*, soit 70% du total de l'échantillonnage. Cette proportion atteint 71% dans la région #1 (sud Bénin), 62% dans la région #2 (nord Bénin), 75% dans la région #3 (sud-ouest



Burkina Faso) mais reste nulle en région #4 (centre Burkina-Faso). Ces fortes proportions rappellent les observations au nord de la Côte d'Ivoire où *R. (B.) microplus* représente ~85% des tiques collectées sur 48 bovins suivis durant trois mois en 2013 (Toure *et al.* 2014).

On note que le pic d'abondance de *R. (B.) microplus* s'observe en général en fin de saison(s) des pluies. Les périodes de pics d'abondance sont variables dans la région #1 mais présentent un pic unique ailleurs ; soit de septembre à décembre en région #2 et de juillet à janvier en région #3 (Cf. **Encart N°2**). Le ratio entre les mesures maximale et minimale d'abondance pour un même site varie entre sites, y compris à l'intérieur d'une même région. Le ratio le plus faible (égal à 2) a été enregistré à Kpinnou au sud-Bénin alors que le plus élevé (égal à 65) a été observé à Kimini au sud-ouest du Burkina Faso. La plus forte mesure d'abondance de *R. (B.) microplus* fut de 98 ± 11 tiques-adultes/animal.mois à Kimini (sud-ouest Burkina Faso, site 3K dans l'article présenté en encart n°2) alors qu'ailleurs les mesures maximales restaient inférieures à 50 tiques/animal.mois dans tous les autres sites. Huit ans après l'introduction de *R. (B.) microplus* au Bénin, on observe une abondance moyenne d'environ 21 tiques-adultes /animal.mois au nord de ce pays.

Le taux d'incidence des tiques adultes *R. (B.) microplus* varie également. Pendant les périodes de faibles abondances, les taux d'incidence le plus faible (9%) et le plus élevés (90%) sont tous deux observés au sud-bénin (site 1A et 1K d'Athiémé et de Kpinnou). Au cours des périodes de fortes abondances, le taux d'incidence varie entre 52% (nord-bénin, site 2G pour Gogounou) et 100% (sud-ouest Burkina Faso, site 3K pour Kimini).

Notre étude révèle que *R. (B.) microplus* reste présente dans la partie septentrionale du Bénin tout au long de l'année. Ceci, tout comme la présence de *R. (B.) microplus* observée au nord du Nigeria le long de sa frontière avec le Cameroun (Opara & Ezech 2011; Musa *et al.* 2014), contredit les prédictions de l'actualisation récente des zones ouest-africaines favorables à l'installation de *R. (B.) microplus* (De Clercq *et al.* 2013). Cette contradiction pourrait résulter du fait que cette prédiction de niche n'a pas pris en compte certains paramètres biotiques tels que les interactions entre espèces de tiques du bétail. Notre analyse des facteurs régulant l'assemblage des espèces de tique du bétail a effectivement mis en évidence que ces interactions interspécifiques sont des paramètres clefs dans la définition locale des taux mensuels d'incidence et des abondances des adultes de toute espèce de tiques, qu'elles soient natives ou invasive.



II.3 Facteurs régulant les assemblages d'espèces de tiques du bétail

Ces résultats font partie de l'article n°2 inséré en encart n°2 en page 42

Outre *R. (B.) microplus*, notre suivi des 144 bovins-sentinelles s'est porté sur six taxons autochtones de tiques du bétail : les espèces *A. variegatum*, *R. (B.) annulatus*, *R. (B.) decoloratus* et *R. (B.) geigyi* ainsi que le genre *Hyalomma* et l'ensemble des espèces trixènes de *Rhipicephalus* (regroupées ici sous le vocable *Rhipicephalus* spp).

Nous avons développé des analyses de beta-diversité pour tester l'hypothèse de variations géographiques des règles d'assemblages d'espèces au sein des communautés de tiques du bétail. Nos résultats révèlent une hétérogénéité spatiale de ces communautés et montrent que ces variations dépendent plus de la géographie d'échantillonnage que des paramètres climatiques suivis localement (i.e. pluviométrie mensuelle et moyenne mensuelle de température ; **Encart N°2**). La partie centrale du Burkina Faso est la région hébergeant les communautés les plus pauvres. *Hyalomma* spp. et *R. (B.) microplus* sont quant à eux les taxons présentant la plus forte hétérogénéité spatiale de distribution.

L'hétérogénéité des dynamiques d'infestation au sein des régions fut suffisante pour prévenir toute tentative de modélisation de l'abondance d'adultes sur un maillage supérieur à la localité, et ce, quel que soit le taxon étudié. Par ailleurs, quel que soit le taxon considéré, l'abondance et le taux mensuel d'incidence d'adultes tendent à systématiquement augmenter en cas de co-infestation de l'individu-hôte par d'autres taxons de tiques (Cf. **Encart N°2** pour détails). Ces résultats suggèrent donc une distribution agrégative des tiques au sein des troupeaux. Autrement dit, pour chaque taxon étudié, certains individus-hôtes seraient beaucoup plus (ou moins) infestés par des tiques-adultes que la moyenne du troupeau. On note enfin un décalage du pic d'abondance des adultes entre, d'une part, les espèces du sous-genre *Boophilus* et, d'autre part, les autres taxons ; ces derniers présentent des pics d'abondances d'adultes plus précoces sur l'ensemble des localités d'études (début versus fin de saison des pluies pour le sous-genre *Boophilus*).

Les études précédant la nôtre reportaient de très fortes proportions de *R. (B.) microplus* au sein du sous-genre *Boophilus* au Bénin et en Côte d'Ivoire ; ce qui fut interprété comme un indice de remplacement des espèces natives de ce sous-genre par l'espèce-sœur invasive (Madder *et al.* 2011, 2012; De Clercq *et al.* 2012; Toure *et al.* 2014). Nous avons testé cette hypothèse en comparant nos données d'abondance à celles de travaux antérieurs à l'arrivée de *R. (B.)*



microplus qui furent menées dans les mêmes zones et selon le même protocole d'échantillonnage (Kaboré *et al.* 1998; Farougou *et al.* 2006, 2007b). Ceci nous a permis d'infirmer l'hypothèse de remplacement d'espèces. En effet, la comparaison des moyennes sur l'année du nombre moyen de tiques adultes par animal et par mois n'indique aucune diminution d'abondance en présence de *R. (B.) microplus* dans notre étude relativement aux précédentes : ces moyennes augmentent plutôt pour la plupart des espèces dans les sites où la tique invasive se retrouve (**Encart N°2**). Mais au centre du Burkina Faso [une région que n'a pas (encore ?) atteint la tique invasive] on observe une diminution du nombre d'adultes *A. variegatum* et *Hyalomma* spp/animal-hôte qui passent respectivement de 7.5 et 7.2 à 0.7 et 1.2 adulte/animal-hôte (**Encart N°2**). Somme toute, contrairement aux hypothèses émises dans les études précédentes (Madder *et al.* 2011, 2012; De Clercq *et al.* 2012; Toure *et al.* 2014), l'installation de *R. (B.) microplus* dans la sous-région vient ajouter de nouvelles menaces pour la santé du bétail à celles définies par les espèces de tiques natives sans diminuer en rien les menaces associées aux tiques natives.

Enfin, notre analyse de l'impact des patrons de co-infestation des individu-hôtes sur le succès de chaque taxon à s'implanter sur ses sites d'attachement de prédilection a apporté des résultats inattendus. *R. (B.) microplus* s'avère ainsi le seul des taxons suivis qui voit cette probabilité de succès diminuer lorsque son hôte est co-infecté par d'autre(s) taxon(s) (cf **Encart N°2** pour détails). Sous l'hypothèse que le succès de chaque taxon de s'attacher à ses sites de prédilection sur le corps de l'individu-hôte soit un bon indicateur de sa valeur sélective ('*fitness*' en anglais), ces résultats indiqueraient que cette espèce invasive souffre au stade adulte plus de la compétition définie par les adultes taxons autochtones que ces derniers de la compétition exercée par les adultes *R. (B.) microplus*.

Encart N°2: Biguezoton A., Adehan S., Adakal H., Zoungrana S., Farougou S., Chevillon C. 2016. Community structure, seasonal variations and interactions between native and invasive cattle tick species in Benin and Burkina Faso. *Parasites & Vectors*. 9 (43).

RESEARCH

Open Access



Community structure, seasonal variations and interactions between native and invasive cattle tick species in Benin and Burkina Faso

Abel Biguezoton^{1,2,3*}, Safiou Adehan¹, Hassane Adakal^{2,4}, Sébastien Zoungrana², Souaïbou Farougou¹ and Christine Chevillon^{3,5}

Abstract

Background: The variation of tick abundance on ruminants had received little attention in West Africa before *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* started to invade this region in the early 2000s. Ten years later, *R. microplus* was suspected to have replaced the native ticks. In addition to testing this hypothesis, this study investigated the interactions between native and invasive ticks and the relative role of climatic and geographical variables in the variations of tick community composition (beta diversity) on cattle herds.

Methods: A one-year-long survey was performed in Benin and Burkina Faso during which adult ticks were collected from 144 steers from 12 localities in four different areas once a month. Morphological features were used to assign the collected ticks to different species (*A. variegatum*, *R. annulatus*, *R. decoloratus*, *R. microplus* and *R. geigyi*). Beta diversity analyses and generalized linear models allowed characterizing the geographical variations in species assemblage and the effect of co-infestation patterns on the seasonal variations in the abundance and incidence rates of each taxon.

Results: About 68 % (22,491/32,148) of all the adult ticks collected in one year were *R. microplus*. The most heterogeneously distributed taxa were *Hyalomma spp* and *R. microplus* and the lowest specific diversity was found in Central Burkina Faso. Although climatic variables did not provide any additional information on the variation in species assemblages compared with the sampling geography, adult tick abundance tended to peak during the late (*Boophilus* subgenus) or early (other taxa) rainy season. In most taxon-per-locality analyses, the abundance and incidence rate of a given tick taxon significantly increased when the host was co-infested by other taxa. The comparison with previous estimates (when possible) did not support the hypothesis that *R. microplus* invasion led to a decrease in native tick species abundance.

Conclusions: The co-infestation patterns among native and invasive tick species are key factors for the determination of the community structure and the infestation dynamics of each tick taxon in West African cattle.

Keywords: Ixodidae, Biological invasion, Cattle health, *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus microplus*, Community structure

* Correspondence: abels005@yahoo.fr

¹Unité de Recherche en Biotechnologie de la Production et de la Santé Animales (URBPISA), Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Bénin

²Unité de Recherche sur les bases biologiques de la Lutte Intégrée (URBIO), Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), 559, 3-51 Avenue du Gouverneur Louveau, 01 B.P. 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Biguezoton et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

In Benin and Burkina Faso, livestock production represents the second contribution after crops to the gross domestic product, without leading to self-sufficiency in animal protein production [1, 2]. In both countries, semi-intensive farming systems and the use of exotic breeds remain exceptional and 95 % of the livestock industry relies on extensive and low-input systems. In Benin, half of the livestock production is concentrated in the north-east where herd rotation among communal pastures, post-harvested crops, savannahs and woodlands optimizes the use of the rare grazing resources [3, 4]. In Burkina Faso, extensive and low-input systems include the transhumant system where part or whole cattle herds move to the south in the dry season and come back to the north in mid-May when the rainy season starts [5]. Traditional farming systems in Burkina Faso also include sedentary systems where cattle, sheep and goats forage together on communal pastures. In such low-input systems, herders cannot afford expensive tick control strategies [6]. As a result, ticks and tick-borne pathogens hamper the development of livestock production in these areas.

The variations in tick biodiversity and abundance on domestic ruminants have been poorly studied in West Africa, with the exception of few surveys performed in Benin or Burkina Faso [7–11]. These studies showed that *Amblyomma variegatum*, a three-host tick that infests cattle and small ruminants, was the native species responsible for the highest economic costs. This species impairs animal growth [12], decreases milk yield [13, 14] and is the vector of *Ehrlichia ruminantium*, a virulent pathogen for sheep and goats that was detected in 10 % of *A. variegatum* adults in several Beninese regions [11]. Three native species of the *Boophilus* subgenus (*R. annulatus*, *R. decoloratus* and *R. geigy*) transmit *Babesia bigemina* (the agent of African redwater) and *Anaplasma marginale* in this region [15, 16]. Seven other native species, of little veterinary health concern, were also recorded in these studies: three *Hyalomma* species (*H. impressum*, *H. marginatum rufipes* and *H. truncatum*) and four other *Rhipicephalus* species (*R. muhsamae*, *R. sanguineus*, *R. senegalensis* and *R. sulcatus*) [7–9]. These surveys also highlighted geographical variations in the predominant species: *A. variegatum* and *H. marginatum rufipes* were the only species found on cattle in Central Burkina Faso [7], while *A. variegatum* and *R. geigy* represented between 70 and 99 % of the ticks infesting cattle in North Benin [8, 9].

To the best of our knowledge, it is not known whether and how co-infestation patterns influence the abundance of each native tick species. Moreover, the recent invasion of West Africa by the Asian cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* could have modified these tick

communities and consequently also the threats to the health of domestic ruminants. *R. microplus* is associated with the highest economic losses where it occurs because of its direct deleterious effects on cattle health and its vector competence for *Babesia bigemina*, *B. bovis* and *A. marginale* [17]. *R. microplus* was introduced in Ivory Coast [18, 19] and Benin [20] in the early 2000s and within a decade it has spread to Togo, Mali, Burkina Faso and along the north-eastern border between Nigeria and Cameroon [21–25]. A nationwide survey performed in Benin found that *R. microplus* was the predominant *Boophilus* species in the southern half of the country in late 2011 [25]. As a consequence, this invasive species was suspected to have outcompeted and replaced its native competitors [19, 25], as it did in South Africa (see [26, 27]). This hypothesis remains nevertheless to be tested. Indeed, as the data from the Beninese survey were expressed in percentages of invasive and native species among the collected ticks, it was not possible to determine whether *R. microplus* invasion has actually decreased the native competitor burden [25]. This was carried out to update the information on tick infestation in domestic ruminants in Benin and Burkina Faso, West Africa, as well as to compare the current abundances of native ticks with those observed before the arrival of *R. microplus*. In addition, the effect of geographical changes on species abundance and tick species assemblages was investigated. To this end, the variations in the composition of tick communities (beta diversity), the contribution of each species and/or each site to the beta diversity and the relative contribution of geographical and climatic variables (mean monthly rainfall and temperature) to the spatio-temporal variations in beta diversity were quantified.

Methods

Sampling areas

Four areas with different climate were considered (Fig. 1). South Benin has a Guinean climate characterized by a long rainy season from April to July, a short dry season in August, a short rainy season between September and November and a long dry season from December to March. North Benin included two sites where a rainy season (May to October) is followed by a dry season (November to April). Overall, the amount of annual rainfall is 1400 mm in South Benin and 1300 mm in North. In South-West Burkina Faso and Central Burkina Faso the rainy season lasts from June to September and the dry season from October to May. Overall, the amount of maximum rainfall is higher in North Benin (i.e., 1300 mm) than in Burkina Faso (1200 mm) and the most arid area is Central Burkina Faso. These four areas also represent different steps in *R. microplus* invasion of West Africa. The state farm Kpinnou in South Benin

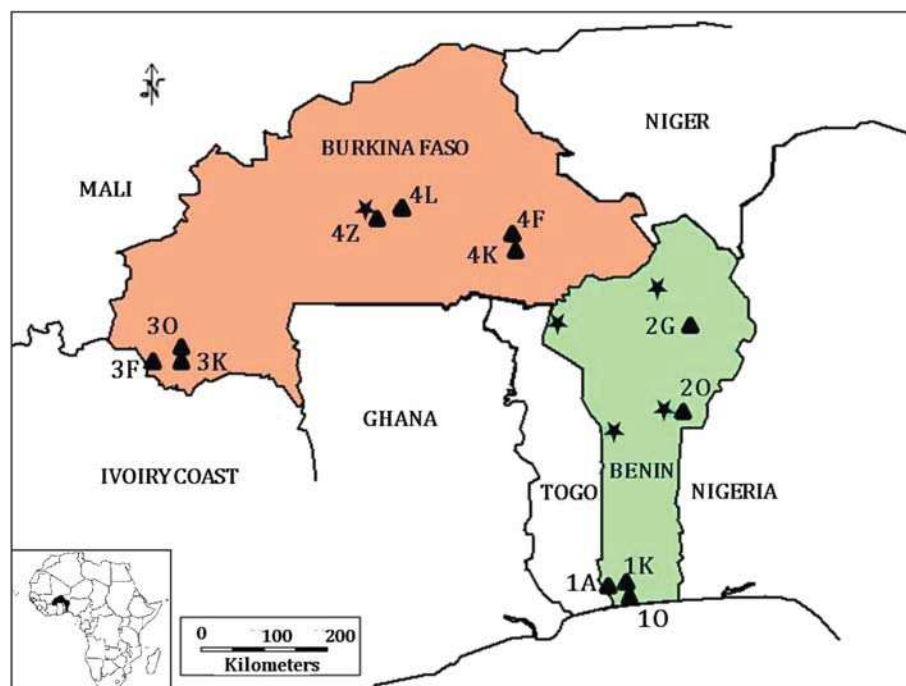


Fig. 1 Sampling geography. Sampling sites are represented by triangles and identified by the number of the area followed by the first letter of the locality name. Thus, in area #1 (South Benin), ticks were collected in Athiémé (1A; N 6.5864; E 1.6653), Kpinnou (1 K; N 6.5681; E 1.781) and Ouidah (1O; N 6.3336; E 2.0064). In North Benin (area #2), sampling sites were in Okpara (2O; N 9.305; E 2.7314) and Gogounou (2G; N 10.7383; E 2.9233). In South-West Burkina Faso (area #3), samples were collected in Farnifaso (3 F; N 10.07338; W 4.94975), Kimini (3 K; N 10.07162; W 4.808) and Ouangolodougou (3O; N 10.0858; W 4.77828). In Central Burkina Faso (area #4), sample collection took place in Fada N'gourma (4 F; N 12.05; E 0.35), Kikideni (4 K; N 11.9167; E 0.3833), Loumbila (4 L; N 12.5167; W 1.35) and Zagtoulou (4Z; N 12.3167; W 1.6333). Stars indicate the localities where tick abundance on cattle was studied before the arrival of *R. microplus* (one locality from area #4 in 1996 [7]; two localities in the east of area #2 between 2003 and 2004 [9] and two localities in the west of area #2 between 2004 and 2005 [8])

(site 1 K, Fig. 1) was the place where the invasive tick was introduced in 2004 [20]. *R. microplus* reached North Benin by 2008 [19, 20] and South-West Burkina Faso in late 2011 [24]. *R. microplus* has never been observed in Central Burkina Faso before the beginning of this study. Two to four herds were monitored in each of these four areas. Hereafter, each sampling site is designated by a number that identifies the geographical area (South Benin: area #1; North Benin: area #2; South-West Burkina Faso: area #3; Central Burkina Faso: area #4) followed by the initial of the site name (e.g., site 1 K corresponds to Kpinnou in South Benin) (Fig. 1).

Tick sampling

Twelve sentinel steers were randomly chosen within each monitored herd. Sampling started in February 2012 in areas #1 and #2, in April 2012 in area #3 and in May 2012 in area #4. At each of the monthly tick collection events, each sentinel steer was kept with one flank on the ground for 15 min to allow the collection of all the ticks attached on the other half of the body. Ticks were stored in 70 % ethanol. Sampling date, host ID number and attachment site on the host (i.e., head, legs, flank,

perineum or tail) were recorded as well as information on the mean monthly rainfall and temperature obtained from ASECNA (Benin) and the “Direction Générale de la Météorologie” (Burkina Faso).

Tick identification

Although immature ticks were also collected, the analysis focused only on the adult stage to minimize the risks of counting errors [28] and of misidentification within the *Boophilus* sub-genus [16]. Tick identification was performed in two steps: i) identification of *Amblyomma variegatum* ticks and discrimination between the *Hyalomma* genus (hereafter referred to as *Hyalomma spp*), the *Boophilus* subgenus (*Boophilus spp*) and the other *Rhipicephalus* species (*Rhipicephalus spp*), using a stereoscopic microscope at x60 magnification; ii) discrimination of the four *Boophilus* species (i.e., the invasive *R. microplus* species and the three native species *R. annulatus*, *R. decoloratus* and *R. geigy*) at x100 magnification for more precision, since *Boophilus* species are morphologically very similar. The differentiation criteria were classically based on the number of teeth rows on the hypostome, the form of the male ventral plates as

well as the presence (absence) of setae on the internal protuberance of the first segment of palps, of external spur on coxa II and III and of a caudal appendage [16].

Analysis of the tick community structure and its spatio-temporal variations

The species $\times$ locality matrix was computed after Hellinger transformation of the abundance data [29] to estimate the beta diversity (BD), as described in [30]. Such estimate varies between 0 (no geographical variation in species assemblage) and 1 (each surveyed locality hosts a distinct species assemblage). BD was then partitioned into Local Contributions to Beta Diversity (LCBD) or Species Contributions to Beta Diversity (SCBD) [30]. Null LCBD estimates define the null hypothesis of a random distribution of species among localities (i.e., a state where the community occupying any given locality is formed independently from the species assemblages encountered elsewhere) [30]. Significant LCBD deviations from zero were tested by performing 999 random permutations ($n_{\text{perm}} = 999$) of the matrix columns [30]. The largest SCBD estimates are associated with the most heterogeneously distributed taxa, and sites where communities are dominated by species associated with large SCBD estimates tend to display significantly non-null LCBD [30]. The spatio-temporal variations in the community structure and the relative contribution of climatic variables and sampling sites to LCBD variations were investigated as previously described [31]. The correlations between species richness and LCBD estimates were computed to accurately interpret non-null LCBD estimates. A negative correlation is expected when significantly non-null estimates indicate species-poor sampling events [31].

Tick abundance dynamics

The temporal variations in the abundance of each taxon were analyzed using generalized linear models with a negative binomial structure (i.e., using the `glm.nb` function from the MASS package in R; <http://cran.r-project.org/web/packages/MASS/index.html>). In model comparisons, preference was given to models that minimized the Akaike information criterion (AIC), while maximizing the percentage of explained variance. The first step of simplification focused on the seasonal variations in abundance: the months associated with not significantly different ($P > 0.05$) estimates were merged into the same level of the 'seasonal' factor s_x [32]. The second step tested whether the tick co-infection pattern interacted with s_x to determine the abundance dynamics of a given taxon X. H , A , R , Rm , Ra , Rd and Rg were defined as categorical variables with a value of 1 or 0 to describe the presence or absence of *Hyalomma spp*, *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus spp*, *R. microplus*, *R. annulatus*, *R. decoloratus* and *R.*

geigy, respectively. In R language, $H^*A^*R^*Rm^*Ra^*Rd^*Rg$ included all additive and interactive effects among these explanatory variables. For simplicity, $\Pi_{\text{all-but-x}}$ defined the term $H^*A^*R^*Rm^*Ra^*Rd^*Rg$ from which the contribution of the taxon X was removed. In R language, the maximal model to explain the abundance variations of taxon X was $s_x * \Pi_{\text{all-but-x}}$. Model simplification was achieved by removing the terms without significant effect ($P > 0.05$) on the analyzed abundance.

Variations in the tick incidence rates

The mean values of the H , A , R , Rm , Ra , Rd and Rg variables defined above correspond to the incidence rates per steer and per month of *Hyalomma spp*, *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus spp*, *R. microplus*, *R. annulatus*, *R. decoloratus* and *R. geigy*, respectively [32]. Their variations among sites (factor SITE), seasons (factor s_x) and/or hosts with different co-infestation patterns ($\Pi_{\text{all-but-x}}$) were analyzed using generalized linear models with a binomial structure [33]. The maximal model was $\sim \text{SITE} * s_x + \Pi_{\text{all-but-x}}$. Model simplification was achieved by removing the terms with no significant effect ($P > 0.05$). The possibility of over dispersion (and thus the necessity to perform a new analysis using a quasibinomial model structure) was checked *a posteriori* by computing the ratio of residual deviance onto the residual freedom degrees [31].

Analysis of tick attachment sites on the host body

Cattle tick species have evolved preferences concerning their attachment sites on the host body: *Rhipicephalus spp* prefers attaching on the head and legs, while *A. variegatum*, *Hyalomma spp* and *Boophilus* ticks favor attachments on trunk and perineum [8, 9, 16]. To investigate the relationships between co-infestation patterns and the distribution of a given tick taxon on the host body, $R \times C$ contingency tables were defined in which the C columns describe the distribution of a given tick species across the host body parts ($C = 2$, when considering the 'preferred' vs 'not preferred' body part categories; $C = 5$, when considering head, legs, flank, perineum and tail as different categories) and the R rows ($R = 2$) the presence/absence of a co-infesting tick species. Then, the independence between rows and columns was tested using the Fisher's exact test. Finally, the possibility of a global tendency was tested by combining the obtained P -values for a given pair of tick species across sites. Given the low number of P -values to combine, the Stouffer's combination method was preferred [32, 34], using the R process developed by Burns [35].

Ethics statement

Herders received full information on the study objectives and procedures before signing a written informed

consent. Sampling was systematically coupled with veterinary inspection of the herd; in the case of infection, animals received free treatment. All study procedures were reviewed and approved by the CSIRO Social Science Human Research Committee under approval number Ref 038/12.

Results

Predominance of the invasive *R. microplus* species

Overall, 144 animals were monitored monthly for one year and 32,148 adult ticks were collected. They all could be identified (genus, subgenus or species), but for 120 specimens (0.37 %). Ticks belonging to the *Amblyomma variegatum* species ($n = 2,806$; 8.76 %), the *Hyalomma* species ($n = 2,458$; 7.67 %) and the *Rhipicephalus* genus, excluding the *Boophilus* subgenus, ($n = 2,436$; 7.60 %) showed a comparable abundance. Ticks belonging to the *Boophilus* subgenus ($n = 24,328$) represented 76 % of the whole collection. Even when taking into account the 842 *Boophilus* ticks that could not be assigned to a species, this subgenus was predominantly represented by the invasive species. Indeed, 22,491 of these ticks were identified as *R. microplus*, 510 as *R. annulatus*, 308 as *R. decoloratus* and 177 as *R. geigyi*.

Geographical variation in tick assemblages

The overall BD estimate was 0.37. It decreased to ~0.20 and ~0.05, when the data from the four different areas were used separately (Table 1). Area #4 was the only area associated with a significantly non-null LCBD estimate ($P = 0.013$; LCBD ~0.68 versus < 0.20 for the other areas). Considering the within-area BD distribution, a

significant non-null LCBD estimate was found only at site 4 L ($P = 0.037$, LCBD ~0.64 versus < 0.20 for the other sites). The correlations between species richness and LCBD were significantly negative for the whole dataset ($r = -0.57$, $P < 10^{-6}$), area #2 ($r = -0.44$, $P = 0.03$) and area #4 ($r = -0.35$, $P = 0.01$).

Overall, *R. microplus* (SCBD = 0.49) and *Hyalomma spp* (SCBD = 0.38) showed the highest distribution heterogeneity, while the other taxa were more homogeneously distributed (SCBD < 0.04, Table 1). In area #1, *Rhipicephalus spp* and *A. variegatum* (SCBD = 0.40 and 0.37) were the most heterogeneously distributed ticks, followed by *R. microplus* (SCBD = 0.19). In area #2, *R. microplus* and *A. variegatum* (SCBD = 0.38 and 0.32, respectively) showed the highest distribution heterogeneity, followed by *Hyalomma spp* (SCBD = 0.16). In area #3, *Rhipicephalus spp* (SCBD = 0.35), *R. microplus* and *Hyalomma spp* (SCBD = 0.23 and 0.22, respectively) were the most heterogeneously distributed taxa. Area #4 was characterized by high heterogeneity in *A. variegatum* distribution (SCBD = 0.66) and the absence of three taxa (*Rhipicephalus spp*, *R. annulatus* and *R. microplus*).

Tick assemblage dynamics

Within-area LCBD dynamics are detailed in Fig. 2. In area #1, the only significant increase in LCBD was observed at site 1O in September 2012. This sampling event was characterized by a one-off over-representation of *A. variegatum* ticks (48 % of all adults ticks collected in September 2012 compared to 5 % on average in this area). In area #2, significantly higher LCBD values were

Table 1 Beta diversity

Parameter		Overall	Sampling areas			
			Area 1	Area 2	Area 3	Area 4
BD		0.37	0.18	0.21	0.053	0.042
SCBD	<i>H. spp</i>	0.38	0.0072	0.16	0.21	0.032
	<i>A. variegatum</i>	0.0068	0.37	0.32	0.19	0.66
	<i>R. spp</i>	0.060	0.40	0.010	0.35	NA
	<i>R. annulatus</i>	0.036	0.011	0.059	0.0045	NA
	<i>R. decoloratus</i>	0.018	0.024	0.049	NA	0.25
	<i>R. microplus</i>	0.491	0.19	0.38	0.23	NA
	<i>R. geigyi</i>	0.0031	0.00081	0.016	0.0057	0.061
LCBD		Area 1: 0.17	1A: 0.37	2G: 0.50	3 F: 0.21	4 F: 0.14
		Area 2: 0.08	1 K: 0.43	2 K: 0.50	3 K: 0.61	4 K: 0.03
		Area 3: 0.07	1O: 0.19		3O: 0.19	4 L: 0.65*
		Area 4: 0.68*				4Z: 0.18
Correlation (P -value)		-0.57* ($<10^{-6}$)	-0.03 (0.85)	-0.44* (0.03)	-0.09 (0.58)	-0.35* (0.01)

BD, SCBD and LCBD refer to beta diversity, species-contribution to the beta diversity and local-contribution to the beta diversity. 'NA' indicates areas where the taxon was absent. The correlation between species richness and LCBD was assessed using the Pearson's correlation coefficient. Asterisks(*) and bold characters indicate significant ($P < 0.05$) positive correlations

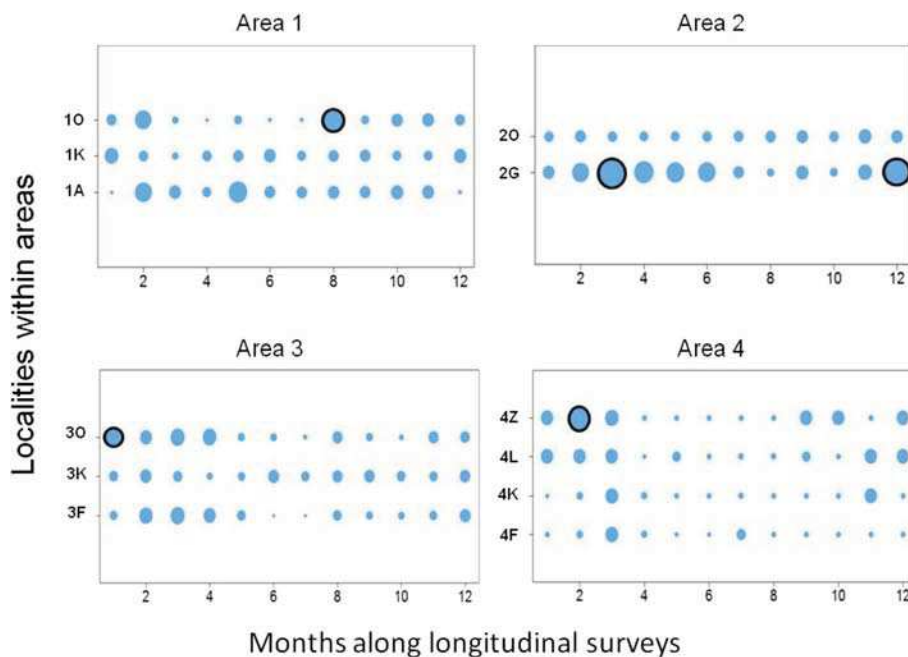


Fig. 2 Spatio-temporal LCBD dynamics. The circle size is proportional to the LCBD value. Black rims indicate a significant deviation from the homogeneous distribution (5 % risk; $P < 0.05$). The first sampling month was February 2012 in areas #1 and #2, April 2012 in area #3 and May 2012 in area #4

recorded twice at site 2G. Both were associated with over-representation of one taxon. Specifically, *Hyalomma spp* represented 74 % of all ticks collected in April 2012 (versus 13 % on average in this area) and *R. decoloratus* represented 58 % of all ticks collected in January 2013 (versus 8 % on average). In area #3, a significant LCBD increase was recorded in April 2012 at site 3O. This sampling event was different from the others at site 3O because: (i) *R. microplus*, which was otherwise the most common species in area #3 (75 % of all ticks collected in this area), was absent and (ii) *Hyalomma spp* ticks represented up to 85 % of all sampled ticks (versus 10 % on average). The LCBD values in area #4 were smaller than those recorded in the other areas (Fig. 2). Nevertheless, a significant LCBD increase was observed at site 4Z in June 2012, when *A. variegatum* represented 100 % of all collected ticks (versus 16 % on average).

Variations in the mean rainfall and temperature explained only 3 % of LCBD variations ($R^2_{\text{adj-climate}} = 0.03$), while the sampling geography explained 54 % of LCBD variations ($R^2_{\text{adj-sites}} = 0.54$, $R^2_{\text{adj-climate \& sites joined}} = 0.54$).

Seasonal tick abundance patterns

Models failed to converge, and thus to provide seasonal patterns, when all sites of a given area were considered together. Conversely, model convergence, and thus patterns of seasonal variation in abundance, was usually obtained when each site was considered individually. Generally, the abundance of adult ticks of a given

species at a given site could be described by a null estimate or at most by three non-null estimate levels (high, medium or low abundance) (Fig. 3 and Table 2). The exception to this rule occurred when a taxon was sporadically present at a site. Such sporadic distribution characterized the three native species of the *Boophilus* subgenus at most sites, but for area #2. Similarly, *Hyalomma spp* was also sporadically present in the most southern sites (Fig. 3).

Analysis of the abundance patterns of *Rhipicephalus spp* and *R. microplus* showed that they were absent in area #4, whereas they were collected in the other three areas all year round (Fig. 3). *Rhipicephalus spp* showed either one long abundance peak or two-three short peaks between March and August (Fig. 3), with the highest abundance level estimates in area #1 (site 1A: 18 ± 0.9 ticks/steer per month) (Table 2). *R. microplus* abundance showed several uncoordinated peaks in the herds from area #1, but peaked once per year in the other areas where it was observed (from September to December in area #2, and from July to January in area #3, Fig. 3). Its monthly abundance reached 98 ± 11 ticks/steer at site 3 K, but remained below 50 ticks/steer elsewhere (Table 2).

Hyalomma spp abundance peaked twice during the year (from February to June and from August to December), with adults collected all year around except in two of the four sites of area #4 (4 L and 4Z). During the high abundance season, abundance estimates were highest in

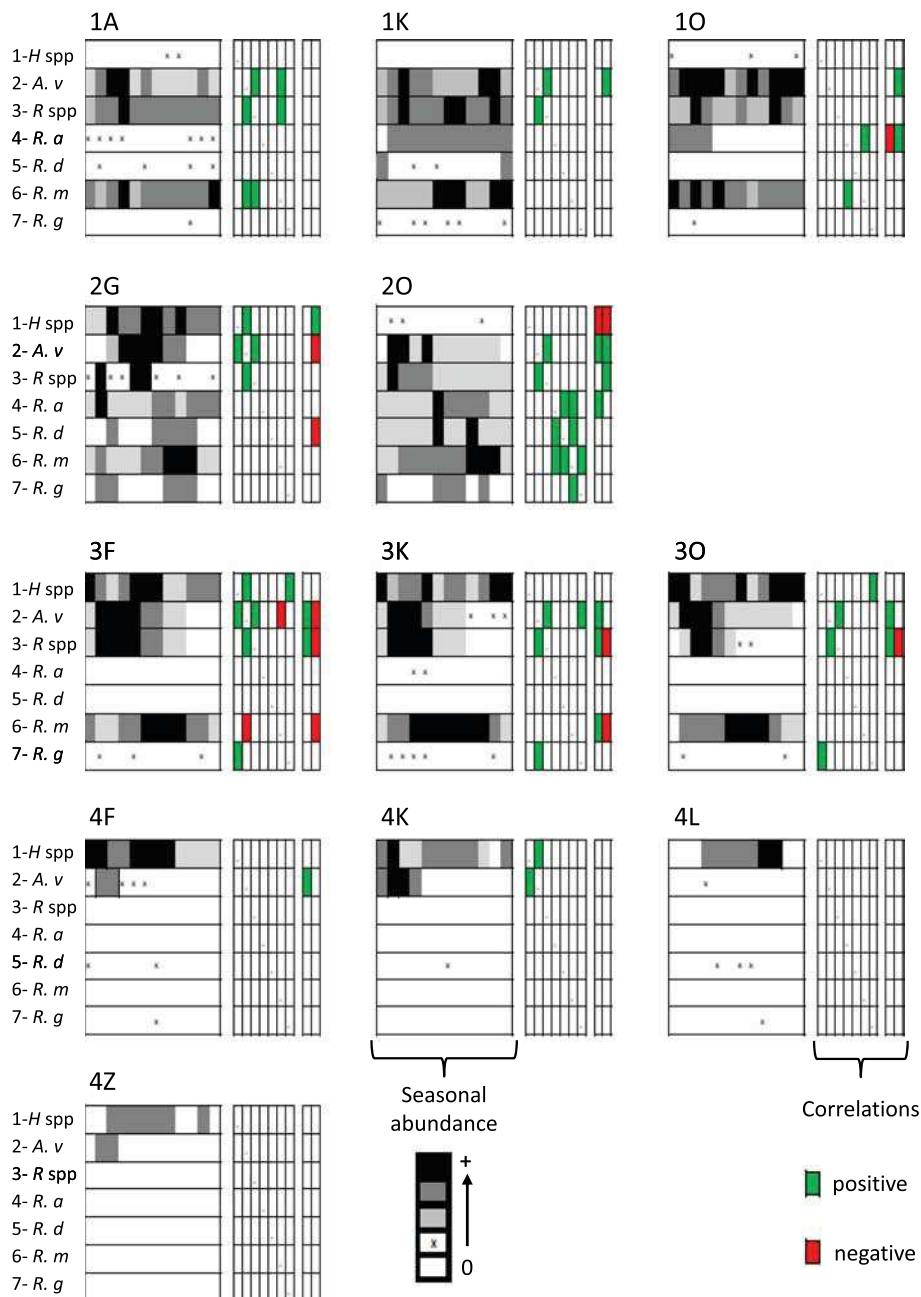


Fig. 3 Seasonal variations in abundance. Three panels are shown for each monitored herd/site with the tick taxa listed as follows: *Hyalomma* spp (*H. spp*), *A. variegatum* (*A. v*), *Rhipicephalus* spp (*R. spp*), *R. annulatus* (*R. a*), *R. decoloratus* (*R. d*), *R. microplus* (*R. m*) and *R. geygi* (*R. g*). The first panel illustrates the variation in abundance during the 12 months of the survey (one rectangle for each month; the first sampling month being February 2012 in areas #1 and #2, April 2012 in area #3 and May 2012 in area #4), color-coded as follows: white, absence (empty rectangle) or sporadic (rectangle with an "x") distribution; light grey, low abundance; dark grey, medium abundance; and black, high abundance of the taxon (see Table 2). The second panel refers to the correlations computed between each possible pair of tick taxa (same ranking order of the taxa). The third panel shows the correlation between the temporal distribution of a taxon and the monthly rainfall (first column) or the monthly temperature (second column). Significant correlations are in green (positive) or in red (negative)

area #3 (site 3 F: 7.7 ± 1.0 ticks/steer per month) and lowest in area #4 (site 4 K: 4.3 ± 1.5 ticks/steer per month) (Table 2).

A. variegatum adults were generally collected everywhere and all year round. Its abundance tended to peak once in the most arid sites and twice in area #1 (Fig. 3),

Table 2 Seasonal abundance estimates (number of ticks per host and per month)

Site	Taxon	Seasonal abundance estimates		
		High	Medium	Low
1A	<i>A. variegatum</i>	9.3 ± 1.9	2.6 ± 0.6	0.8 ± 0.2
	<i>Rhipicephalus spp</i>	18 ± 1.0	6.2 ± 1.0	0.6 ± 0.4
	<i>R. microplus</i>	16 ± 4.0	4.8 ± 0.7	0.5 ± 0.2
1 K	<i>A. variegatum</i>	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.04 ± 0.02
	<i>Rhipicephalus spp</i>	2.3 ± 0.4	0.7 ± 0.2	0.08 ± 0.08
	<i>R. annulatus</i>		0.9 ± 0.2	
	<i>R. decoloratus</i>		0.8 ± 0.1	
	<i>R. microplus</i>	30 ± 5.5		18 ± 3.7
1O	<i>A. variegatum</i>	4.0 ± 0.4	2.5 ± 0.6	0.3 ± 0.3
	<i>Rhipicephalus spp</i>		1.4 ± 0.4	0.2 ± 0.07
	<i>R. annulatus</i>		3.3 ± 0.2	
	<i>R. microplus</i>	15 ± 1.34	8 ± 1.0	1.5 ± 0.7
2G	<i>Hyalomma spp</i>	2.9 ± 0.5	0.3 ± 0.2	0.07 ± 0.2
	<i>A. variegatum</i>	8.3 ± 1.3	2.7 ± 0.5	0.5 ± 0.1
	<i>Rhipicephalus spp</i>		2.6 ± 0.4	
	<i>R. annulatus</i>	6.2 ± 3.9	2.8 ± 0.5	0.2 ± 0.1
	<i>R. decoloratus</i>		1.9 ± 0.6	
	<i>R. microplus</i>	9.2 ± 1.8	2.5 ± 1.0	0.4 ± 0.2
2O	<i>R. geigy</i>			1.0 ± 0.4
	<i>A. variegatum</i>	1.5 ± 0.2		0.3 ± 0.1
	<i>Rhipicephalus spp</i>	5.5 ± 1.0	1.2 ± 0.3	0.2 ± 0.1
	<i>R. annulatus</i>	3.2 ± 1.6	1.3 ± 0.4	0.3 ± 0.1
	<i>R. decoloratus</i>	2.3 ± 0.9		0.10 ± 0.05
	<i>R. microplus</i>	39 ± 5.5	20 ± 2.5	4.9 ± 1.1
3 F	<i>R. geigy</i>		0.5 ± 0.1	
	<i>Hyalomma spp</i>	7.7 ± 1.0	4.6 ± 0.7	2.3 ± 0.8
	<i>A. variegatum</i>	10 ± 2.0	2.8 ± 0.7	0.5 ± 0.1
	<i>Rhipicephalus spp</i>	7.2 ± 1.2	0.9 ± 0.3	0.06 ± 0.02
	<i>R. microplus</i>	34 ± 4.7	5.4 ± 0.8	1.2 ± 0.3
3 K	<i>Hyalomma spp</i>	6.8 ± 0.8	3.0 ± 0.5	1.0 ± 0.2
	<i>A. variegatum</i>	8.5 ± 1.4		0.5 ± 0.2
	<i>Rhipicephalus spp</i>	4.2 ± 0.7		0.2 ± 0.03
	<i>R. microplus</i>	98 ± 11	7.3 ± 1.2	1.5 ± 0.5
3O	<i>Hyalomma spp</i>	3.5 ± 0.5	1.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1
	<i>A. variegatum</i>	6.3 ± 1.3	1.0 ± 0.4	0.3 ± 0.1
	<i>Rhipicephalus spp</i>	15 ± 1.7	2.3 ± 0.6	1.2 ± 0.1
	<i>R. microplus</i>	23 ± 4.2	4.4 ± 0.8	1.1 ± 0.2
4 F	<i>Hyalomma spp</i>	3.0 ± 0.5	1.9 ± 0.4	0.7 ± 0.2
	<i>A. variegatum</i>		3.0 ± 0.6	
4 K	<i>Hyalomma spp</i>	4.3 ± 1.5	1.5 ± 0.3	0.2 ± 0.1
	<i>A. variegatum</i>	1.1 ± 0.4		0.1 ± 0.1

Table 2 Seasonal abundance estimates (number of ticks per host and per month) (Continued)

4 L	<i>Hyalomma spp</i>	1.5 ± 0.3	0.3 ± 0.1
4Z	<i>Hyalomma spp</i>		0.4 ± 0.1
	<i>A. variegatum</i>		0.1 ± 0.1

with the highest estimates in area #3 (site 3 F: 10.1 ± 2.0 ticks/steer per month) (Table 2).

Congruence in the seasonal variation patterns was observed between *A. variegatum* and *Rhipicephalus spp* and their burdens were significantly and positively correlated at seven of the eight sites where they were both present (Fig. 3; combined *P*-value across herds: *P* = 8. 10⁻³⁶). For these two species, abundance peaks were observed at the beginning of the rainy season (i.e., in April-May in area #1, May-June in area #2 and March-April in area #3) and their abundance dynamics were positively correlated with the rainfall variations (Fig. 3; *A. variegatum*: five significantly positive correlations; combined *P*-values across herds: *P* = 5. 10⁻¹¹; *Rhipicephalus spp*: three significantly positive correlations; combined *P*-value across herds: *P* = 3. 10⁻²⁰). Similarly, *A. variegatum* and *Hyalomma spp* abundance dynamics were positively correlated (Fig. 3; three significantly positive correlations; combined *P*-value: *P* = 9. 10⁻¹³). Differently from these native ticks, *R. microplus* abundance peaked a few months after the beginning of the rainy season. This resulted in a significantly negative correlation between *A. variegatum* and *R. microplus* abundance dynamics in area #3 (Fig. 3; site 3 F). Conversely, significantly positive correlations were detected between the abundance of the native *Boophilus* species and that of *R. microplus* in area #2 (Fig. 3; site 2O), although the small number of native ticks weakened the statistical power of the analysis.

Effect of co-infestation patterns on adult tick abundances and incidence rates

Besides seasonality, the host co-infestation pattern also significantly structured the within-site abundance variations in 19 of the 33 (57 %) taxon-by-site combinations defined by the four predominant taxa (*Hyalomma spp*, *A. variegatum*, *Rhipicephalus spp* and *R. microplus*).

Significant effects of competitors were less frequently observed on *Hyalomma spp* abundance than on other tested taxa (two significant interactions out of seven tested sites; 28 % vs ≥ 50 % for the other taxa). Specifically, *Hyalomma spp* abundance at site 2G during the medium and high abundance seasons was significantly (*P* < 0.05) higher in the case of co-infestation by *A. variegatum* and *R. microplus* than in the absence of co-infestation (Fig. 4). A similar, but more pronounced effect of co-infestation by *A. variegatum* on *Hyalomma*

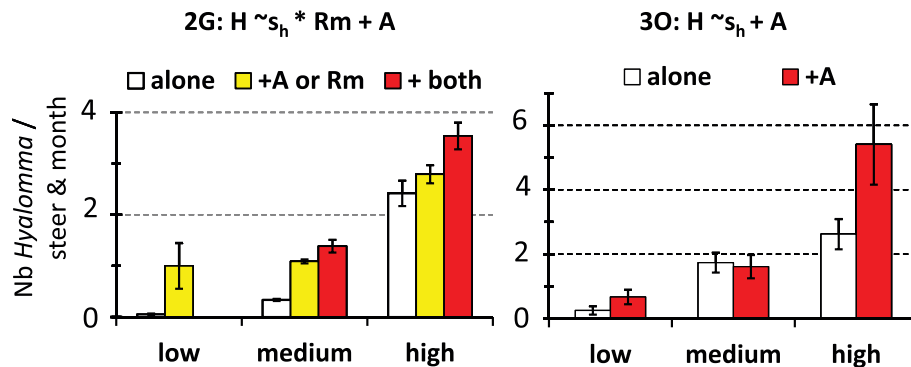


Fig. 4 Significant impacts of the host co-infestation pattern in *Hyalomma* spp abundance. The minimal models (i.e., involving factors with significant effects; $P < 0.05$) are indicated: s_h refers to the seasonal abundance variations of *Hyalomma* spp while A and Rm describe the presence or absence of co-infestation by *A. variegatum* and *R. microplus*, respectively. The histograms refer to the observed distributions. The indications 'alone', '+X' or '+ both' refer to the absence of competitors on the individual-host, or the presence of one or both co-infesting taxa, respectively

spp abundance was observed at site 3O during the low and high abundance season (Fig. 4).

Similarly, *A. variegatum* abundance significantly increased on hosts that were co-infested by *Hyalomma* spp at sites 2G, 3 K and 3 F (Fig. 5). At site 3 F, this effect was further increased when the host was simultaneously co-infested with *Rhipicephalus* spp and

Hyalomma spp (Fig. 5). At three other sites (1A, 1 K and 2O), host co-infestation by *Rhipicephalus* spp also had a season-dependent, positive effect on *A. variegatum* abundance (Fig. 5), with some exceptions. Specifically, *Rhipicephalus* spp co-infestation had no significant effect at sites 1A and 2O in the medium abundance seasons (Fig. 5).

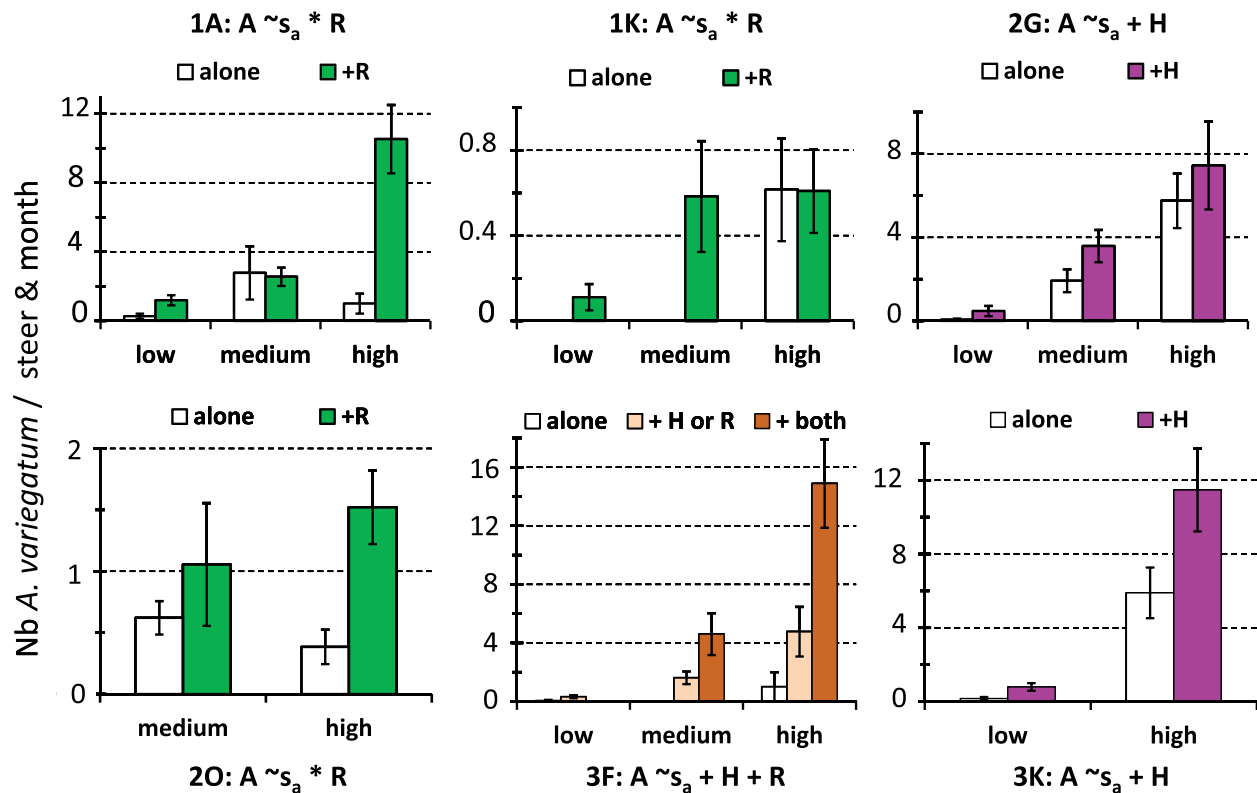


Fig. 5 Significant impacts of the host co-infestation pattern in *A. variegatum* abundance. The minimal models (i.e., involving factors with significant effects) are indicated: s_a refers to the seasonal abundance variations of *A. variegatum* while H and R describe the presence or absence of co-infestation by *Hyalomma* spp and *Rhipicephalus* spp, respectively. The histograms refer to the observed distributions (see Fig. 4 legend)

Analysis of the co-infestation effect on *Rhipicephalus* spp abundance indicated that the presence of *A. variegatum* and/or *R. microplus* increased *Rhipicephalus* spp abundance in five of the eight herds where it was found (sites 1A, 1 K, 2G, 3 F and 3O) (Fig. 6). Conversely, at 2G, the season-dependent effect of co-infestation by *R. microplus* resulted in a decrease of *Rhipicephalus* spp abundance in the low season (from 0.2 to 0.1 tick/steer per month) and in an increase in the high season (from 2 to 5.5 ticks/steer per month; Fig. 6).

Finally, *R. microplus* abundance significantly changed with co-infestation by native tick taxa in six out of eight sites (Fig. 7). Co-infestation by *A. variegatum* significantly increased *R. microplus* abundance at sites 1O and 2O in all seasons and at site 3 F in the medium abundance season (Fig. 7). Conversely, at site 3 K, *A. variegatum* co-infestation decreased *R. microplus* monthly abundance from 62 to 5.1 ticks/steer in the low abundance season (Fig. 7). Three other native taxa significantly ($P < 0.05$) increased *R. microplus* abundance. At site 1A, co-infestation by *Rhipicephalus* spp increased *R. microplus* abundance in all abundance seasons (Fig. 7). At site 1 K, co-infestation by *R. annulatus* and/or *R. decoloratus* increased *R. microplus* abundance during the low and high abundance seasons (Fig. 7).

The minimal models retained to explain the within-areas of the tick incidence rates involve the additive and/or interactive significant effects of sites, seasonal pattern of abundance and co-infestation patterns. The minimal models retained for *A. variegatum* in area #4 and *Hyalomma* spp in areas # 3 and 4 were not considered since they explained less than 10 % of the variation in the tick incidence rates. The ten others are presented with the observed variations in incidence rates in Figs. 8 and 9. In eight cases, the incidence rates of the studied taxon significantly increased with its seasonal abundance levels (Figs. 8 and 9). Besides seasonality, the incidence rate of *Hyalomma* spp significantly increased upon co-infestation by three other taxa in site 2G. Similarly, the incidence rate of *A. variegatum* significantly increased upon co-infestation by *Rhipicephalus* spp and *R. microplus* in area #1 and #2 and upon co-infestation by *Hyalomma* spp in area #3 (Fig. 8) Co-infestation by *A. variegatum* and/or *R. microplus* increased *Rhipicephalus* spp incidence rate also in area #1 (sites 1A, 1 K and 1O) in the high abundance season, and in area #2 in all three abundance seasons (Fig. 9).

R. microplus incidence rates also significantly ($P < 0.05$) increased with co-infestation by *Rhipicephalus* spp in area #1, by *R. decoloratus* in area #2 and by both *A.*

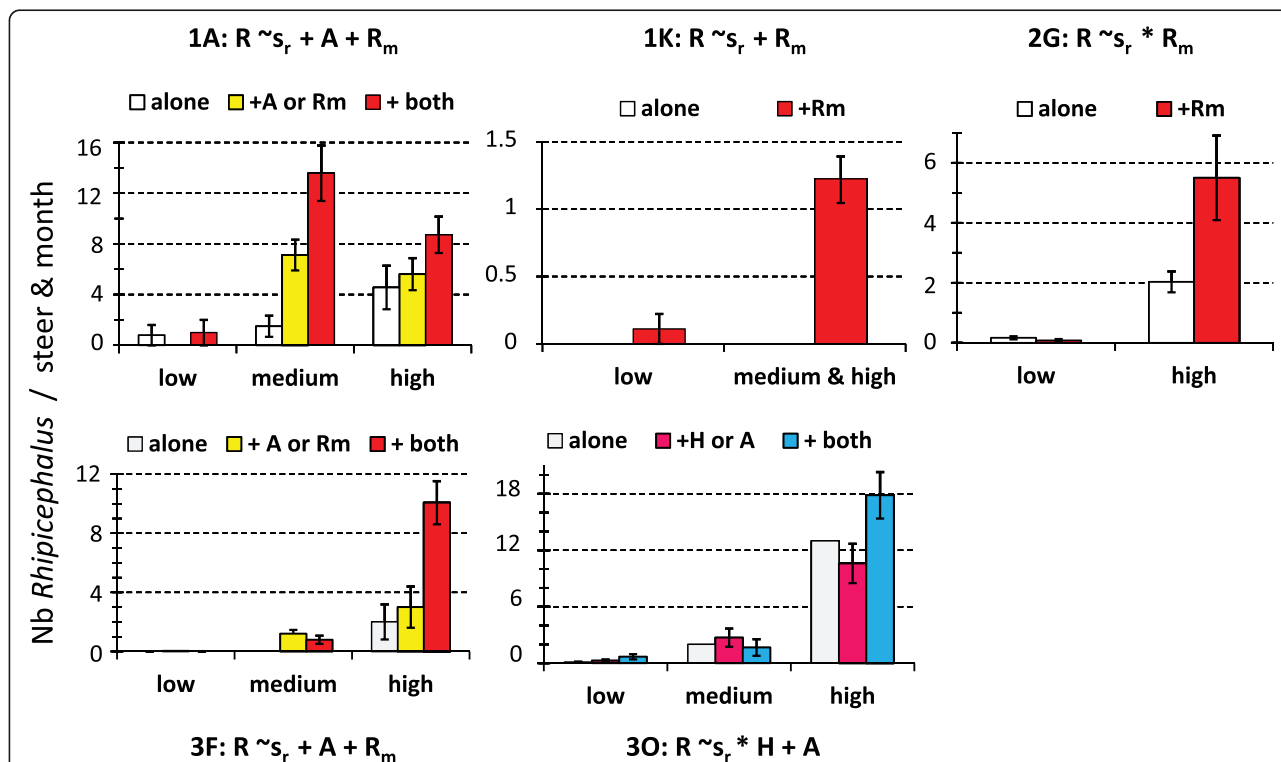
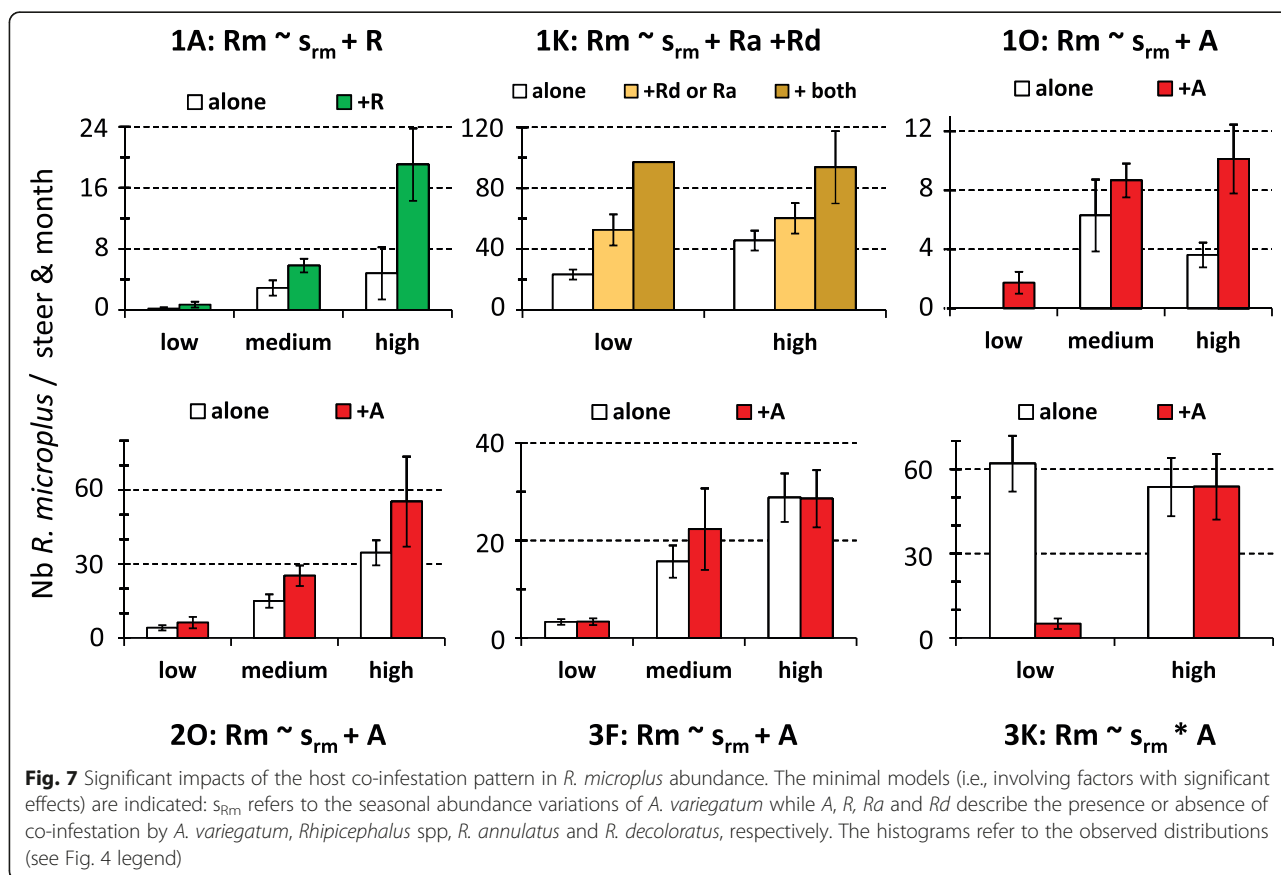


Fig. 6 Significant impacts of the host co-infestation pattern in *Rhipicephalus* spp abundance. The minimal models (i.e., involving factors with significant effects) are indicated: s_r refers to the seasonal abundance variations of *A. variegatum* while *A*, *H* and *Rm* describe the presence or absence of co-infestation by *A. variegatum*, *Hyalomma* spp and *R. microplus*, respectively. The histograms refer to the observed distributions (see Fig. 4 legend)



variegatum and *Hyalomma* spp in area #3 (Fig. 9). Such effect was particularly visible at site 2O, where *R. microplus* incidence rate reached 100 % among hosts already infested by *R. decoloratus*, irrespective of the season (Fig. 9). *R. microplus* incidence rates of 100 % (high abundance season) were also observed in the three sites of area #3 only in hosts co-infested by both *A. variegatum* and *Hyalomma* spp (Fig. 9).

Impact of co-infestation patterns on tick distribution at attachment-sites

Analysis of the effect of co-infestation by the four predominant taxa (*Hyalomma* spp, *A. variegatum*, *Rhipicephalus* spp or *R. microplus*) indicated that the presence of competitors often affected the distribution of other ticks on the five host body parts considered (head, legs, flanks, perineum and tail) (see for details the distribution in P_1 -values in Additional file 1). Specifically, co-infestation by *Hyalomma* spp significantly affected the distribution of *A. variegatum*, *R. microplus* and *R. geigy* *microplus* (in all cases, combined P -value across herds < 0.05). Co-infestation by *A. variegatum* significantly affected the distribution of *Rhipicephalus* spp, *R. annulatus*, *R. decoloratus* and *R. microplus* (in all cases, combined P -value across herds < 0.05). Co-infestation by

Rhipicephalus spp significantly affected the distribution of all other taxa (in all cases, combined P -value across herds < 0.02) and co-infestation by *R. microplus* significantly affected the distribution of all other taxa (combined P -value across herds < 0.05), but for *Rhipicephalus* spp (combined P -value across herds $P = 1$).

However, such effects rarely influenced the probability of a taxon to reach its favorite attachment sites (see the distribution in P_2 -values in Additional file 1). Only *R. microplus* showed a significant decrease in the probability of reaching its favorite attachment sites across the monitored herds upon host co-infestation by *Hyalomma* spp or *A. variegatum* (in both cases, combined P -value across herds < 0.05). Similarly, co-infestation by *Rhipicephalus* spp decreased the probability of *R. microplus* and *R. geigy* to reach their favorite attachment sites (in both cases, combined P -value across herds $P < 0.05$), whereas co-infestation by *R. microplus* decreased the probability of *R. annulatus* to reach its favorite attachment sites (combined P -value across herds $P < 0.05$).

Discussion

This study investigated the determinants in the community structure of ticks infesting cattle in Benin and Burkina Faso. The tick community compositions varied

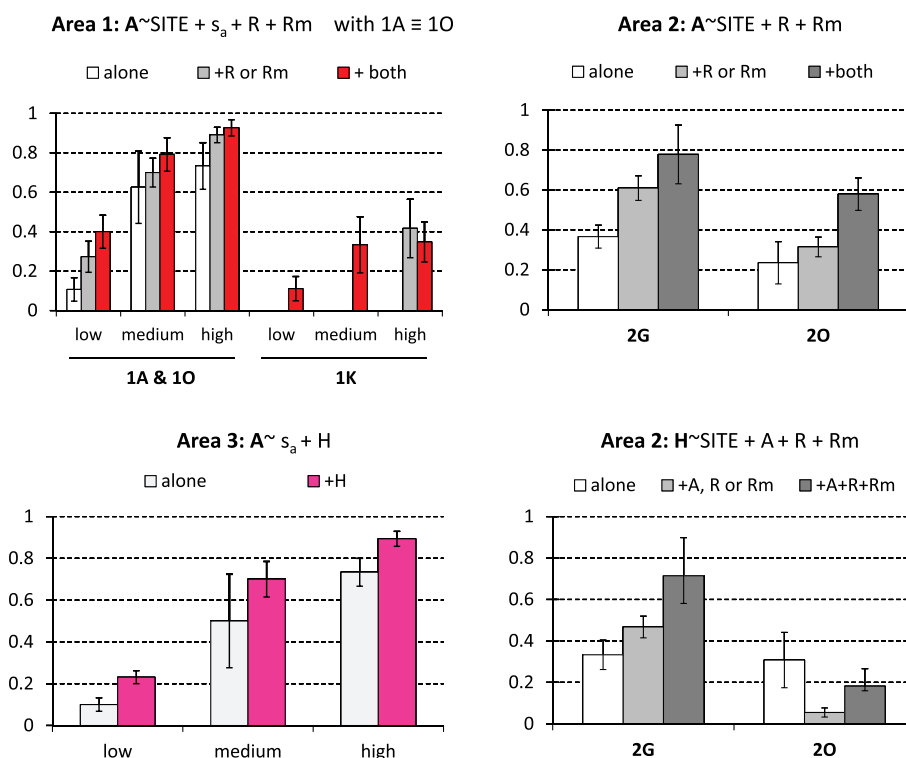
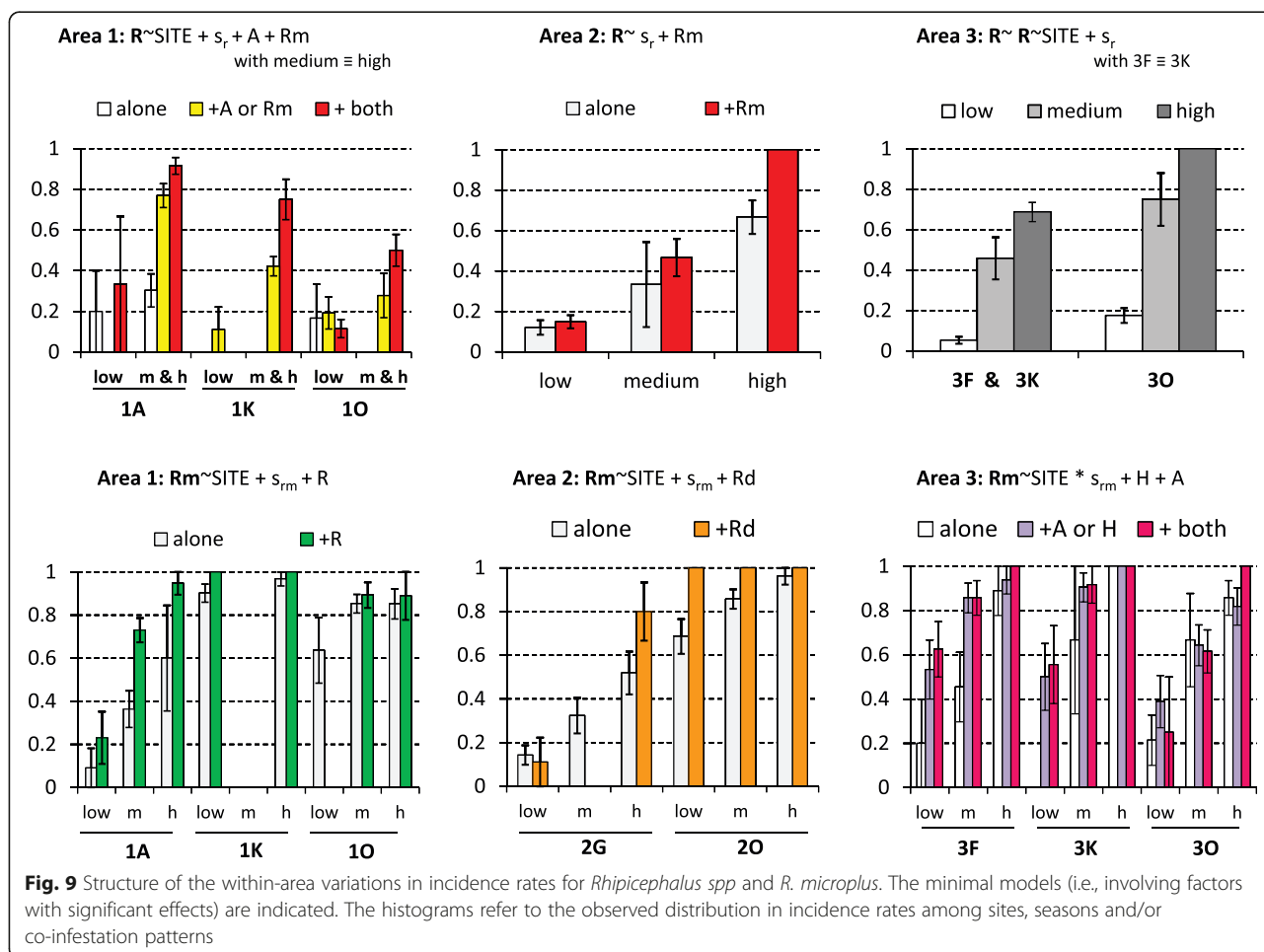


Fig. 8 Within-area variations in incidence rates for *A. variegatum* and *Hyalomma* spp. The minimal models (i.e., involving factors with significant effects) are indicated. The histograms refer to the observed distribution in incidence rates among sites, seasons and/or co-infestation patterns

significantly both within and among areas and the lowest diversity was observed in Central Burkina Faso (area #4) (Table 1; Fig. 2). Climatic differences are likely to explain the between-areas variations but not the within-areas variations, given that the variations in the mean rainfall and temperature explained only 3 % of the spatio-temporal LCBD variation. The alternation of dry and rainy seasons represents nevertheless a factor structuring the significant increases in LCBD punctually observed since they occurred in the early rainy season in Benin and South-West Burkina Faso (April–June), in the late rainy season in South Benin (September) and during the early dry season (December) in North Benin (Fig. 2). Furthermore, tick abundance tended to peak during the rainy seasons, although some delay was observed for the *Boophilus* species relatively to the other taxa. Such delay is related to the life cycle specificity of this one-host tick species. Eggs and unfed larvae are the only stages of the *Boophilus* species living away from the host. Conversely, the other taxa are two- and three-host ticks and not only the eggs and freshly hatched larvae but also other stages can leave the host after complete blood-feeding, thus facing the risk of desiccation in the local habitat [16]. Whatever their life cycle and status (native or invasive species), two infestation dynamic features were common to all tick taxa. First, their infestation dynamics were

determined not only by abiotic parameters (seasonal patterns, Table 1), but also by inter-species interactions among cattle ticks (Figs. 4, 5, 6 and 7). Second, positive relationships were observed between their local abundance and incidence rate (Figs. 8 and 9); in other words, the tick probability to infect a new host increases with its local mean abundance. This reminds the positive relationships between local mean abundance and prevalence previously reported for fleas [36], nematodes [37] or monogeneans [38].

In Central Burkina Faso (area #4), *A. variegatum* and *Hyalomma* spp were the only adult ticks collected. Differently from what observed in other taxon-by-climatic area combinations, their seasonal abundance variation was not affected by the host co-infestation pattern in this area. In a previous survey performed in 1996 in three cattle herds from Central Burkina Faso, the monthly abundances of *H. marginatum rufipes* (the only *Hyalomma* species observed) and *A. variegatum* were estimated to be 7.21 and 7.50 adult ticks/steer (Table 3) [8]. Such estimates are higher than those of the present survey (1.22 and 0.73 adult ticks/steer per month) (Table 3), indicating a decrease in the abundance of native ticks during the last decades in an area not colonized by *R. microplus*. Such a decrease might be the result of global warming in this Sahelian region located



along the limit of the geographical distribution of these species [16]. Moreover, the recycling for tick control of the chemicals designed for agricultural pest control [6] might also have partly contributed to such a decrease.

Although absent from Central Burkina Faso (area #4), *R. microplus* represented 70 % of all the adult ticks collected in this survey. This confirms the invasion success of *R. microplus* in West Africa [17–25] and further supports the hypothesis that the Sahelian climate is not suitable to *R. microplus* [33], although this species was detected along the Cameroon-Nigeria border [22, 23]. Moreover, the high *R. microplus* abundance in North Benin (area #2) suggests that the presumed ecological niche of this species in West Africa [39] should be re-evaluated. The analysis of the tick attachment sites on the host indicated that *R. microplus* success to reach its favorite attachment sites significantly decreased upon co-infestation by *Hyalomma* spp and *Rhipicephalus* spp. Conversely, co-infestation by *R. microplus* did not affect the success of native tick species to attach on their favorite sites (but for *R. annulatus*) (Additional file 1). As the favorite attachment sites are likely to be the result of

evolution, these results suggest that the native tick species impose higher competitive constraints on the invasive species than the invasive species on the native ones. Experimental manipulation of host co-infestation and tick fertility monitoring would be required to settle this point. However, the competition exerted by *R. microplus* on native tick species can be assessed by comparing the present abundance estimates with those obtained before *R. microplus* arrival [7–9]. The surveys performed in North Benin in the early 2000s led to different estimates in the adult abundance of the native tick taxa than the present study (Table 3). Interestingly, *R. decoloratus* was not detected in these earlier studies, while our survey found that it was the predominant native species of the *Boophilus* sub-genus. Moreover, the abundance of *R. geigy* adults has decreased since the early 2000s, whereas the abundance of *R. annulatus* adults has increased (Table 3). Overall, the abundance of adult ticks from the native *Boophilus* species (*R. decoloratus*, *R. geigy* and *R. annulatus*) has increased from 2003 to 2013 (Table 3). This does not support the hypothesis that *R. microplus* is replacing the native sister-species. The same

Table 3 Temporal changes in the abundance of native tick taxa

Year	site	<i>Hyalomma spp</i>	<i>A. variegatum</i>	<i>Rhipicephalus spp</i>	<i>R. annulatus</i>	<i>R. decoloratus</i>	<i>R. geigy</i>	<i>Boophilus spp</i>	All taxa
North Benin (area #2)									
2003–04	All sites	0.52 ± 0.08	1.19 ± 0.20	4.04 ± 0.12	0.31 ± 0.07		1.15 ± 0.17	1.46 ± 0.20	3.50 ± 0.47
2004–05	All sites	0.40 ± 0.14	4.13 ± 1.33	0.12 ± 0.03	0.19 ± 0.08		1.07 ± 0.17	1.26 ± 0.17	5.92 ± 1.50
	Bassila	0.14 ± 0.04	4.59 ± 0.22	0.12 ± 0.04	0.12 ± 0.04		1.12 ± 0.18	1.28 ± 0.22	6.13 ± 1.49
	Materi	0.67 ± 0.27	3.68 ± 0.16	0.34 ± 0.12	0.21 ± 0.06		1.02 ± 0.02	1.23 ± 0.17	5.71 ± 1.58
2012–13	All sites	0.79 ± 0.21	2.02 ± 0.81	0.83 ± 0.22	0.72 ± 0.28	1.12 ± 0.33	0.29 ± 0.11	2.13 ± 0.65	5.77 ± 0.92
	2G	1.47 ± 0.40	3.33 ± 0.78	0.76 ± 0.35	0.93 ± 0.51	1.34 ± 0.55	0.35 ± 0.18	2.63 ± 0.78	8.18 ± 1.83
	2O	0.24 ± 0.16	0.74 ± 0.50	0.91 ± 0.44	0.50 ± 0.28	0.85 ± 0.27	0.22 ± 0.09	1.58 ± 0.55	3.47 ± 0.47
Central Burkina Faso (area #4)									
1996	All sites	7.21 ± 1.54	7.50 ± 4.14						7.35 ± 2.59
2012–13	All sites	1.22 ± 0.26	0.73 ± 0.17						0.97 ± 0.21
	4 F	1.94 ± 0.50	0.53 ± 0.33						1.24 ± 0.34
	4 K	1.26 ± 0.35	0.17 ± 0.14						0.72 ± 0.23
	4 L	0.66 ± 0.28	0.007 ± 0.007						0.33 ± 0.14
	4Z	0.23 ± 0.12	0.056 ± 0.037						0.14 ± 0.06

The mean monthly abundance of adult ticks/steer were computed from the data collected in 1996 [7], 2003–04 [9], 2004–05 [8] and 2012–13 (present study); the standard error of the mean refers to the variations observed during the 12 months of each survey. *Boophilus spp* includes the three native species of this subgenus (*R. annulatus*, *R. decoloratus* and *R. geigy*)

conclusion is reached when considering all native tick taxa (Table 3). The composition of the tick communities has changed over the years; however these changes do not translate in an overall decrease in the abundance of native taxa. Therefore, rather than displacing the native tick taxa and the associated veterinary health concerns, the successful demographic increase of *R. microplus* in West Africa has added new tick-associated risks for cattle health.

Aggregated distributions of tick taxa among herds were recurrently observed in Benin and South-West Burkina Faso (areas #1 to 3) because the local abundances and/or incidence rates of each taxon increased with the co-infestation by other taxa. This is a characteristic shared by several mammalian ectoparasite communities [39–43]. As genetic bases for this trait exist in cattle, this may open the road to the selection of breeds with lower susceptibility to tick infestation [17]. This feature may also facilitate the communication to local stakeholders regarding tick control. Indeed, the economic advantage of focusing tick control programs on animals that are infested above a threshold burden might counter-balance the average loss in animal growth and milk yield in places where cattle production rely mainly on low input systems and tick burden remains moderate, such as in West Africa. It remains to determine whether the aggregated distribution of tick taxa also affects the distribution of the tick-borne pathogens circulating among West African cattle. Variable patterns have been previously reported. Competitive exclusion among tick-borne pathogens was observed in Algerian

cattle [44]. Conversely, aggregative distribution seems to be the rule in South Africa for tick-borne pathogens monitored in mammalian blood samples or in the tick salivary glands [45, 46].

Conclusion

This study is the first attempt to quantify the impact of co-infestation patterns among native and invasive tick species. It shows that these patterns are key factors in the determination of the infestation dynamics of each tick taxon in West African cattle. It also shows that the *R. microplus*-related risks for cattle health in West Africa are not replacing but are adding to those caused by native tick taxa.

Additional file

Additional file 1: Effect of the co-infestation patterns on the distribution of tick attachment sites. (XLS 98 kb)

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

AB, SA, SF, HA, CC designed the study. HA, AB, SA, SZ coordinated and participated to field sampling, and identified the collected ticks. AB and CC performed the data analysis and wrote the first draft. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

We thank the farmers for their kind cooperation to this survey. This research was funded by Australian Aid (AusAID, project WECATIC). AB benefited from a SCAC fellowship from the Embassy of France in Benin and complementary funding from IRD, a Cooperative Agreement between MIVEGEC and with

ARS-USDA (Kerrville, Texas), the International Foundation for Science (www.ifs.se/) and the "International Laboratory of Vector-borne Diseases in West Africa (IMI LAMIVECT)" that groups together different laboratories working on vectors and vector-borne diseases in West Africa. We also thank M. Pascal YAKA (Direction Générale de la Météorologie du Burkina Faso) for his help in getting climatic data for Burkina Faso.

Author details

¹Unité de Recherche en Biotechnologie de la Production et de la Santé Animales (URBPSA), Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Bénin. ²Unité de Recherche sur les bases biologiques de la Lutte Intégrée (URBIO), Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), 559, 3-51 Avenue du Gouverneur Louveau, 01 B.P. 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso. ³IRD, UR 224 'Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC), Montpellier, France. ⁴Département des Sciences et Techniques de l'Élevage (DSTE/FASE), Université Dan Dicko Dan Koulodo, BP 465 Maradi, Niger. ⁵CNRS, Université Montpellier, UMR 5290 MIVEGEC, Montpellier, France.

Received: 3 September 2015 Accepted: 14 January 2016

References

- Anonymous. Enquête Nationale Sur Les Effectifs Du Cheptel. Ministère des Ressources Animales et Ministère de l'Economie et du Développement. Ouagadougou. Burkina Faso; 2004.
- Country Stat pour l'Afrique Sub-Saharienne. Bénin- Premier rapport panorama. FAO;2009.
- Djenontin JA. Dynamique des stratégies et des pratiques d'utilisation des parcours naturels pour l'alimentation des troupeaux bovins au Nord-Est du Bénin. Thèse de doctorat. Université d'Abomey-Calavi; 2010.
- Djenontin JA, Madjidou O, Houinato MR, Mensah GA, Sinsin BA. Le calendrier pastoral en élevage extensif dans le Nord-Est du Bénin : un outil de gestion du cheptel bovin de l'exploitation. *Sécheresse*. 2012; 23:261–70.
- Nianogo AJ, Somda J. Diversification et intégration inter-spécifique dans les élevages ruraux au Burkina Faso. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 1999;3:133–9.
- Adakal H, Stachurski F, Chevillon C. Tick control practices in Burkina Faso and acaricide resistance survey in *Rhipicephalus (Boophilus) geigyi* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 2013;59:483–91.
- Kaboré H, Salembere MS, Tamboura HH. Seasonal Variation of Ticks on Cattle in Burkina Faso. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;849:398–401.
- Farougou S, Kpodekon M, Tchabode DM, Youssao AKI, Boko C. Abondance saisonnière des tiques (Acari: Ixodidae) parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin: cas des départements de l'Atacora et de la Donga. *Ann Med Vet*. 2006;150:145–52.
- Farougou S, Kpodekon M, Tassou AWY. Abondance saisonnière des tiques (Acari : Ixodidae) parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin : cas des départements du Borgou et de l'Alibori. *Rev Afric Santé Prod Anim*. 2007;5:61–7.
- Grindatto A, Bayala I, Sidibé I, Kanwé A, Mattoni M, Tomassone L. Ticks and tick-borne pathogens in cattle from peri-urban area of Bobo-Dioulasso. Burkina Faso: Proceedings of the VI International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens; 2008. p. 183.
- Farougou S, Adakal H, Biguezoton AS, Boko C. Prévalence de l'infection d'*Amblyomma variegatum* par *Ehrlichia ruminantium* dans les élevages extensifs du Bénin. *Rev Med Vet*. 2012;163:261–6.
- Stachurski F, Musonge EN, Achu-Kwi MD, Saliki JT. Impact of natural infestation of *Amblyomma variegatum* on the liveweight gain of male Gudali cattle in Adamawa (Cameroon). *Vet Parasitol*. 1993;49:299–311.
- Norval RAI, Sutherst RW, Jorgensen OG, Kerr JD. The effects of the bont tick, *Amblyomma hebraeum*, on milk production of Sanga and Sanga x Brahman cattle. *Med Vet Entomol*. 1997;11:143–7.
- Stachurski F. Modalités de la rencontre entre la stase adulte de la tique *Amblyomma variegatum* (Acari, Ixodida) et les bovins : applications potentielles à la lutte contre ce parasite. PhD thesis, Université Montpellier II; 2000.
- De Castro JJ. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet Parasitol*. 1997;71:77–97.
- Walker AR, Bouattour A, Camicas JL, Estrada-Peña A, Horak IG, Latif AA, et al. Ticks of domestic animals in Africa: A guide to identification of species. University of Edinburgh Scotland Press; 2003.
- Frisch J. Towards a permanent solution for controlling cattle tick. *Int J Parasitol*. 1999;29:57–71.
- Madder M, Thys E, Geysen D, Baudoux C, Horak I. *Boophilus microplus* ticks found in West Africa. *Exp Appl Acarol*. 2007;43:233–4.
- Madder M, Thys E, Achi L, Toure A, De Deken R. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a most successful invasive tick species in West-Africa. *Exp Appl Acarol*. 2011;53:139–45.
- Madder M, Adehan S, De Deken R, Adehan R, Lokossou R. New foci of *Rhipicephalus microplus* in West Africa. *Exp Appl Acarol*. 2012;56:385–90.
- Toure A, Diaha CA, Sylla I, Kouakou K. Récente recomposition des populations de tiques prévalentes en Côte d'Ivoire. *Int J Biol Chem Sci*. 2014;8:566–78.
- Opara MN, Ezech NO. Ixodid ticks of cattle in Borno and Yobe states of northeastern Nigeria: breed and coat colour preference. *Anim Res Int*. 2011; 8:1359–65.
- Musa HI, Jajere SM, Adamu NB, Atsanda NN, Lawal JR, Adamu SG, et al. Prevalence of tick infestation in different breeds of cattle in Maiduguri, northeastern Nigeria. *Bangl J Vet Med*. 2014;12:161.
- Adakal H, Biguezoton A, Zoungana S, Courtin F, De Clercq EM, Madder M. Alarming spread of the Asian cattle tick *Rhipicephalus microplus* in West Africa—another three countries are affected: Burkina Faso. Mali and Togo. *Exp Appl Acarol*. 2013;1:383–6.
- De Clercq EM, Vanwambeke SO, Sungirai M, Adehan S, Lokossou R, Madder M. Geographic distribution of the invasive cattle tick *Rhipicephalus microplus*, a country-wide survey in Benin. *Exp Appl Acarol*. 2012;58:441–52.
- Tønnesen MH, Penzhorn BL, Bryson NR, Stoltz WH, Masibigiri T. Displacement of *Boophilus decoloratus* by *Boophilus microplus* in the Soutpansberg region, Limpopo Province. *South Africa Exp Appl Acarol*. 2004;32:199–09.
- Zeman P, Lynen G. Evaluation of four modelling techniques to predict the potential distribution of ticks using indigenous cattle infestations as calibration data. *Exp Appl Acarol*. 2006;39:163–76.
- Lorusso V, Picozzi K, de Bronsvort BM, Majekodunmi A, Dongkum C, Balak G, et al. Ixodid ticks of traditionally managed cattle in central Nigeria: where *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* does not dare (yet?). *Parasite Vector*. 2013;7:166.
- Anderson MJ, Crist TO, Chase JM, Vellend M, Inouye BD, Freestone AL, et al. Navigating the multiple meanings of beta diversity: a roadmap for the practicing ecologist. *Ecol Lett*. 2011;14:19.
- Legendre P, De Caceres M. Beta diversity as the variance of community data: dissimilarity coefficients and partitioning. *Ecol Lett*. 2013;16:951–63.
- Legendre P, Gauthier O. Statistical methods for temporal and space-time analysis of community composition data. *Proc Roy Soc Biol*. 2014;281:1–9.
- Crawley MJ. The R, Book. England: John Wiley & Sons Ltd; 2007.
- Whitlock MC. Combining probability from independent tests: the weighted Z-method is superior to Fisher's approach. *J Evol Biol*. 2005;18:1368–73.
- De Meeüs T, Guégan J-F, Teriokhin AT. MultiTest V.1.2, a program to binomially combine independent tests and performance comparison with other related methods on proportional data. *BMC Bioinfo*. 2009;10:1–8.
- Burns P. Random portfolios for performance measurement. In: Kontogiorgos EJ, Gatou C, editors. *Optimisation, econometric and financial analysis*, Springer; 2007. p. 227–249.
- Krashnov BR, Morand S, Khokhlova IS, Shenbrot GI, Hawlena H. Abundance and distribution of fleas on desert rodents: linking Taylor's power law to ecological specialization and epidemiology. *Parasitology*. 2005;131:825–37.
- Morand S, Guégan JF. Distribution and abundance of parasite nematodes: ecological specialization, phylogenetic constraints or simply epidemiology? *Oikos*. 2000;563–573.
- Simkova A, Kadlec D, Gelner M, Morand S. Abundance-prevalence relationship of gill congenic ectoparasites: testing the core satellite hypothesis and ecological specialization. *Parasitol Res*. 2002;88:682–6.
- De Clercq EM, Estrada-Peña A, Adehan S, Madder M, Vanwambeke SO. An update on distribution models for *Rhipicephalus microplus* in West Africa. *Geospat Health*. 2013;8:301–8.
- Lutermann H, Fagiri DM, Bennett NC. Complex interactions within the ectoparasite community of the eastern rock sengi (*Elephantulus myurus*). *Int J Parasitol Parasite Wildlife*. 2015;4:148–8.

41. Matthee S, Krasnov BR. Searching for the generality in the patterns of parasite abundance and distribution: ectoparasites of a South African rodent, *Rhabdomys pumilio*. *Int J Parasitol*. 2009;39:781–8.
42. Krasnov BR, Schenbrot GL, Khoklova IS. Agregative structure is the rule in communities of fleas : null model analysis. *Ecography*. 2001;34:751–61.
43. Krasnov BR, Stanko M, Morand S. Competition, facilitation or mediation via host? Patterns of infestation of small European mammals by two taxa of haematophagous arthropods. *Ecol Entomol*. 2010;35:37–4.
44. Dib L, Bitam I, Tahri M, Bousouilah M, de Meeûs T. Competitive exclusion between piroplasmosis and anaplasmosis agents within cattle. *PLoS Path*. 2008;4:7.
45. Berggoetz M, Schmid M, Ston D, Smith V, Chevillon C, Pretorius AM, et al. Tick-borne pathogens in the blood of wild and domestic ungulates in South Africa: Interplay of game and livestock. *Ticks Tick-borne Dis*. 2014;5: 166–75.
46. Berggoetz M, Schmid M, Ston D, Smith V, Chevillon C, Pretorius AM, et al. Protozoan and bacterial pathogens in tick salivary glands in wild and domestic animal environments in South Africa. *Ticks Tick-borne Dis*. 2014;5: 176–85.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Effect of the co-infestation by *Hyalomma spp*

Taxon	Site	P ₁	P ₂	% attached on preferred host body parts in the absence vs. presence of <i>Hyalomma spp</i>					
<i>A. variegatum</i>	1A	0.43	1	93% (N = 381) Vs	100% (N = 3)	+			
	1O	9.0E-04	1	66% (N = 468) Vs	67% (N = 15)	=			
	2G	2.6E-03	1.8E-03	98% (N = 189) Vs	91% (N = 290)	-			
	2O	0.064	0.022	53% (N = 96) Vs	91% (N = 11)	+			
	3F	5.9E-03	2.0E-03	75% (N = 32) Vs	93% (N = 540)	+			
	3K	1.0E-04	0.033	84% (N = 117) Vs	91% (N = 257)	+			
	3O	0.871	0.640	92% (N = 112) Vs	93% (N = 152)	=			
	4F	0.252	0.616	97% (N = 37) Vs	93% (N = 40)	-			
	4K	0.481	0.487	100% (N = 11) Vs	86% (N = 14)	-			
	all	3.7E-06	1						
<i>R. spp</i>	1A	0.347	0.495	92% (N = 950) Vs	95% (N = 13)	+			
	1O	1	1	100% (N = 86) Vs	71% (N = 1)	-			
	2G	0.022	6.5E-03	82% (N = 70) Vs	56% (N = 39)	-			
	2O	0.015	0.033	23% (N = 109) Vs	50% (N = 22)	+			
	3F	0.026	0.222	86% (N = 65) Vs	92% (N = 303)	+			
	3K	0.0032	0.481	89% (N = 95) Vs	96% (N = 114)	+			
	3O	0.292	0.745	97% (N = 103) Vs	96% (N = 307)	=			
	all	1	1						
	<i>R. annulatus</i>	2G	0.011	0.433	81% (N = 113) Vs	86% (N = 81)	+		
<i>R. decoloratus</i>	1A	0.019	0.034	60% (N = 25) Vs	100% (N = 10)	+			
	2G	0.064	0.106	90% (N = 20) Vs	100% (N = 114)	+			
	4F	1	1	100% (N = 1) Vs	100% (N = 2)	=			
	4L	1	1	100% (N = 1) Vs	100% (N = 5)	=			
	all	1	1						
<i>R. microplus</i>	1A	0.199	0.825	72% (N = 760) Vs	69% (N = 26)	-			
	1O	1.0E-04	2.0E-07	76% (N = 807) Vs	0% (N = 11)	-			
	2O	1.0E-04	0.158	82% (N = 2 785) Vs	78% (N = 207)	-			
	3F	1.0E-04	0.180	92% (N = 441) Vs	94% (N = 1 537)	+			
	3O	0.019	0.033	99% (N = 573) Vs	97% (N = 779)	-			
	all	1.3E-15	2.1E-04						
<i>R. geigy</i>	1A	0.130	1	0% (N = 7) Vs	0% (N = 1)	=			
	2G	1.0E-04	2.8E-04	100% (N = 36) Vs	60% (N = 15)	-			
	3K	0.176	1	100% (N = 39) Vs	100% (N = 8)	=			
	all	4.3E-04	1						

P₁: Probability that the co-infestation of the individual host by *Hyalomma spp* affects the distribution of the tick taxon among the five host body parts under study (head, leg, flank, perineum, tail)

P₂: Probability that the co-infestation of the individual host by *Hyalomma spp* affects the distribution of the tick taxon among its preferred and non-preferred sites of attachments on host

P-values in the R x C contingency tables were calculated using the Fisher's exact tests; their combination among localities was calculated using the Stouffer's method. Significant P-values are highlighted in bold and blue. Sites are designated as defined in Figure 1. The last column indicates whether the presence of co-infection decreases (-), increases (+) or has no effect (=) on the tick success in attaching to its preferred site on the individual host.

Effect of the co-infestation by <i>A. variegatum</i>								
Taxon	Site	P ₁	P ₂	% attached on the preferred host body parts in the absence vs presence of <i>A. variegatum</i>				
<i>H. spp</i>	1A	0.064	0.067	100%	(N = 2) Vs	0%	(N = 4)	-
	2G	0.551	0.298	80%	(N = 59) Vs	72%	(N = 152)	-
	2O	0.526	0.353	100%	(N = 22) Vs	92%	(N = 12)	-
	3F	1.0E-04	5.E-06	95%	(N = 290) Vs	84%	(N = 436)	-
	3K	0.102	0.347	95%	(N = 288) Vs	93%	(N = 255)	-
	3O	0.006	0.020	91%	(N = 186) Vs	97%	(N = 156)	+
	4F	0.535	0.212	90%	(N = 205) Vs	96%	(N = 70)	+
	4K	0.607	1	92%	(N = 131) Vs	93%	(N = 30)	+
	4L	1	1	94%	(N = 90) Vs	100%	(N = 4)	+
	all	1	1					
<i>R. spp</i>	1A	1.0E-04	0.079	93%	(N = 284) Vs	96%	(N = 679)	+
	1K	0.055	0.132	87%	(N = 121) Vs	76%	(N = 38)	-
	1O	0.102	0.059	93%	(N = 14) Vs	67%	(N = 73)	-
	2G	1.0E-04	4E-12	13%	(N = 30) Vs	85%	(N = 79)	+
	2O	0.465	0.857	43%	(N = 51) Vs	46%	(N = 80)	+
	3F	1.0E-04	0.752	91%	(N = 23) Vs	87%	(N = 345)	-
	3K	0.553	0.234	100%	(N = 27) Vs	91%	(N = 182)	-
	3O	0.0054	0.282	95%	(N = 78) Vs	97%	(N = 332)	+
	all	2.6E-09	1.E-04					
<i>R. annulatus</i>	1A	0.005	0.635	82%	(N = 11) Vs	64%	(N = 11)	-
	1K	0.181	1	50%	(N = 106) Vs	57%	(N = 7)	+
	1O	0.382	0.325	50%	(N = 2) Vs	84%	(N = 49)	+
	2G	1.0E-04	1.4E-04	94%	(N = 99) Vs	74%	(N = 95)	-
	2O	1.0E-04	4.7E-05	99%	(N = 83) Vs	75%	(N = 40)	-
	all	2.8E-07	1					
<i>R. decoloratus</i>	1A	0.723	0.458	80%	(N = 15) Vs	65%	(N = 20)	-
	2G	1.0E-04	0.049	100%	(N = 70) Vs	94%	(N = 64)	-
	2O	0.127	0.679	93%	(N = 43) Vs	90%	(N = 29)	-
	all	6.9E-03	0.228					
<i>R. microplus</i>	1A	5.0E-04	4.5E-04	79%	(N = 299) Vs	67%	(N = 487)	-
	1K	1.0E-04	0.001	61%	(N = 4 828) Vs	67%	(N = 755)	+
	1O	1.0E-04	0.001	86%	(N = 118) Vs	73%	(N = 700)	-
	2G	1.0E-04	1.9E-04	91%	(N = 180) Vs	78%	(N = 280)	-
	2O	1.0E-04	0.001	80%	(N = 1 666) Vs	85%	(N = 1 326)	+
	3F	1.0E-04	0.138	95%	(N = 1 040) Vs	93%	(N = 938)	-
	3K	1.0E-04	5.1E-10	94%	(N = 6 248) Vs	90%	(N = 2 274)	-
	3O	0.630	0.376	97%	(N = 1 094) Vs	98%	(N = 258)	+
	all	2.0E-19	5E-17					
<i>R. geigy</i>	2G	2.0E-04	5.9E-04	50%	(N = 10) Vs	98%	(N = 41)	+
	2O	0.021	0.062	83%	(N = 18) Vs	50%	(N = 14)	-
	3F	1	1	100%	(N = 3) Vs	100%	(N = 10)	=
	3K	1	1	100%	(N = 1) Vs	100%	(N = 46)	=
	all	1	1					
P ₁ :	Probability that the co-infestation of the individual host by <i>A.variegatum</i> affects the distribution of the tick taxon among the five host body parts under study (head, leg, flank, perineum, tail)							
P ₂ :	Probability that the co-infestation of the individual host by <i>A.variegatum</i> affects the distribution of the tick taxon among its preferred and non-preferred sites of attachments on host							

P-values were performed using Fisher exact tests on R x C contingency tables; their combination across localities was achieved according to Stouffer's method. Significant P-values appear in bold and blue characters. Sites are designated as defined in Figure 1. The last column indicates whether the presence of coinfection decrease (-), increase(+) or has got no effect (=) on the success for the tick to realize its preferences regarding where to be attached on the individual host.

Impacts of the coinfection by <i>Rhipicephalus spp</i>									
on taxon	in site	P ₁	P ₂	% attached on preferred host body-parts in absence <i>Versus</i> presence of <i>Rhipicephalus spp</i>					
<i>H. spp</i>	1O	0.141	0.143	100%	(N = 6) Vs	0%	(N = 1)	-	
	2G	0.172	0.262	76%	(N = 164) Vs	68%	(N = 47)	-	
	2O	0.129	0.441	100%	(N = 19) Vs	93%	(N = 15)	-	
	3F	1.0E-04	3.1E-09	95%	(N = 420) Vs	80%	(N = 306)	-	
	3K	0.314	0.217	95%	(N = 383) Vs	93%	(N = 160)	-	
	3O	0.093	0.122	96%	(N = 245) Vs	91%	(N = 97)	-	
	all	2.0E-04	4.3E-05						
<i>A. variegatum</i>	1A	0.018	0.178	87%	(N = 38) Vs	93%	(N = 346)	+	
	1K	0.001	1	75%	(N = 8) Vs	79%	(N = 24)	+	
	1O	0.067	0.592	66%	(N = 351) Vs	64%	(N = 132)	+	
	2G	2.0E-04	0.089	96%	(N = 236) Vs	92%	(N = 243)	+	
	2O	9.2E-03	0.052	47%	(N = 53) Vs	67%	(N = 54)	+	
	3F	0.043	0.837	92%	(N = 97) Vs	92%	(N = 475)	=	
	3K	0.047	0.137	92%	(N = 170) Vs	87%	(N = 204)	-	
	3O	0.285	0.180	88%	(N = 40) Vs	94%	(N = 224)	+	
	all	3.0E-09	1						
<i>R. annulatus</i>	1A	6.8E-03	0.533	100%	(N = 3) Vs	68%	(N = 19)	-	
	1K	0.0024	0.014	61%	(N = 64) Vs	37%	(N = 49)	-	
	1O	0.041	0.676	84%	(N = 38) Vs	77%	(N = 13)	-	
	2G	1.0E-04	6.6E-04	74%	(N = 94) Vs	93%	(N = 100)	+	
	2O	0.249	1	90%	(N = 84) Vs	92%	(N = 39)	+	
	all	1.6E-07	1						
<i>R. decoloratus</i>	1A	0.040	0.018	0%	(N = 3) Vs	78%	(N = 32)	+	
	1K	0.015	0.396	43%	(N = 51) Vs	67%	(N = 6)	+	
	1O	0.129	1	91%	(N = 57) Vs	93%	(N = 15)	+	
	2G	0.818	0.577	96%	(N = 105) Vs	100%	(N = 29)	+	
	all	1.9E-02	1						
<i>R. microplus</i>	1A	1.0E-04	0.821	73%	(N = 111) Vs	72%	(N = 675)	-	
	1K	1.0E-04	0.659	62%	(N = 2 845) Vs	62%	(N = 2 738)	=	
	1O	0.011	8.7E-03	77%	(N = 616) Vs	68%	(N = 202)	-	
	2G	0.003	0.016	81%	(N = 375) Vs	92%	(N = 85)	+	
	2O	0.017	0.265	82%	(N = 2 156) Vs	83%	(N = 836)	=	
	3F	1.0E-04	0.0018	95%	(N = 1 272) Vs	91%	(N = 706)	-	
	3K	1.0E-04	2.20E-16	96%	(N = 5 759) Vs	88%	(N = 2 763)	-	
	3O	5.0E-03	0.439	97%	(N = 974) Vs	98%	(N = 378)	=	
	all	1.8E-18	5.6E-08						
<i>R. geigy</i>	1K	0.057	0.043	27%	(N = 15) Vs	100%	(N = 3)	+	
	2G	1.0E-04	0.078	82%	(N = 33) Vs	100%	(N = 18)	+	
	3F	0.486	1	100%	(N = 5) Vs	100%	(N = 8)	=	
	3K	0.1055	1	100%	(N = 42) Vs	100%	(N = 5)	=	
	all	5.0E-04	1						
P ₁ :	Probability that the co-infestation of the individual host by <i>Rhipicephalus spp</i> affects the distribution of the tick taxon among the five host body parts under study (head, leg, flank, perineum, tail)								
P ₂ :	Probability that the co-infestation of the individual host by <i>Rhipicephalus spp</i> affects the distribution of the tick taxon among its preferred and non-preferred sites of attachments on host								

P-values in the R x C contingency tables were calculated using the Fisher's exact tests; their combination among localities was calculated using the Stouffer's method. Significant P-values are highlighted in bold and blue. Sites are designated as defined in Figure 1. The last column indicates whether the presence of co-infection decreases (-), increases (+) or has no effect (=) on the tick success in attaching to its preferred site on the individual host.

Impacts of the coinfection by <i>R. microplus</i>									
on taxon	in site	P ₁	P ₂	% attached on preferred host body-parts in absence <i>Versus</i> presence of <i>R. microplus</i>					
<i>H. spp</i>	1A	0.067	0.067	0%	(N = 4)	Vs	100%	(N = 2)	+
	2G	0.0088	0.262	71%	(N = 126)	Vs	79%	(N = 85)	+
	2O	0.38	1	100%	(N = 11)	Vs	96%	(N = 23)	-
	3F	0.00020	0.004	95%	(N = 132)	Vs	87%	(N = 594)	-
	3K	0.0096	0.014	100%	(N = 77)	Vs	94%	(N = 466)	+
	3O	0.00010	0.160	97%	(N = 144)	Vs	92%	(N = 198)	-
	all	9.3E-09	1						
<i>A. variegatum</i>	1A	0.061	0.070	90%	(N = 143)	Vs	95%	(N = 241)	+
	1O	0.059	0.774	66%	(N = 226)	Vs	65%	(N = 257)	=
	2G	0.140	0.327	95%	(N = 312)	Vs	92%	(N = 167)	-
	2O	0.820	0.696	71%	(N = 7)	Vs	56%	(N = 100)	-
	3F	0.025	0.012	84%	(N = 77)	Vs	93%	(N = 495)	+
	3K	0.23	0.215	75%	(N = 8)	Vs	89%	(N = 366)	+
	3O	0.029	0.315	96%	(N = 89)	Vs	91%	(N = 175)	-
	all	0.0015	0.056						
<i>R. spp</i>	1A	0.008	0.036	97%	(N = 399)	Vs	94%	(N = 564)	-
	1O	0.011	0.032	59%	(N = 39)	Vs	81%	(N = 48)	+
	2G	0.170	0.058	59%	(N = 73)	Vs	78%	(N = 36)	+
	2O	0.110	1	47%	(N = 17)	Vs	45%	(N = 114)	+
	3F	0.019	0.017	98%	(N = 46)	Vs	86%	(N = 322)	-
	3K	1	1	100%	(N = 5)	Vs	92%	(N = 204)	-
	3O	0.150	0.755	96%	(N = 111)	Vs	97%	(N = 299)	=
	all	1	1						
<i>R. annulatus</i>	1A	0.045	0.348	83%	(N = 12)	Vs	60%	(N = 10)	-
	1O	0.463	0.322	100%	(N = 8)	Vs	79%	(N = 43)	-
	2G	0.00010	1.13E-06	94%	(N = 121)	Vs	67%	(N = 73)	-
	2O	0.091	0.089	0%	(N = 1)	Vs	92%	(N = 122)	+
	all	0.00030	0.00027						
<i>R. decoloratus</i>	1A	0.460	0.723	75%	(N = 16)	Vs	68%	(N = 19)	-
	2G	0.00040	1	98%	(N = 80)	Vs	96%	(N = 54)	-
	all	0.0073	1						
<i>R. geigy</i>	2G	0.00070	0.0063	97%	(N = 36)	Vs	67%	(N = 15)	-
	3F	0.462	1	100%	(N = 6)	Vs	100%	(N = 7)	=
	all	0.010	1						

P₁: Probability that the co-infestation of the individual host by *R. microplus* affects the distribution of the tick taxon among the five host body parts under study (head, leg, flank, perineum, tail)

P₂: Probability that the co-infestation of the individual host by *R. microplus* affects the distribution of the tick taxon among its preferred and non-preferred sites of attachments on host

P-values in the R x C contingency tables were calculated using the Fisher's exact tests; their combination among localities was calculated using the Stouffer's method. Significant P-values are highlighted in bold and blue. Sites are designated as defined in Figure 1. The last column indicates whether the presence of co-infection decreases (-), increases (+) or has no effect (=) on the tick success in attaching to its preferred site on the individual host.

Chapitre 3 : Agents pathogènes du bétail transmis par les tiques en Afrique de l'ouest

III.1 Diversité génétique d'*E. ruminantium* : une information utile ?

Ces résultats font partie de l'article n°3 inséré en encart n°3 en page 67

Ehrlichia ruminantium, une rickettsie intracellulaire transmise aux ruminants domestiques et sauvages notamment par les tiques trixènes du genre *Amblyomma*, est l'agent responsable de la cowdriose. Cette maladie cause des mortalités importantes chez les petits ruminants et les bovins exotiques (Uilenberg 1983), ce qui handicape fortement les programmes d'amélioration génétique des races locales. Ce handicap concerne particulièrement les zones d'enzootie telles que le Bénin où 10% des tiques vectrices sont porteuses d'*E. ruminantium* (Farougou *et al.* 2012). La lutte anti-vectorielle contre *A. variegatum* est plus difficile d'application en cas de fortes charges parasitaires dans des troupeaux de grandes tailles, du fait entre autre de la nécessité de traitement à fréquence régulière sur un grand nombre d'animaux. Aussi, afin de limiter les inconvénients de la lutte acaricide [i.e. éventuels cas de résistances ; (Turkson & Botchey 1999)], différents développements de vaccin contre *E. ruminantium* ont-ils été tentés mais se sont avérés infructueux (Collins *et al.* 2003; Mahan *et al.* 2004; Zweygarth *et al.* 2005, 2008; Simbi *et al.* 2006; Adakal *et al.* 2010b). La caractérisation de l'épidémiologie moléculaire de cet agent pathogène n'a retenu l'intérêt des scientifiques que très récemment. Or elle est d'une grande importance pour le choix de souches de terrain à incorporer dans les vaccins afin d'optimiser l'efficacité de ces derniers (Adakal *et al.* 2010a).

La première caractérisation d'ampleur, basée sur des analyses MLST ('Multilocus Sequence Typing') ciblant huit gènes de ménage, a été conduite sur des isolats collectés de 2002 à 2008 dans trois villages burkinabè voisins qui étaient également des lieux d'essais vaccinaux au moment de l'échantillonnage (Adakal *et al.* 2009, 2010a). Cette étude a mis en évidence une co-circulation de deux groupes de génotypes d'*E. ruminantium* au sein de ces trois villages, dont un était caractéristique d'un pic épidémique en cours d'expansion¹ (Adakal *et al.* 2010a). Ce même protocole MLST fut rapidement appliqué aux souches de référence d'*E. ruminantium* collectées dans différentes zones africaines ainsi qu'à un échantillonnage ougandais d'*E.*

¹ Nous évitons volontairement la terminologie de 'complexe clonal' utilisée par les épidémiologistes moléculaires du fait de la confusion qu'elle induit chez les généticiens des populations. Cette confusion s'accroît encore lorsqu'elle s'applique à un agent pathogène dont l'évolution est entre autres marquée par des événements de recombinaison (ce qui est le cas d'*E. ruminantium*).

ruminantium issues de tiques *A. variegatum* (Nakao *et al.* 2011). Cette seconde étude conclut de manière inattendue à une absence de structuration génétique de cet agent pathogène au sein du continent africain.

Nous avons poursuivi ces investigations en complétant l'échantillonnage par le génotypage MLST **(i)** des souches utilisées dans les essais vaccinaux menés au Burkina Faso (qui à l'origine sont des souches de terrain), et **(ii)** d'isolats d'*E. ruminantium* à partir de tiques collectées dans quatre zones béninoises. Au départ, 500 tiques béninoises furent impliquées dans l'étude. Un diagnostic PCR classique fut retenu pour détecter les tiques porteuses de l'agent pathogène. Nous avons retenu sept gènes dans notre étude MLST : *gltA*, *groL*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *sodB* et *sucA*. Nous avons appliqué les protocoles de séquençage précédemment publiés (Adakal *et al.* 2009) pour obtenir le génotype des nouveaux isolats d'*E. ruminantium* et nous avons téléchargé depuis GenBank les génotypes publiés par les deux études précédentes (Adakal *et al.* 2010a; Nakao *et al.* 2011). Ceci nous a donc conduit à construire une base de données de génotypes MLST couvrant le Bénin, le Burkina Faso, la Guadeloupe, le Ghana, le Sénégal, la Zambie, Sao Tomé & Principe, l'Ouganda, l'Afrique du Sud, le Soudan et le Zimbabwe. Nous avons utilisé les logiciels Mega5, SplitsTree4, RDP3, DnaSP5, Arlequin et BioNumeric pour **(i)** aligner les séquences, **(ii)** identifier les événements de recombinaison et de possibles signatures d'épisodes de sélection, **(iii)** réaliser des analyses phylogénétiques, **(iv)** analyser des différenciations génétiques entre des populations de souches et **(v)** déterminer de potentiels pic épidémiques (cf l'article présenté en **Encart N°3** pour détails).

Notre génotypage des souches impliquées dans les essais vaccinaux qui furent pratiqués au Burkina Faso (Adakal *et al.* 2004, 2009, 2010a) révèlent que ces souches présentent généralement les profils alléliques des séquences-types n°23 et n°25 à l'exception de deux isolats définissant les séquences-types n°50 et n°51. On notera que la localisation dans l'arbre 'épidémiologique' (qualifié de '*minimum spanning tree*') des séquences-types n° 23 et n°25 se trouve au cœur du pic épidémique en expansion au Burkina Faso entre 2002 et 2008 (cf la figure 1 de l'article en **Encart N°3**). On notera également que les différences immunologiques entre ces souches qui furent révélées par les essais vaccinaux ne sont absolument pas corrélées avec leurs différences de génotypes MLST. Ainsi, LB479 et BK242, qui appartiennent au génotype « map1-senegal » (Raliniaina *et al.* 2010), se retrouvent toutes deux membres de la séquence-type n°25 alors qu'elles induisent respectivement 33% et 50% de taux de mortalité



quand elles infectent des animaux vaccinés avec les antigènes de la souche Gardel (Adakal *et al.* 2004).

Par ailleurs, en dépit d'un large biais d'échantillonnage en faveur de l'Afrique de l'ouest au sein de notre base de données (N= 70 isolats de cette région *Versus* N= 13 pour l'ensemble des autres régions du continent), nos résultats suggèrent l'existence d'une plus forte diversité génétique d'*E. ruminantium* en Afrique de l'ouest relativement au reste du continent. Ainsi, notre apport de 15 nouveaux génotypes béninois a-t-il résulté en l'apport de 15 profils alléliques inédits dont 14 (93%) étaient porteurs d'allèles nouveaux qui s'avèrent donc spécifiques du Bénin (ou allèles dits 'privés' en génétique des populations). A titre de comparaison, les 49 isolats provenant du Burkina Faso définissent 33 profils alléliques distincts dont 29 (87%) sont porteurs d'allèles spécifiques à ce pays. En revanche, les 12 isolats provenant du sud et de l'est du continent définissent 10 profils alléliques distincts dont seulement 6 (60%) sont porteurs d'allèles non-détectés en Afrique de l'ouest-.

En outre, l'examen de la structuration géographique de génotypes MLST indique l'existence d'une différenciation génétique significative tant au sein de l'Afrique de l'ouest qu'entre cette région et le reste du continent (cf **Encart N°3** pour détails). Des analyses de type AMOVA nous ont permis de confirmer ces hypothèses : l'estimateur Φ_{ST} prend une valeur significativement positive ($P < 0,05$) lorsqu'il est évalué entre échantillons béninois et burkinabè ($\Phi_{ST} = 0.68$) ou entre échantillons d'Afrique de l'ouest et échantillons du reste du continent ($\Phi_{ST} = 0.43$).

Enfin, l'analyse de l'histoire des pressions de sélection subies par les gènes séquencés confirme un attendu pour des gènes de ménage ; à savoir la prédominance de sélection purifiante (cf **Encart N°3** pour détails). De manière complémentaire, nos analyses de signatures d'événements de recombinaison confirment les résultats d'études précédentes sur la place clef de ce type d'événements dans l'histoire évolutive de l'agent pathogène. On notera toutefois que dans notre étude comme dans celle de Nakao *et al.* (2011), les événements de recombinaison les mieux définis sont détectés entre des génotypes circulant actuellement d'une part en Afrique de l'ouest et d'autre part au sud ou à l'est du continent. Cette information couplée à la mise en évidence de différenciation génétique significative ouest/(sud)est entre les populations actuelles d'*E. ruminantium* suggèrent que ces événements de recombinaison eurent lieu dans un passé lointain de l'histoire de l'agent pathogène. De fait, cette différenciation ouest/(sud)est rappelle les signaux de différenciation ouest/est qui furent

préalablement observés tant chez *A. variegatum* (Stachurski *et al.* 2013; Chevillon & Huber 2016) que chez les bovins domestiques (Hanotte *et al.* 2002). Chez les bovins domestiques, Hanotte *et al.* (2002) ont montré que ce signal rendait compte de la complexité de l'histoire de la diffusion des bovins domestiques au sein du continent africain. Chez *A. variegatum*, ce signal peut être interprété comme le résultat du développement de l'élevage bovin par une tique qui réussit à franchir le saut d'espèce d'une espèce sauvage vers ces bovins domestiques au tout début de l'histoire de l'élevage bovin en Afrique (Chevillon & Huber 2016). Il paraîtrait raisonnable -quoique restant à confirmer- d'interpréter le signal de différenciation ouest/est observé chez l'agent pathogène comme résultant de l'expansion de l'aire géographique tant d'*A. variegatum* que des bovins domestiques au sein du continent africain.

Au final, même s'ils confirment l'absence attendue de corrélation entre propriété immunologique et génotypage MLST, nos résultats apportent quelques informations utiles à la compréhension de la circulation d'*E. ruminantium* et au développement de futurs vaccins contre la cowdriose. Ainsi, nos résultats confirment que la circulation épidémiologique de cet agent pathogène se définit à l'échelle locale. Dès lors, notre échantillonnage béninois s'avère probablement trop dispersé sur l'ensemble du pays pour être capable de détecter le phénomène de co-circulation de groupes génotypiques distincts qui fut mis en évidence au Burkina-Faso au sein d'une zone d'environ 200 km² entre 2002 et 2008 (Adakal *et al.* 2009, 2010a). Une autre conséquence de ce premier résultat concerne l'évolution des interactions entre les hôtes et les agents pathogènes : on s'attend à ce que l'évolution de ces interactions - incluant donc celle de la définition des propriétés immunologiques des souches d'agents pathogènes - se définisse également à l'échelle locale. De plus, il est possible que cette diversité antigénique d'*E. ruminantium* soit plus élevée en Afrique de l'ouest que dans le reste du continent.

**Encart N°3 : Biguezoton A, Adakal H, Farougou S, Agbangla C, Chevillon C. Genetic structure of *Ehrlichia ruminantium* based on MLST: particularities of West-Africa within the African continent.
En préparation pour soumission à Infection, Genetics and Evolution.**



1 **Genetic structure of *Ehrlichia ruminantium* based on MLST: particularities of West-**
2 **Africa within the African continent**

3 **Abel Biguezoton** ^{1,2,3,4,*}

4 ***corresponding author**

5 **Email:** babels005@yahoo.fr [mailto:](#)

6 **Hassane Adakal**^{2,4,5}

7 **Email :** hassaneadakal@yahoo.fr

8 **Souaïbou Farougou**³

9 **Email :** farougou@gmail.com

10 **Clément Agbangla**¹

11 **Email :** clement.agbangla@gmail.com

12 **Christine Chevillon**^{4,6}

13 **Email :** christine.chevillon@ird.fr

14 **1 :** Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies, FAST - Université d'Abomey-Calavi, BP 526,
15 Cotonou, Bénin.

16 **2 :** Unité de Recherche sur les bases biologiques de la Lutte Intégrée (URBIO) – Centre
17 International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES) – 559, 3-51
18 Avenue du Gouverneur Louveau, 01 B.P. 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

19 **3 :** Unité de Recherche en Biotechnologie de la Production et de la Santé Animales (URBPSA) –
20 Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, 01 BP
21 2009, Cotonou, Bénin.

22 **4 :** IRD, UR 224 'Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle
23 (MIVEGEC), Montpellier, France.

24 **5:** Current address : Département des Sciences et Techniques de l'Elevage (DSTE/FASE), Université
25 Dan Dicko Dan Koulodo, BP 465 Maradi, Niger.

26 **6 :** CNRS, Université Montpellier, UMR 5290 MIVEGEC, Montpellier, France.

27

28 **Abstract**

29 *Ehrlichia ruminantium* is the tick-borne rickettsia causing heartwater to wild and domestic
30 ruminants. A few years ago, Multilocus Sequence Typing of this pathogen (MLST) highlighted the
31 co-circulation of two genotypic groups within three villages from Burkina Faso where vaccination
32 assays had been recurrently performed along the five years preceding sampling. We genotyped
33 the laboratory strains that had been involved in these vaccination assays. These strains were
34 evidenced to bear multilocus genotypes belonging to the reported epidemic peak. In parallel, we
35 enlarged the study to Beninese localities where no vaccination assays had ever been performed.
36 500 *Amblyomma variegatum* ticks from four Beninese areas were screened for *E. ruminantium*
37 infection and Infected ticks were engaged in MLST sequencing at seven loci. This allowed
38 evidencing a high frequency of new multilocus MLST genotypes in Benin: 93% of the genotypes
39 included at least one allele that has never been detected so far in other geographical regions. This
40 was higher than in Burkina Faso (80 % in Burkina Faso) and far higher than those observed in other
41 African regions (< 60%).
42 Finally investigating the genetic structure of the pathogen among African areas revealed that,
43 relatively to West-Africa, East-Africa and South-Africa are characterized by a reduction of the
44 genetic diversity of *E. ruminantium*. The interest of these results for heartwater control and the
45 understanding of the evolutionary history of the pathogen are discussed.

46

47 **Key words:** MLST analysis, epidemic peak, *Ehrlichia ruminantium*, heartwater, *Amblyomma*
48 *variegatum*, West Africa, vaccine development.

49

50 **1-Introduction**

51 *Ehrlichia ruminantium*, previously known as *Cowdria ruminantium* (Moshkovski, 1947) is a tick-
52 borne rickettsia causing heartwater in domestic (goats, sheep, cattle) and wild (antelopes, giraffes,
53 buffaloes) ruminants(Dumler et al. 2001). This disease induces mortality as high as 80% in
54 susceptible animals (Uilenberg, 1983). As the animals transferred from healthy to enzootic regions
55 are highly susceptible (Adakal et al. 2004), this disease heavily handicaps the genetic amelioration
56 programs of African livestock. Preventing the transmission of *E. ruminantium* revealed to be
57 difficult. Several approaches were explored to control the disease ranging from tick control to
58 vaccination but they all shown their limits.Vector control programs are facing difficulties caused by
59 the three-host life-cycle of the *Amblyomma*, vectors, and their ability to enter in diapause when
60 environmental conditions are not suitable (Barré and Garris, 1990 ; Stachurski et al. 2010) (but see
61 Starchuski and Lancelot 2006 for successful prevention of cattle infestation by *A. variegatum*).
62 Alive vaccine is commercialized in South Africa; it contains blood infected with virulent *E.*
63 *ruminantium* organisms of the Ball 3 isolate (Bezuidenhout, 1989). Antibiotics are applied when
64 fever develops on the animal infected with such alive vaccine. This process has got some
65 disadvantages such as the possibility of transmission of a pathogenic agent that was not circulated
66 before the vaccination trial and that can recombine with field-circulating strains. Alternative
67 vaccination methods has thus been developed such as inactivated (Adakal et al. 2010a; Jongejan,
68 1991; Mahan et al. 1998; Martinez et al. 1994; Totté et al. 1997), attenuated (Zweygarth et al.
69 2005; Zweygarth et al. 2008) and recombinant (Collins et al. 2003; Nyika et al. 1998; Simbi et al.
70 2006). None of them has yet been particularly successful. Whatever the type of vaccine, the
71 results are convincing in controlled conditions (up to 100% according to the type of vaccine), but
72 their efficiency to protect against field strains appeared limited. For example, in South Africa,
73 Collins et al. (2003) recorded 47% (16 out of 34) of survivals animals during field challenge in a

74 heartwater-endemic area (Northern Province) whereas 100% of the vaccinated animals had
75 survived to the challenges with laboratory strains during the pre-test period. These failures are
76 related to the genetic and antigenic diversity of *E. ruminantium* field strains (Adakal, 2002, 2004).
77 This highlighted the alternative choice to engage naturally circulated strains into a vaccination
78 cocktail. In Burkina Faso such a cocktail formed of a locally circulating *E. ruminantium* isolate and
79 the Gardel strain from Guadeloupe (French Caribbean's) raised the protection of sheep against
80 heartwater from 59% to 72% in field situation (Adakal et al. 2010a). This has raised the issue to
81 characterize the geographical scale at which changes and/or diversity in the immune properties of
82 *E. ruminantium* are determined: are co-circulating more or less likely to be heterologous than
83 strains sampled in different regions?

84 The genetic diversity of this pathogen had been characterized using RAPD (Perez et al. 1997), PCR-
85 RFLP (Adakal, 2004) and, more recently, Multilocus Sequence Typing approach (MLST) (Adakal et
86 al. 2009). In 2010, MLST evidenced the co-circulation of two groups of genotypes – including one
87 characteristic of an on-going epidemic peak -within three neighboring villages from Burkina Faso
88 (Adakal et al. 2010b). A year later, based on the same MLST markers, a surprising pattern of
89 apparent absence of genetic structure among *E. ruminantium* isolates from West-, South- and
90 East-Africa was reported (Nakao et al., 2011).

91 The present study as aimed at improving our understanding of these phenomena by enlarging the
92 West-African sampling to one another country (Benin) and to the laboratory strains that had been
93 involved in the assays of inactivated vaccines in Burkina Faso a few years before observing the co-
94 circulation of epidemic and non-epidemic strains. In addition, the possibility of genetic structure
95 within the African continent was investigated by considering all MLST genotyped pathogens
96 contrarily to the non-random genotypes sub-sample performed by Nakao et al (2011).

97 **2-Material and methods**

98 **2.1-*E. ruminantium* stains isolated from 500 *A. variegatum* collected in Benin**

99 500 *A. variegatum* ticks were sampled across four Beninese regions from 2008 to 2010 (Farougou
100 et al. 2012). Collections were carried out in Gogounou, in the North-East, Toucountouna in the
101 North-West, Lema (Dassa-Zoumé) in the center and Ouidah (Pahou) in the south of the country.
102 500 of the sampled ticks were screened for *E. ruminantium* infection using hemi-nested diagnostic
103 PCR (Martinez et al. 2004). This involved 77 ticks from Toucountouna (13, 30, 34 collected in 2008,
104 2009 and 2010, respectively) 121 ticks from Gogounou (9, 53, 59 collected in 2008, 2009 and 2010,
105 respectively), 146 ticks from Lema (4, 64, 78 collected in 2008, 2009 and 2010, respectively) and
106 156 ticks from Ouidah (9, 68, 79 collected in 2008, 2009 and 2010, respectively). Infected ticks
107 were then engaged in MLST analyses to characterize the *E. ruminantium* field isolates.

108

109 **2.2-*E. ruminantium* detection in ticks**

110 The preparation of the samples and the DNA extraction of the ticks were realized using the kit of
111 extraction *illustrated tissue & cells genomicPrep Mini Spin kit* (ref. 28-9042-76 GE Healthcare)
112 according to the supplier's recommendation. Thereafter, hemi-nested PCR targeting the pCS20
113 gene as described by Martinez et al. (2004) was performed to detect *E. ruminantium*. Positive
114 result consists on ~380bp-long and ~279bp-long DNA fragments amplification after the first and
115 second PCR runs respectively (Martinez et al. 2004).

116

117 **2.3-Target loci and MLST nested PCR**

118 Targeting the *gltA*, *groEL*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *sodB* and *sucA* loci, we used the primers and PCR
119 conditions previously described (Adakal et al. 2009). PCR products were then sent for sequencing
120 to *BECKMAN COULTER GENOMICS* (Hope End, Takeley, Essex CM22 6TA, United Kingdom). They
121 were sequenced in both directions in order to reduce the possibilities of misreading and to avoid
122 the mistakes caused by the Taq polymerase during the elongation step of the PCR. For each PCR
123 product, consensus sequence was retrieved using *Vector NTI (Vector NTI Advance10)*.

124 In addition to the *E. ruminantium* isolates from Beninese ticks, the MLST genotyping was
125 performed on isolates that had previously been involved in the inactivated vaccine research in
126 Burkina Faso (Adakal et al. 2010a).

127 **2.4-Complementary MLST genotypes retrieved from past studies**

128 Sequences of target loci from field isolates from South-Africa, Zimbabwe, Zambia, Kenya, Uganda,
129 Sao Tome and Principe, Nigeria, Gambia, Senegal and Burkina Faso available on GenBank
130 (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Nakao et al. 2011; Adakal et al. 2010b) were downloaded to complete
131 our dataset. Strains ERGA and ERWO respectively isolated in Guadeloupe and South Africa were
132 added as references strains (Collins et al 2005, Frutos et al 2006).

133

134 **2.5-Sequence alignment and phylogenetic tree**

135 Multiple alignments of sequences were carried out with *MUSCLE version 3.5* (Robert, 2004)
136 implemented in *MEGA* version 5 (Tamura et al. 2011). Phylogenetic analyses were performed with
137 PhyML (Dereeper et al. 2008) using the concatenated sequences of the seven genes (*gltA-sucA-*
138 *lepA-sodB-lipA-lipB-groEL*). The phylogenetic tree was constructed using Approximate Likelihood-
139 Test (aLRT). Further, concatenated sequences were imported into *SplitTree4 version 4.13.1*

140 software for obtaining preliminary network using the neighbor-net algorithm (Huson and Bryant,
141 2006).

142

143 **2.6-Sequence-type and minimum spanning tree**

144 Let's call sequence-types (ST) the distinct multilocus genotypes, i.e. the allelic profiles that differed
145 from one another by at least one allelic number across the monitored loci. The strain 2_BF_07
146 from Burkina Faso was used as reference (Adakal et al. 2009) for the attribution of allelic numbers
147 and the allelic profiles were obtained using MLSTest *version 1.0.1.17* (Tomasini et al. 2013). It is
148 noteworthy to underline that several strains are sometimes members of a unique ST.

149 All ST members were included in minimum spanning tree (MST) generated using BioNumerics
150 software *version 7.1* (Applied Maths, <http://www.applied-maths.com>). The definition of a
151 partitioning corresponds here to the 'clonal complexes' according to epidemiological terminology
152 (i.e., the group of strains connected to a central ST by at most 2 allelic number across the
153 monitored loci) as defined in eBurst software (Applied Maths, <http://www.applied-maths.com>).

154

155 **2.7-Recombination, Selection, Genetic and population differentiation**

156 PHI test was performed using SplitsTree4 *version 4.13.1* on the concatenated sequences to
157 determine whether recombination events were statistically significant. Then, the evaluation of the
158 recombination events and identification of probable parents was performed with the
159 Recombination Detection Program, RDP3 *version 3.44* (Heath et al. 2006). Concatenated
160 sequences were checked for putative recombinant regions using GeneCov (Padidam et al. 1999),
161 BootScan (Martin et al. 2005), MaxChi (Smith, 1992), Chimaera (Posada, 2001), SiScan (Gibbs et al

2000) and 3Seq (Boni et al. 2007) methods implemented in RDP3. Only one representative sequence (one ST member) was involved in this analysis when sequences were identical. Sequences were grouped by geographical origin for computing Ka/Ks ratios from the values taken by Ka and Ks according to MEGA5 (Tamura et al. 2011). Since strains from Burkina Faso and Benin are largely more numerous than those from others countries, Ka and Ks calculations, as well as some others analyses in this study, were also done taking into account these West African strains separately.

Genetic diversity and genetic differentiation were assessed using DnaSP5 *version 5.10.01* (Librado and Rozas, 2009) for each gene based on the haplotype diversity Hd (Nei, 1987) and Fst estimate from Hudson et al. (1992). These analyses were computed to assess genetic diversity within each group of strains and genetic differentiation between the groups using the seven target loci separately.

Concatenated sequences were finally used to perform Analysis of Molecular Variance (AMOVA) with Arlequin *version 3.5.2.2* (Excoffier and Lischer 2010) in order to assess population differentiation among either West African isolates or between West Africa isolates and isolates from East and South Africa.

178

179 **3-Results**

180 **3.1-*E. ruminantium* strains from Benin: Prevalence and new alleles**

181 54 ticks out of the 500 *A. variegatum* screened were positive to *E. ruminantium* in Benin
182 (Farougou et al. 2012). This global prevalence (10.8%) slightly varied among localities: 8.9%
183 (13/146) at Lema, 10.3% (16/156) at Ouidah, 10.7% (13/121) at Gogounou and 15.6% (12/77) at

184 Touncountouna. These differences were nevertheless not significant ($P > 0.05$) as well those
 185 observed between rainy (11.2%;48/430) and dry seasons (8.6%; 6/70) (Farougou et al. 2012).
 186 It was not possible to amplify all seven monitored loci on each of the 54 infected, sequencing and
 187 MLST analyses were thus performed on 15 isolates. This allowed detecting three alleles at the
 188 locus *lipA*, seven at *gltA*, eight at each of the four loci *lepA*, *sodB*, *lipB* and *groEL*, and ten alleles at
 189 the locus *sucA*. Considering multilocus sequences, the 15 field-isolates defined 15 distinct
 190 sequences-types among which 14 bearing at least one allele that had never been identified in
 191 previous studies (i.e., 'private' alleles; **Additional_file_S1**). For instance, the genotype of the
 192 2789_LeBn_2010 isolate involved private alleles at five of the seven monitored loci (*gltA*, *sucA*,
 193 *lepA*, *sodB* and *groEL*). Altogether the Beninese dataset encompassed some alleles identical to
 194 those previously published and 27 private alleles. These later ones are available in GenBank using
 195 the following accession numbers: KT279417 to KT279420 (*gltA*); KT315518 to KT315525 (*sucA*);
 196 KT315526 to KT315529 (*lepA*); KT315530 to KT315534 (*sodB*); KT315535 to KT315538 (*groEL*) and
 197 KT315539 to KT315541 (*lipB*).

198

199 **3.2-Genetic diversity and differentiation**

200 Haplotypic diversity (H_d) was higher in Benin than in other African regions at three loci (*sucA*, *lipB*,
 201 *groEL*) (**Table 1**). Higher haplotypic diversity relatively to other regions was noticed in West Africa
 202 at the *sodB* and *lipA* loci ($P=0.006$) and in South Africa at the *gltA* and *lepA* Loci (although not
 203 significantly; $P > 0.05$) (**Table1**).

204 The nucleotide diversity π monitored at each of the seven loci was higher in West Africa than in
 205 other regions (**Table2**). Geographical variations in this estimate were significant at *sucA* ($P=0.045$)

206 and *lipA* ($P=0.024$). Considering all sampling regions, *groEL* and *LipA* were the most and least
207 polymorphic loci respectively (**Additional_file_S1**).

208 The frequencies of private alleles and private sequence-types were higher in Benin than in any
209 other region. With only 15 sampled isolates the Beninese dataset provided 14 private out of the
210 15 distinct multilocus sequences (i.e., 15 STs), that is 93% sequence types harboring private alleles.
211 For the sake of comparison, the 49 isolates sampled in Burkina Faso defined 33 sequences-types
212 among which 29 (87%) harbored private alleles. Finally, the 12 isolates sampled in South/East
213 Africa defined ten sequences-types among which only six (50%) harbored private alleles
214 (**Additional_file_S1**).

215 Genetic differentiation per individual locus detected strong genetic differentiation between
216 isolates from Benin and Burkina Faso ($F_{st}>0.30$) at each of the seven monitored loci (**Table 3**).
217 Strong genetic differentiation was also observed at each locus between, on the one hand, the
218 West African isolates, and on the other hand isolates from either East Africa ($F_{st}>0.20$), South
219 Africa ($F_{st}= 0.13-0.38$) or from East- and South Africa ($F_{st}=0.15-0.38$) (**Table 3**). AMOVAs
220 confirmed these patterns at the multilocus level since they concluded to significant differentiation
221 between Benin and Burkina Faso ($P<<0.05$; $\phi_{st} =0.68$) as well as between West-African pathogens
222 and those circulating in East and South Africa ($P<<0.05$; $\phi_{st} =0.43$) (**Table 4**). It is noteworthy that
223 ignoring the strains involved in the epidemic peak detected in Burkina Faso resulted in increasing
224 the genetic differentiation estimated within West Africa (**Table 4**). By contrast, no significant
225 differentiation was detected between South- and East-African pathogens, nor within the isolates
226 circulating either within Benin or Burkina Faso (**Table 4**).

227

228 3.3-Minimum Spanning Tree over all dataset

229 The minimum spanning tree (MST) built from the 83 isolates (i.e., 66 STs) discriminates two
230 genetic groups (**Figure 1**). The first one (group A) is mostly formed of isolates from Burkina Faso
231 including those involved in the 2002-2009 epidemic peak. The ST 25, represented by strain
232 1795_BK_2008, is the predicted founder of this epidemic peak that includes all the laboratory
233 strains that were used in previous vaccination assays (**Figure 1**). The second group (group B) is
234 pan-African since it is formed of isolates sampled in West-, South- and East-Africa. Most of the
235 Beninese isolates (12 out of 15) belonged to group B. The reference strains ERGA (ST 49) and
236 ERWO (ST 54) are related to West African strains from both groups.

237

238 **3.4-Network and Phylogenetic tree**

239 The neighbor-net network detected the same groups A & B previously observed in the MST (**Figure**
240 **2**). Removing of the isolates in the 2002-2009 epidemic peak resulted in an apparent decrease in
241 the between-group genetic distance (**Additional_file_S2**).

242 Phylogenetic trees slightly modified the two groups previously detected in MST or neighbor-net
243 network; these groups are thus referred to as A' and B' hereafter (**Additional_file_S3**). The group
244 A' is composed of the isolates involved in the epidemic peak observed in Burkina Faso (West
245 African I) plus one strain of Ghana (Pokoase_GHA_96) (**Additional_file_S3**). The group B' regroups
246 two clades such as the first regroups only West African isolates while the second is pan-African
247 (including also ERGA and ERWO reference strains **Additional_file_S3**).

248 All Beninese strains are in group B' except 2762_BN_10 (ST 46) (**Figure 1**), which belongs to the
249 epidemic peak in Group A'. West African strains are present in both groups while South-African
250 and East African strains belong only to the pan-African group B'.

251

252 3.5-Recombination and Selection

253 Only recombination events supported by at least three detection methods were considered. This
254 allowed identifying four recombination events within the entire dataset (**Additional_file_S4**). The
255 most likely parental sequences of one recombinant event (event #2) were identified as similar to
256 pathogens sampled in Benin (2332_OdBn_2009) and Burkina Faso (1754_BK_2008). The three
257 other recombinant events were detected in genotypes sampled in West Africa, East Africa and
258 South Africa that were assessed as descending from two West-African parents. For instance, the
259 reference strain ERWO was listed as descending from recombination between one Beninese
260 parent while the other circulated in Burkina Faso.

261 Signatures of positive selection pressure were detected at *gltA*, *sucA*, *lepA*, *groEL* (**Table 5**). This
262 was identified among West African strains excepted for the *lepA* locus at which a signature of
263 positive selection was detected among South African strains.

264

265 4-Discussion

266 4.1-Particular epidemic peak in Burkina Faso

267 The present study failed to detect in Benin a phenomenon similar to the epidemic peak previously
268 reported in Burkina Faso (Adakal et al 2010). This might result from sampling bias given the much
269 lower number of genotyped pathogens considered per Beninese region ($N < 15$) than within three
270 neighboring villages from Burkina Faso (49 multilocus genotypes within $<400 \text{ km}^2$).

271 We addressed the hypothesis that the epidemic peak could have resulted from the vaccination
272 assays previously performed within these villages by genotyping the laboratory strains that had
273 been involved in such assays. It emerged that all these laboratory strains belonged to the epidemic

274 peak lately observed. For instance, the genotype of BK242 strain (2277_BK242) is a member of the
 275 sequence-type #25 which is the predictive founder of the epidemic peak (**Figure 1**). It is
 276 noteworthy that adding the BK242 strain to the Gardel strain in the vaccination cocktail drastically
 277 improved the sheep protection against heartwater under field conditions (Adakal et al. 2010a).
 278 This raises the possibility that the chemical inactivation used to form the vaccination cocktail could
 279 have been incomplete and thus unable to prevent the transmission of the presumably dead
 280 pathogen. However, it is worthy of note that the sequence-type #25 also includes isolates that
 281 circulated elsewhere in West Africa in 1996 (Sankat_GHA_96) and 2001 (Kerr_GAM_01).
 282 Moreover, the sequence-type 23, genetically similar to ST25 and also involved in the epidemic
 283 peak, included the genotype of a pathogen sampled in Senegal in 1981 (Senegal_SEN_81). These
 284 results as well as the presence of a Beninese isolate within the sampling peak (2762_GgBn_2010;
 285 ST46) are congruently pleading for the long co-circulation among West African countries of the
 286 two groups of genotypes that were respectively reported to be epidemic and non-epidemic in
 287 Burkina Faso. Such a long co-circulation of genetically differently pathogens across West Africa
 288 does nevertheless not imply the co-occurrence of epidemic and non-epidemic transmission in
 289 each West African locality. It remains possible that the vaccination campaigns performed in
 290 Burkina Faso has had disturbed the local evolution of *E. ruminantium* that responded to this
 291 environmental stress via the acceleration of accumulation of newly arisen mutations (Frutos et al.
 292 2007; Vachiéry et al. 2008). More extensive sampling campaigns within small areas –coupled or
 293 not with vaccinations campaigns- would be required to definitively settle this point.

294 The tendency for trends for positive selection observed at *gltA*, *sucA*, *lepA*, and *groEL* loci could
 295 explain the high genetic diversity of the strains from Burkina Faso (**Table 5**). Moreover, *groEL* show
 296 the highest ratio Ka/Ks in West Africa, particularly in Burkina Faso. This is likely to indicate that this
 297 locus is implied in various survival mechanisms of *E. ruminantium* (Moran, 1996). This can also

298 indicate that *groEL* polymorphism had played a role in the epidemic peak observed in Burkina
299 Faso.

300

301 **4.2-West Africa: an appropriate area for development and test of vaccine against heartwater**

302 Contrarily to previous analyses (Nakao et al. 2011), the present study evidenced significant
303 differentiation of the *E. ruminantium* MLST genotypes between, on the one hand, West Africa and,
304 on the other hand, the southern and eastern parts of the continent (**Table 3, Table 4**). Moreover,
305 even through the use of private allele frequencies aimed at controlling the uneven sampling sizes
306 among African regions, the present studies highlighted higher genetic diversity of the pathogen in
307 West Africa relatively to other regions.

308 This later result was supported both when considering each locus separately or at the multilocus
309 level. It resulted from the co-occurrence of two genotypic groups in West Africa (referred to as
310 groups A and B or as groups A' and B' in minimum spanning trees and phylogenetic networks) but
311 to the circulation of pathogens from only one of these groups over South and East Africa (i.e., the
312 pan-African groups B and B').

313 Furthermore, the co-circulation of both genotypic groups were evidenced within the same animal
314 in Burkina Faso. One sheep was co-infected by the 1267_BF_08 and 1270_BF_08 genotypes that
315 belonged to the genotypic groups A and B, respectively (**Figure1**). Another sheep was sequentially
316 infected seven months apart by 630_BF_07 (genotypic group B) and then by 1114_BF_08
317 (genotypic group A).

318 Even though this contrast between a high genotypic diversity of *E. ruminantium* within African
319 localities and a low diversity in the southern and eastern parts of the African continent was driven
320 from house-keeping genes, such a result can be useful for vaccine development. One of the

321 studied gene, *groEL*, has been shown to be involved in immune reaction against bacteria such as
322 *Ehrlichia sennetsu* (Hennequin et al. 2001; Zhang et al. 1997) that is phylogenetically close to *E.*
323 *ruminantium*. Interestingly the two genotypic groups A and B evidenced on *E. ruminantium*
324 multilocus genotypes are also supported when only considering the *groEL* locus (data not shown).
325 This pattern was also supported by the individual *lepA* locus that codes for aGTP-binding protein
326 that presumably interacts with the host immune responses.

327 More generally it looks more reasonable to assume that the higher diversity of house-keeping
328 genes detected in West Africa would translate into a higher rather than to a lower diversity in the
329 immune-properties of the pathogen in West Africa. This hypothesis was supported by the
330 increased protection of vaccinated sheep against heartwater that was observed under field
331 conditions at Bekuy and at the neighboring Banankeledaga station when the BK242 isolated
332 (sampled in Bekuy village) had been added to the vaccination cocktail (Adakal et al. 2010a).

333 Altogether, the development of vaccines able to protect sheep against the more genetically
334 diverse West African isolates of *E. ruminantium* seems much more promising than restricting the
335 vaccination development to the least genetically diverse situation of South Africa.

336 It is nonetheless worthy of note that the diversity in immuno-properties and/or virulence is even
337 higher that detected on the monitored house-keeping genes. This as for instance illustrated by the
338 genotypes of BK242 (2277_BF_02; Bekuy) and BM421 (2278_BF_02; Banankeledaga) isolates. Both
339 are members of the same sequence-type in present study (ST25) but induced different level of
340 protection when added to vaccination cocktails: BK242 respectively induced 100% and 50%
341 mortality in control and vaccinated sheep, respectively while BM421 was respectively responsible
342 of 75% and 25% mortality in control and vaccinated sheep (Adakal et al 2010a).

343

344 **4.3-Ehrlichia ruminantium evolution in Africa: parallelism with the history of cattle**
345 **domestication**

346 In this study *E. ruminantium* strains consisted in two genotypic groups that are respectively either
347 restricted to West Africa or present in all parts of the continent. This pattern reminds the pattern
348 observed in the phylogeography of cattle in Africa, and thus to the history of domestic cattle in
349 this continent (Hanotte et al. 2002). Hanotte et al (2002) reported the superposition of three
350 historical steps. The first was the arrival and diffusion of domestic *Bos taurus* cattle across West
351 Africa. The second consisted in the later diffusion of part of these West African *Bos taurus* cattle
352 toward the eastern and southern parts of the African continents. The third one resulted from the
353 apparition of domestic *Bos indicus* in the horn of Africa and the recurrent importations of Asian *B.*
354 *indicus* along the eastern African coast later on, from the frequent hybridization between *B.*
355 *indicus* and *B. taurus* cattle and from the dispersal of these hybrids and imported *B. indicus* toward
356 either the West or the South of the continent. As a result, the present genetic diversity of
357 domestic cattle displays the same contrast between West-Africa and the south-eastern part of the
358 continent (Hanotte et al. 2002) as that presently evidenced in *E. ruminantium*. Interestingly, the
359 same contrast was also observed in the *A. variegatum* tick-vector of *E. ruminantium* (Huber et al.
360 unpublished; Chevillon and Huber in press; Starchurski et al 2013). Overall, the parallelism
361 observed among the genetic diversities of the pathogen, its vector and domestic hosts supports
362 the hypothesis that both the tick and tick-borne pathogens had colonized the African continent via
363 the diffusion of the cattle farming practices with thus the genotypic group A of *E. ruminantium*
364 having dispersed with *B. taurus* hosts toward West Africa while the genotypic group B had diffused
365 toward both West and south Africa with *B. indicus* and/or hybrid cattle races. Interestingly, the
366 signatures of recombination presently evidenced as those previously reported (Nakao et al 2011)
367 involved parental sequences of both genotypic groups A and B. This is likely to indicate that such

368 recombination events occurred very early in the colonization history of the African continent by *E.*
369 *ruminantium*.

370

371 **Additional_file_S1: ST, ST members and gene polymorphism.**

372 **Additional_file_S2: Phylogenetic network based on strains without those included in epidemic**
373 **peak.**

374 **Additional_file_S3: Phylogeny.**

375 **Additional_file_S4: Recombination events.**

376

377 **Competing interests**

378 The authors declare no competing interests.

379

380 **Authors' contribution**

381 AB, HA, SF, CA, CA designed the study. AB performed the tick identification and the molecular
382 work. AB and CC performed data analysis and wrote the manuscript that was later on read and
383 approved by all coauthors.

384

385 **Acknowledgment**

386 This work was funded by UEMOA via the project PACER (Programme d'Appui et de développement
387 des Centres d'Excellence Régionaux) and by Belgium CUD (Commission Universitaire pour le
388 Développement).

389

390

391 **References**

- 392 Adakal H, Gavotte L, Stachurski F, Konkobo Mr, Henri H, Zoungrana S, Huber, K., Vachieri, N.,
393 Martinez, D., Frutos, R., 2010b. Clonal origin of emerging populations of *Ehrlichia*
394 *ruminantium* in Burkina Faso. Gen. Evol. 10, 903-912.
- 395 Adakal, H., Meyer, D., Carasco-Lacombe, C., Pinarello, V., Alle`gre, F., Huber, K., Stachurski,
396 F., Morand, S., Martinez, D., Lefranc,ois, T., Vachieri, N., Frutos, R., 2009. MLST scheme of
397 *Ehrlichia ruminantium*: genomic stasis and recombination in strains from Burkina Faso. Infect.
398 Genet. Evol. 9, 1320–1328.
- 399 Adakal, H., 2002. Study of the antigenic diversity of *Cowdria ruminantium* in the sheep in an area
400 of Burkina Faso for the application of a vaccination. Thesis Vet. Med. Dakar, EISMV n°29.
401 p.107.
- 402 Adakal, H., 2009. Integrative Study of the structuring of the populations of *Ehrlichia ruminantium*
403 in the zone of Békuy, Burkina Faso: application to the formulation of an effective vaccine
404 against the cowdriose. Thesis of doctorate. University Montpellier II. p. 111.
- 405 Adakal, H., Bada-Alambédi, R., Stachurski, F., 2004. Etude de la variabilité antigénique d'*Ehrlichia*
406 *ruminantium* dans la région sud-ouest du Burkina Faso en vue de l'application d'une
407 vaccination. Rev. Afr. San. Prod. Ani. 2(2), 132-137.
- 408 Adakal, H., Stachurski, F., Konkobo, M., Zoungrana, S., Meyer, D.F., Pinarello, V., Aprelon, R.,
409 Marcelino, I., Alves, T.E., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachiéry, N., 2010a Efficiency of
410 inactivated vaccine against heartwater in Burkina Faso: Impact of *Ehrlichia ruminantium*
411 genetic diversity. Vaccine. 28, 4573-4580.
- 412 Adakal. H., 2004. Use of the techniques nested PCR and RFLP for the detection and the genetic
413 characterization of *Ehrlichia ruminantium* in Burkina Faso. DEA of Animal Biology. Dakar,
414 UCAD. p.66.

415 Allsopp, M.T.E.P., Allsopp, B.A., 2007. Extensive genetic recombination occurs in the field between
 416 different genotypes of *Ehrlichia ruminantium*. *Vet. Microbiol.* 124, 58–65.

417 Barré, N., Garris, G., 1990. Biology and ecology of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in the
 418 Caribbean: Implications for a regional eradication program. *Journal of Agricultural*
 419 *Entomology* 7, 1-9.

420 Bezuidenhout, J.D., 1989. Chapter 2: Cowdria vaccines, in: Wright, I.G., (Ed.), *Veterinary Protozoan*
 421 *and Hemoparasite Vaccines*. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, pp. 31–42.

422 Boni, M.F., Posada, D., Feldman, M.W., 2007. An exact nonparametric method for inferring mosaic
 423 structure in sequence triplets. *Genetics*. 176, 1035-1047.

424 Collins, N.E., Liebenberg, J., De Villiers, E.P., Brayton, K.A., Louw, E., Pretorius, A., Faber, F.E., Van
 425 Heerden, H., Josemans, A., Van Kleef, M., Steyn, H.C., van Striip, M.F., Zweggarth, E.,
 426 Jongejan, F., Maillard, J.C., Berthier, D., Botha, M., Joubert, F., Corton, C.H., Thomson, N.R.,
 427 Allsopp, T.M., Allsopp, B.A., 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia*
 428 *ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable number. *Proc. Natl. Acad.*
 429 *Sci. U.S.A.* 102, 838–843.

430 Collins, N.E., Pretorius, A., van Kleef, Mr., Brayton, K.A., Zweggarth, E., Allsopp, B.A., 2003.
 431 Development of Improved Vaccine for Heartwater. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 990, 474-484.

432 Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S.,
 433 Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic
 434 analysis for the non-specialist. *Nuc. Aci. Res.* 1(36), W465-W469.

435 Dumler, J.S., Barbet spaniel, A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Micrometer caliper, G.H., Ray, S.C.,
 436 Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of will genera in the families
 437 *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species
 438 of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*,

439 description of six new species combination and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE
 440 agent" have subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J Syst. Evol. Microbiol. 51,
 441 2145-2165.

442 Excoffier, L., Lischer, H.E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform
 443 population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Res. 10, 564-567.

444 Farougou, S., Adakal, H., Biguezoton, A.S., Boko, C., 2012. Prévalence de l'infection d'*Amblyomma*
 445 *variegatum* par *Ehrlichia ruminantium* dans les élevages extensifs du Bénin. Rev. Méd. Vét.
 446 163(5), 261-266.

447 Frutos, R., Viari, A., Ferraz, C., Morgat, A., Eychenie', S., Kandassamy, Y., Chantal, I., Bensaid, A.,
 448 Coissac, E., Vachiery, N., Demaille, J., Martinez, D., 2006. Comparative genomic analysis of
 449 three strains of *Ehrlichia ruminantium* reveals an active process of genome size plasticity. J.
 450 Bacteriol. 188, 2533–2542.

451 Frutos, R., Viari, A., Vachiéry, N., Boyer, F., Martinez, D., 2007. *Ehrlichia ruminantium*: genomic and
 452 evolutionary features. Trends in Parasitology. 23, 414-419.

453 Gibbs, M.J., Armstrong, J.S., Gibbs, A.J., 2000. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for
 454 assessing signals in recombinant sequences. Bioinformatics. 16, 573-582.

455 Hanotte, O., Bradley, D., Ochieng, J., Verjee, Y., Hill, E., Rege, J., 2002. African pastoralism: genetic
 456 imprints of origins and migrations. Science. 296, 336-339.

457 Heath, L., van der Walt, E., Varsani, A., Martin, D.P., 2006. Recombination patterns in
 458 aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. J Virol. 80, 11827-11832.

459 Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A.J., Collignon, A., Barc, M.C., Bourlioux, P.,
 460 Karjalainen, T., 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence.
 461 Microbiology. 147, 87–96.

462 Hudson, R.R., Slatkin, M., Maddison, W.P., 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA
463 sequence data. *Genetics*. 132, 583-589.

464 Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol.*
465 *Biol. Evol.* 23(2), 254-267.

466 Jongejan, F., 1991. Protective immunity to heartwater (*Cowdria ruminantium* infection) is acquired
467 after vaccination with in vitro attenuated *rickettsiae*. . *Immunol.* 59, 729-731.

468 Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSPv5: software for understanding analysis of DNA polymorphism
469 has dated. *Bioinformatics*. 25, 1451-1452.

470 Mahan, S.M., Kumbula, D., Burrige, M.J., Barbet spaniel, A.F., 1998. The inactivated *Cowdria*
471 *ruminantium* vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against
472 laboratory and field tick challenge. *Vaccinate*. 16, 1203-1211.

473 Martin, D.P., Posada, D., Crandall, K.A., Williamson, C., 2005. A modified bootscan algorithm for
474 automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS*
475 *Res Hum Retroviruses*. 21, 98-102.

476 Martinez, D., Maillard, J.C., Coisine, S., Sheikboudou, C., Bensaid, A., 1994. Protection of goats
477 against heartwater acquired by immunization with inactivated elementary bodies of *cowdria*
478 *ruminantium*. *Vet. Imm. Immunopathol.* 41, 153-163.

479 Martinez, D., Vachiéry, N., Stachurski, F., Kandassamy, Y., Raliniaina, Mr., Aprelon, R., Guèye, A.,
480 2004. Nested- PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*; use in genetic
481 diversity analysis. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 1026, 106-113.

482 Moran, N.A., 1996. Accelerated evolution and Muller' S ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proc.*
483 *Natl. Acad. Sci.* 93, 2873-2878.

484 Moshkovski, S.D., 1947. Comments by readers. *Science*. 106, 62.

485 Nakao, R., Magona, J.W., Zhou L., Jongejan, F., Sugimoto, C., 2011. Multi-locus sequence typing of
 486 *Ehrlichia ruminantium* strains from geographically diverse origins and collected in
 487 *Amblyomma variegatum* from Uganda. Par. Vect. 4, 137-146.

488 Nei, Mr., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. New York, Columbia Univ. Press.

489 Nyika, A., Mahan, S.M., Burrige, M.J., McGuire, T.C., Rurangirwa, F., Barbet spaniel, A.F., 1998. A
 490 DNA vaccinate protects mice against the rickettsial agent *Cowdria ruminantium*. Par.
 491 Immunol. 20, 111-119.

492 Padidam, M., Sawyer, S., Fauquet, C.M., 1999. Possible emergence of new geminiviruses by
 493 frequent recombination. Virology. 265, 218-225.

494 Perez, J.M., Martinez, D., Debus. A., Sheikboudou, C., Bensaid, A., 1997. Detection of genomic
 495 polymorphisms among isolates of the bacterium *cowdria ruminantium* by random amplified
 496 polymorphic DNA and Southern blotting. FEMS Microbiol. Lett. 154, 73-79.

497 Posada, D., 2001. Crandall KA: Evaluation of methods for detecting recombination from DNA
 498 sequences: computer simulations. Proc Natl Acad Sci USA. 98, 13757-13762.

499 Robert, C.E., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
 500 throughput. Nuc. Aci. Res. 32(5), 1792-1797.

501 Simbi, B.H., Bowie, M.V., McGuire, T.C., Barbet spaniel, A.F., Mahan, S.M., 2006 Evaluation of *E*
 502 *ruminantium* Genes in DBA/2 Mice have potential DNA Vaccinates Candidates for
 503 Heartwater control. Ann. N Y. Acad. Sci. 1078, 424-437.

504 Smith, J.M., 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. J Mol Evol, 34, 126-129.

505 Stachurski, F., Lancelot, R., 2006. Foot-bath acaricide treatment to control cattle infestation by the
 506 tick *Amblyomma variegatum*. Med. Vet. Entomol. 20, 402-412.

507 Stachurski, F., Zoungrana, S., Konkobo, M., 2010. Moulting and survival of *Amblyomma variegatum*
508 (Acari: Ixodidae) nymphs in quasi-natural conditions in Burkina Faso; tick predators as
509 an important limiting factor. *Exp. App. Acarol.* 52, 363-376.

510 Stachurski F, Tortosa P, Rahajarison P *et al.* (2013) New data regarding distribution of cattle ticks in
511 the south-western Indian Ocean islands. *Veterinary Research*, **44**, 79.

512 Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular
513 Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and
514 Maximum Parsimony Method. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.

515 Tomasini, N., Lauthier, J.J., Llewellyn, M.S., Diosque, P., 2013. MLSTest: novel software for Multi-
516 Locus sequence data analysis in Eukaryotic organisms. *Inf. Gen. Evol.* 20, 188-196.

517 Totté, P., McKeever, D., Martinez, D., Bensaid, A., 1997. Analysis of T-cell responses in cattle
518 immunised against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of *Cowdria*
519 *ruminantium*. . *Immunol.* 65, 236-241.

520 Uilenberg, G., 1983. Heartwater (*Cowdria ruminantium* infection): current status. *Adv. Vet. Sci.*
521 *Comp. Med.* 27:427-80.

522 Vachiéry, N., Maganga, G., Lefrançois, T., Kandassamy, Y., Stachurski, F., Adakal, H., Ferraz C.,
523 Morgat A., Bensaïd A., Coissac E., Boyer F., Demaille J., Viari A., Martinez D., Frutos R., 2008.
524 Differential strain-specific diagnosis of the heartwater agent: *Ehrlichia ruminantium*. . *Gen.*
525 *Evol.* 8, 459-466.

526 Zhang, Y., Ohashi, N., Lee, E.H., Tamura, A., Rikihisa, Y., 1997. *Ehrlichia sennetsu* groE operon and
527 antigenic properties of the groEL homolog. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 18, 39-46.

528 Zweggarth, E., Josemans, A.I., Steyn, H.C., 2008. Experimental use of the attenuated *Ehrlichia*
529 *ruminantium* (Welgevonden) vaccinates in Merino sheep and Angora goats. *Vaccinate.* 26S,
530 G34-G39.

531 Zwegarth, E., Josemans, A.I., Van Strijp, F.M., Lopez-Rebollar, L., Van Kleef, Mr., Allsopp, B.A.,
532 2005. An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccinate protects small
533 ruminant against virulent heartwater challenge. *Vaccinate*. 23, 1695-1702.
534

535 **Figure1. Minimum spanning tree based on allelic profiles.** Each circle represents one sequence-
536 type; i.e. a unique allelic profile over the seven housekeeping genes considered. Circle sizes are
537 proportional to the number of samples sharing the same allelic profile. Figures refer to the
538 sampling ID defined in Additional file_S1. The distance between two connected circles is
539 proportional to the number of loci differing between the two allelic profiles. Colors refer to the
540 sampling geography as follows. The samples we collected in Benin appear in light-blue; those
541 collected in Burkina Faso and other West-African countries (Senegal, Ghana, Nigeria, and Gambia)
542 appear in dark-blue or green, respectively. Samples from South-African countries (Republic of
543 South Africa, Zimbabwe, and Zambia) or East-African countries (Uganda and Sudan) appear in grey
544 and orange, respectively. Samples from the Carribean's (Guadeloupe, Sao Tome and Principe)
545 appear in red.

546

547 **Figure2: Phylogenetic network.** The differences between samples are measured in base-pair
548 differences among the concatenated sequences. The sampling geography is color-coded as
549 defined in Figure 1. The figures used as sample-ID are defined in the Additional_file_S1. Strains
550 from Benin represented by light-blue circles are followed by their ST numbers.

551

552

Table1: Haplotype diversity. Significantly higher Hd values appear in bold characters (P=0.006).

Area	<i>gltA</i>	<i>sucA</i>	<i>lepA</i>	<i>sodB**</i>	<i>lipA**</i>	<i>lipB</i>	<i>groEL</i>
Benin	0.724	0.924	0.790	0.733	0.514	0.876	0.790
Burkina Faso	0.635	0.649	0.766	0.756	0.584	0.698	0.656
West Africa	0.737	0.787	0.878	0.801	0.652	0.829	0.754
South Africa	0.933	0.733	0.933	0.600	0.600	0.733	0.733
East Africa	0.500	0.500	0.500	0.000	0.000	0.833	0.667
All	0.771	0.839	0.881	0.781	0.658	0.865	0.797

Table2: Nucleotide diversity. Significant differences in π values among areas were noticed at *sucA* (P=0.045) and *lipA* (P=0.024) loci.

Area	<i>gltA</i>	<i>sucA</i> *	<i>lepA</i>	<i>sodB</i>	<i>lipA</i> *	<i>lipB</i>	<i>groEL</i>
Benin	0.00897	0.01328	0.00970	0.00466	0.00318	0.01176	0.00857
Burkina Faso	0.01174	0.01391	0.00642	0.00623	0.00798	0.01689	0.01578
West Africa	0.01401	0.01641	0.00905	0.00661	0.00852	0.01851	0.01595
South Africa	0.00557	0.00283	0.00421	0.00161	0.00802	0.00521	0.00418
East Africa	0.00127	0.00249	0.00105	0.00000	0.00000	0.00838	0.00597
All	0.01370	0.01575	0.00894	0.00609	0.00858	0.01776	0.01510

Table 3: Genetic differentiation (Fst). Subsets within West Africa (using strains from Benin and Burkina Faso) and between West Africa and East/South Africa were used.

Subsets	<i>gltA</i>	<i>sucA</i>	<i>lepA</i>	<i>sodB</i>	<i>lipA</i>	<i>lipB</i>	<i>groEL</i>
BENIN/BURKINA FASO	0.417	0.330	0.356	0.293	0.461	0.343	0.325
BENIN/EAST AFRICA	0.014	0.222	0.082	0.033	0.095	0.000	0.262
BENIN/SOUTH AFRICA	0.130	0.167	0.145	0.017	0.061	0.023	0.000
BURKINA FASO/EAST AFRICA	0.584	0.590	0.624	0.502	0.600	0.411	0.308
BURKINA FASO/SOUTH AFRICA	0.539	0.533	0.366	0.445	0.361	0.471	0.437
WEST AFRICA/EAST AFRICA &SOUTH AFRICA	0.377	0.383	0.155	0.319	0.262	0.318	0.227
WEST AFRICA/EAST AFRICA	0.393	0.435	0.388	0.350	0.419	0.242	0.215
WEST AFRICA/SOUTH AFRICA	0.379	0.365	0.130	0.302	0.204	0.302	0.297
SOUTH AFRICA/EAST AFRICA	0.100	0.200	0.483	0.000	0.089	0.000	0.284

Table 4: Analysis of Molecular Variance (AMOVA). Populations ID are as follow: BF: Burkina Faso; BF_epidemicP: Strains from Burkina Faso which belong to the epidemic peak; BF_Others: Strains from Burkina Faso which are not included in the epidemic peak; BUR: Burkina Faso (It refers to one strain from Burkina Faso which sequences were downloaded on GenBank); BK: Bekuy; BN: Benin; EA: East Africa; LB: Lamba; SA: South Africa; SR: Sara; WA: West Africa. *Pvalue of Variance: among groups, among populations within groups, within populations are the same for Φ_{CT} , Φ_{ST} and Φ_{SC} respectively.

Subsets	Groups	Populations	Size	Scale (Source of variation)	Sum of squares	Variance components	P-value*	%Variation	Φ_{SC}	Φ_{ST}	Φ_{CT}
I	West Africa	BF	49	Among groups	149.04	3.846	0.42	17.68	0.30	0.43	0.18
		BN	15	Among populations within groups	242.65	5.402	0.00	24.83			
	East&South Africa	Others_WA	6	Within populations	963.01	12.507	0.00	57.49			
		SA	6								
		EA	6								
II	West Africa	BF_epidemicP	34	Among groups	149.04	2.079	0.47	9.84	0.61	0.65	0.10
		Others_BF	15	Among populations within groups	637.80	11.570	0.00	54.78			
	East&South Africa	BN	15	Within populations	567.86	7.472	0.00	35.38			
		Others_WA	6								
		SA	6								
III	West Africa	Others_BF	15	Among groups	28.44	0.051	0.30	0.41	0.18	0.18	0.00
		BN	15	Among populations within groups	93.36	2.213	0.00	17.91			
	East&South Africa	Others_WA	6	Within populations	434.03	10.094	0.00	81.68			
		SA	6								
		EA	6								
IV	Others_BF	BK+SR+BUR	7	Among groups	75.86	2.116	0.13	14.97	0.03	0.17	0.15
		LB	8	Among populations within groups	28.21	0.344	0.08	2.44			
	BN	BN_North	5	Within populations	361.82	11.672	0.00	82.59			
		BN_South	10								
	Others_WA	Others_WA	6								
V	BN	BN_North	5	Among groups	221.21	1.192	0.68	5.24	0.67	0.68	0.05
		BN_South	10	Among populations within groups	409.39	14.372	0.00	63.13			
	BF	BF_epidemicP	34	Within populations	432.12	7.202	0.00	31.64			
		Others_BF	15								
	BN_North	BN_North1	3	Among groups	14.23	0.119	0.33	0.96	0.03	0.04	0.01
VI	BN_North	BN_North2	2	Among populations within groups	26.57	0.419	0.33	3.37			
		BN_South1	7	Within populations	130.93	11.903	0.26	95.67			
	BN_South	BN_South2	3								
		BF_epidemicP1	17	Among groups	395.15	18.551	0.34	75.58	0.05	0.77	0.76
	BF_epidemicP	BF_epidemicP2	17	Among populations within groups	19.10	0.316	0.08	1.29			
VII	Others_BF	BK+SR+BUR	7	Within populations	255.53	5.678	0.00	23.13			
		LB	8								
	South Africa	SA1	3	Among groups	17.50	2.028	0.33	30.8	0.09	0.37	0.31
		SA2	3	Among populations within groups	10.67	0.389	0.25	5.91			
	East Africa	EA1	3	Within populations	33.33	4.167	0.01	63.29			
		EA2	3								

Table 5: Selection pressure analysis. The values taken by Ka and Ks were computed with MEGA5.

The strains from Benin, Burkina Faso, Ghana, Senegal and Nigeria are regrouped as West African strains. Those from the Republic of South Africa, Zimbabwe and Zambia are regrouped as South African strains. Isolates from Uganda and Sudan are regrouped as Eastern African strains. The isolates from the Caribbean's are regrouped as being of 'other' origin.

Locus	Areas	Ka	Ks	Ka/Ks
<i>GltA</i>	All	0.019	0.008	2.38
	Benin	0.012	0.005	2.40
	Burkina Faso	0.016	0.008	2.00
	West Africa	0.019	0.009	2.11
	South Africa	0.009	0.000	-
	East Africa	0.002	0.000	-
	Others	0.016	0.007	2.29
<i>sucA</i>	All	0.016	0.017	0.94
	Benin	0.013	0.015	0.87
	Burkina Faso	0.015	0.014	1.07
	West Africa	0.017	0.017	1.00
	South Africa	0.002	0.007	0.29
	East Africa	0.002	0.006	0.33
	Others	0.002	0.000	-
<i>lepA</i>	All	0.011	0.006	1.83
	Benin	0.009	0.009	1.00
	Burkina Faso	0.007	0.005	1.40
	West Africa	0.011	0.006	1.83
	South Africa	0.005	0.004	1.25
	East Africa	0.002	0.000	-
	Others	0.005	0.006	0.83
<i>sodB</i>	All	0.002	0.008	0.25
	Benin	0.004	0.005	0.80
	Burkina Faso	0.002	0.008	0.25
	West Africa	0.002	0.008	0.25
	South Africa	0.002	0.000	-
	East Africa	0.000	0.000	-
	Others	0.000	0.006	0.00
<i>lipA</i>	All	0.005	0.02	0.25
	Benin	0.001	0.012	0.08

<i>lipB</i>	Burkina Faso	0.004	0.019	0.21
	West Africa	0.005	0.021	0.24
	South Africa	0.007	0.015	0.47
	East Africa	0.000	0.000	-
	Others	0.002	0.000	-
	All	0.008	0.054	0.15
	Benin	0.003	0.045	0.07
	Burkina Faso	0.009	0.045	0.20
	West Africa	0.009	0.055	0.16
	South Africa	0.000	0.014	0.00
<i>groEL</i>	East Africa	0.000	0.039	0.00
	Others	0.000	0.051	0.00
	All	0.019	0.002	9.5
	Benin	0.009	0.002	4.5
	Burkina Faso	0.020	0.002	10
	West Africa	0.019	0.002	9.5
	South Africa	0.004	0.000	-
	East Africa	0.007	0.000	-
	Others	0.017	0.000	-

Figure 1

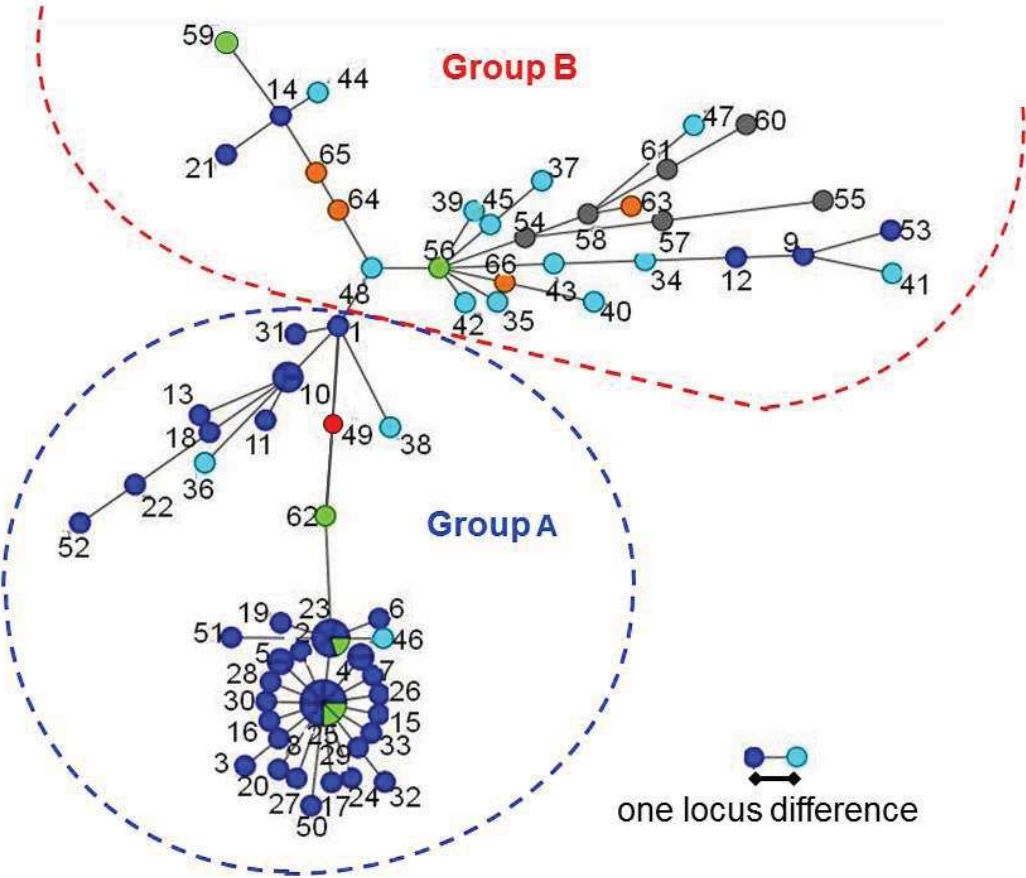
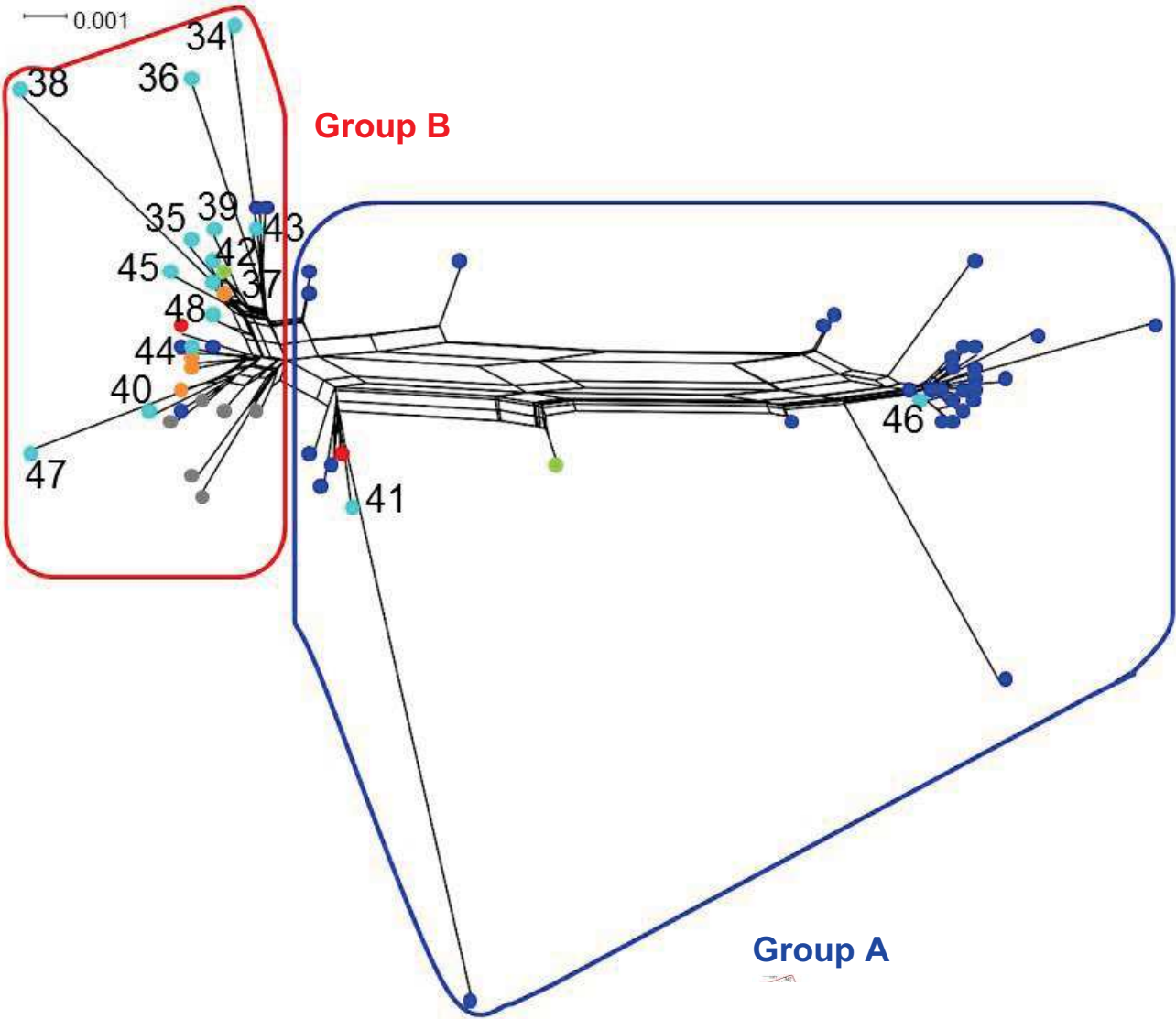


Figure 2



Additional-file S1- Sampling description. The present study is based on the analysis of 83 Ehrlichia ruminantium strains with available sequences at the hsp70 genes *Gita* , *Suca* , *LepA* , *SodB* , *LipA* , *LipB* and *GroEL* : 26 newly genotyped (N = 15 and N=11 sampled in Benin and Burkina Faso, respectively) and 57 strains previously described. They are ranked according to their region of sampling; the ranking order is indicated for facilitating cross-referencing with the sheet 'ST-allelic composition'. The sampling details (country, site and date of sampling; reference of the description study) are indicated along with the labels presently used (strain name, label used in phylogeny, ID number of the sequence type used in minimum spanning tree). We refer to as 'ST size' the number of isolates sharing the same 'sequence type' (i.e., the same concatenated sequence). Whenever one ST was sampled more than once, its sampling composition is described under 'ST composition' at the line corresponding to its first apparition.

Region	rank order	Country	Site	Date	strain name	Phylogenetic label	Sequence Type (ST)	ST size (N)	ST composition	description study
West Africa	1	Benin	Ouidah	03/12/2008	2207-OuBn	2207_BN_08	34	1		present study
	2	Benin	Ouidah	03/12/2008	2209_OuBn	2209_BN_08	35	1		present study
	3	Benin	Lema	02/11/2009	2234_LeBn	2234_BN_09	36	1		present study
	4	Benin	Gogounou	03/10/2009	2313_GgBn	2313_BN_09	37	1		present study
	5	Benin	Ouidah	01/09/2009	2332_OuBn	2332_BN_09	38	1		present study
	6	Benin	Ouidah	01/09/2009	2352_OuBn	2352_BN_09	39	1		present study
	7	Benin	Ouidah	01/09/2009	2378_OuBn	2378_BN_09	40	1		present study
	8	Benin	Toucoutouna	04/12/2009	2396_TcBn	2396_BN_09	41	1		present study
	9	Benin	Toucoutouna	04/12/2009	2400_TcBn	2400_BN_09	42	1		present study
	10	Benin	Toucoutouna	04/12/2009	2405_TcBn	2405_BN_09	43	1		present study
	11	Benin	Ouidah	03/10/2009	2452_OuBn	2452_BN_09	44	1		present study
	12	Benin	Ouidah	05/06/2010	2737_OuBn	2737_BN_10	45	1		present study
	13	Benin	Gogounou	06/08/2010	2762_GgBn	2762_BN_10	46	1		present study
	14	Benin	Lema	06/08/2010	2789_LeBn	2789_BN_10	47	1		present study
	15	Benin	Lema	06/08/2010	2802-LeBn	2802_BN_10	48	1		present study
	16	Burkina Faso	Bekuy	2002	2277_Bk242	2277_BF_02	25	8	Ghana 1996 + Gambia 2001 + BF from 2001 to 2008 (GHA_96; GAM_01; 2279_BF_01; 2277_BF_02; 2278_BF_02; 2284_BF_02; 2281_BF_03; 1795_BF_08)	present study
					2277_Bk242				named Békuy 242 in vaccine experiment; used in vaccine cocktail and in infection challenge	Adakal et al. 2010. Vaccine 4573-4580
	17	Burkina Faso	Bankouma	2002	2278_BM421	2278_BF_02	25	cf 2277_BF_02	cf 2277_BF_02	present study
					2278_BM421				named Bankouma 421 in vaccine experiment; used in infection challenge	Adakal et al. 2010. Vaccine 4573-4580
	18	Burkina Faso	Bekuy	2001	2279_BK255	2279_BF_01	25	cf 2277_BF_02	cf 2277_BF_02	present study
					2279_BK255				named Békuy 255 in vaccine experiment; used in infection challenge	Adakal et al. 2004. RASPA 2: 132-137
	19	Burkina Faso	Bekuy	2003	2281_BK433S	2281_BF_03	25	cf 2277_BF_02	cf 2277_BF_02	present study
					2281_BK433S				named BK433S in vaccine experiment; used in vaccine cocktail	CIRDES & ITC 2005. Final PROCORDEL project report. 261p
	20	Burkina Faso	Sara	2002	2282_SR445	2282_BF_02	23	5	Senegal 1981 + two localities in BF from 2002 to 2008 (SEN_1981; 2282_BF_02; 2283_BF_02; 1270_BF_08; 1946_BF_08)	present study
					2282_SR445				named Sara 445 in vaccine experiment; used in infection challenge	Adakal et al. 2010. Vaccine 4573-4580
	21	Burkina Faso	Sara	2002	2283_SR292	2283_BF_02	23	cf 2282_BF_02	cf 2282_BF_02	present study
					2283_SR292				named Sara 292 in vaccine experiment; used in infection challenge	Adakal et al. 2010. Vaccine 4573-4580
	22	Burkina Faso	Lamba	2002	2284_LB479	2284_BF_02	25	cf 2277_BF_02	cf 2277_BF_02	present study
					2284_LB479				named Lamba 479 in vaccine experiment; used in infection challenge	Adakal et al. 2010. Vaccine 4573-4580
	23	Burkina Faso	na	2003	2280_E008	2280_BF_03	50	1		present study
					2280_E008				used in vaccine experiment during infection challenge	CIRDES & ITC 2005. Final PROCORDEL project report. 261p
	24	Burkina Faso	Bekuy	2003	2285_BK433S	2285_BF_03	51	1		present study
					2285_BK433S				named BK433S in vaccine experiment; used in vaccine cocktail	CIRDES & ITC 2005. Final PROCORDEL project report. 261p
	25	Burkina Faso	Bekuy	28/06/2007	1028_BK	1028_BF_07	52	1		present study
	26	Burkina Faso	Lamba	30/05/2007	1053_LB	1053_BF_07	53			present study
	27	Burkina Faso	Bekuy	28/06/2007	2_BK	2_BF_07	1	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	28	Burkina Faso	Sara	28/06/2007	19_SR	19_BF_07	2	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	29	Burkina Faso	Bekuy	28/06/2007	331_BK	331_BF_07	3	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	30	Burkina Faso	Lamba	15/10/2007	395_LB	395_BF_07	4	2	BF: two localities in 2007 (395_BF_07; 476_BF_07)	Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	31	Burkina Faso	Bekuy	15/11/2007	461_BK	461_BF_07	5	2	BF: one locality in 2007 (461_BF_07; 474_BF_07)	Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	32	Burkina Faso	Bekuy	15/11/2007	463_BK	463_BF_07	6	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	33	Burkina Faso	Bekuy	15/11/2007	466_BK	466_BF_07	7	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	34	Burkina Faso	Bekuy	15/11/2007	469_BK	469_BF_07	8	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	35	Burkina Faso	Bekuy	15/11/2007	474_BK	474_BF_07	5	cf 461_BF_07	cf 461_BF_07	Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912

	36	Burkina Faso	Bekuy	15/11/2007	476_BK	476_BF_07	4	cf 395_BF_07	cf 395_BF_07	Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	37	Burkina Faso	Lamba	15/10/2007	623_LB	623_BF_07	9	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	38	Burkina Faso	Lamba	15/10/2007	629_LB	629_BF_07	10	3	BF: 1997 & twice in 2007 within the same locality (BF_97; 629_BF_07; 635_BF_07)	Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	39	Burkina Faso	Lamba	15/10/2007	630_LB	630_BF_07	11	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	40	Burkina Faso	Lamba	15/10/2007	631_LB	631_BF_07	12	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	41	Burkina Faso	Lamba	15/10/2007	635_LB	635_BF_07	10	cf 629_BF_07	cf 629_BF_07	Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	42	Burkina Faso	Sara	15/10/2007	668_SR	668_BF_07	13	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	43	Burkina Faso	Bekuy	15/11/2007	708_BK	708_BF_07	14	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	44	Burkina Faso	Sara	15/11/2007	810_SR	810_BF_07	15	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	45	Burkina Faso	Sara	14/12/2007	891_SR	891_BF_07	16	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	46	Burkina Faso	Sara	14/12/2007	903_SR	903_BF_07	17	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	47	Burkina Faso	Lamba	30/05/2007	1062_LB	1062_BF_07	18	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	48	Burkina Faso	Lamba	31/05/2008	1114_LB	1114_BF_08	19	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	49	Burkina Faso	Bekuy	30/06/2008	1210_BK	1210_BF_08	20	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	50	Burkina Faso	Bekuy	30/06/2008	1232_BK	1232_BF_08	21	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	51	Burkina Faso	Lamba	02/07/2008	1267_LB	1267_BF_08	22	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	52	Burkina Faso	Lamba	02/07/2008	1270_LB	1270_BF_08	23	cf 2282_BF_02	cf 2282_BF_02	Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	53	Burkina Faso	Bekuy	17/11/2008	1754_BK	1754_BF_08	24	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	54	Burkina Faso	Bekuy	17/11/2008	1795_BK	1795_BF_08	25	cf 2277_BF_02	cf 2277_BF_02	Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	55	Burkina Faso	Bekuy	17/11/2008	1796_BK	1796_BF_08	26	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	56	Burkina Faso	Bekuy	17/11/2008	1798_BK	1798_BF_08	27	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	57	Burkina Faso	Bekuy	17/11/2008	1799_BK	1799_BF_08	28	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	58	Burkina Faso	Sara	17/11/2008	1905_SR	1905_BF_08	29	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	59	Burkina Faso	Sara	17/11/2008	1946_SR	1946_BF_08	23	cf 2282_BF_02	cf 2282_BF_02	Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	60	Burkina Faso	Sara	17/11/2008	1948_SR	1948_BF_08	30	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	61	Burkina Faso	Sara	17/11/2008	1951_SR	1951_BF_08	31	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	62	Burkina Faso	Sara	15/12/2008	2165_SR	2165_BF_08	32	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	63	Burkina Faso	Lamba	17/12/2008	2185_LB	2185_BF_08	33	1		Adakal et al 2010. Infect. Genet. Evol. 10, 903–912
	64	Burkina Faso	na	1997	Burkina_Faso_BUR	BF_97	10	cf 629_BF_07	cf 629_BF_07	Jongejan (unpublished data); Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	65	Nigeria	Ife	1983	Ife_Nigeria_NIG	NIG_83	56	1		Ilemobade and Blotkamp 1978; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	66	Gambia	Kerr Seringe	2001	Kerr_Seringe_GAM	GAM_01	25	cf 2277_BF_02	cf 2277_BF_02	Faburay et al. 2005; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	67	Sao Tome & Principe	na	1981	Sao_Tome_SAP	SAP_81	59	1		Uilenberg et al. 1982; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	68	Ghana	na	1996	Pokoase_GHA	P_GHA_96	62	1		Bell-Sakyi et al. 1997; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	69	Ghana	na	1996	Sankat_GHA	S_GHA_96	25	cf 2277_BF_02	cf 2277_BF_02	Bell-Sakyi et al. 1997; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	70	Senegal	na	1981	SEN_81	SEN_81	23	cf 2282_BF_02	cf 2282_BF_02	Jongejan et al. 1988; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
West Indies	71	France, West Indies	Guadeloupe	1982	ERGA	ERGA_82	49	1		Uilenberg et al. 1984
South Africa	72	Rep. South Africa	Transvaal	1985	ERWO	ERWO_85	54	1		Du Plessis 1985
	73	Rep. South Africa	na	<1981	Kwanyanga_RSA	K_RSA_81	57	1		McHardy & Mackenzie. 1981; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	74	Rep. South Africa	na	1979	Zeerust_RSA	Z_RSA_79	60	1		Jongejan et al. 1980; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	75	Rep. South Africa	Transvaal	<1952	Ball3_RSA	B_RSA_52	61	1		Haig. 1952. Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	76	Zambia	na	1986	Lutale_ZAM	ZAM_86	58	1		Jongejan et al. 1988; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	77	Zimbabwe	na	1990	Crystal_Springs_ZIM	ZIM_90	55	1		Byrom et al. 1991; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
East Africa	78	Sudan	na	1981	Umbainein_SUD	SUD_81	63	1		Jongejan et al. 1984; Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	79	Uganda	Amuria	2008-2009	A004_UGA	A4_UGA_08-09	64	3	Two localities in 2008-2009: Amuria (A4_UGA_08-09; A6_UGA_08-09 BF) and Tororo (T9_UGA_08-09)	Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	80	Uganda	Amuria	2008-2009	A006_UGA	A6_UGA_08-09	64	Cf A4_UGA_08-09	Cf A4_UGA_08-09	Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	81	Uganda	Pallisa	2008-2009	P003_UGA	P3_UGA_08-09	65	1		Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	82	Uganda	Soroti	2008-2009	S013_UGA	S13_UGA_08-09	66	1		Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146
	83	Uganda	Tororo	2008-2009	T009-UGA	T9_UGA_08-09	64	Cf A4_UGA_08-09	Cf A4_UGA_08-09	Nakao et al. 2009. Par. Vect. 4, 137-146

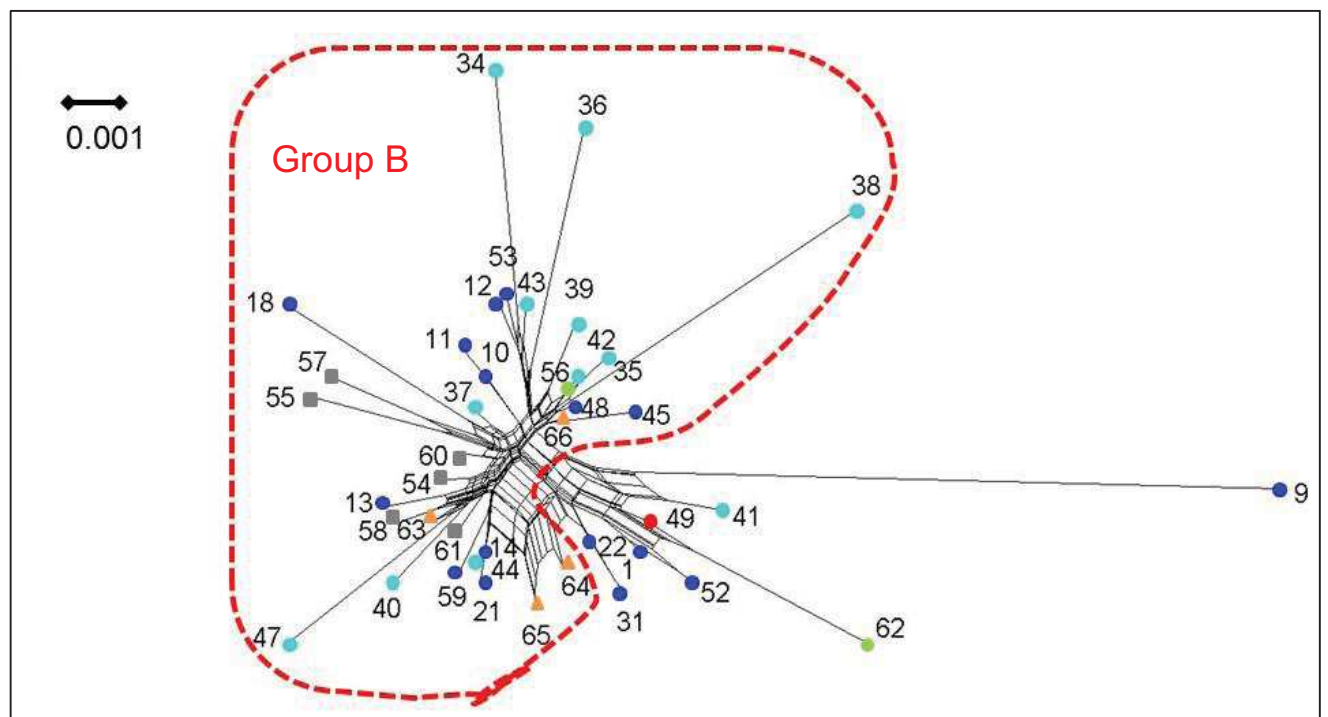
Addition file S1- Allelic composition and sampling characteristics of the 66 STs. For each geographical area considered, are recalled the number of isolates, the number of distinct STs, the total number of alleles per locus and that of the alleles specific to the area considered. The allelic composition of each ST across the seven loci considered is detailed. In order to facilitate the cross-referencing with the sheet 'sampling description', the sampling characteristics of the STs are recalled as defined in the 'sampling description table' (rank order, phylogenetic label, ST-ID, ST-size and ST-composition). Framed characters indicate which alleles are specific to a geographical sub-division (i.e., Benin, Burkina Faso, other west-African countries, South Africa or East Africa).

Geographical area	rank order	Phylogenetic label	Sequence Type (ST)	ST size (N)	ST composition	alleles number per locus	GltA	SucA	LepA	SodB	LipA	LipB	GroEL
West Africa: 70 isolates defining 53 STs specific to this area						total:	10	16	23	15	7	15	12
						specific to this area:	9	15	20	15	7	13	10
						haplotype diversity (Hd)	0.719	0.712	0.775	0.729	0.619	0.754	0.684
						nucleotide diversity (Pi)	0.013	0.016	0.008	0.006	0.008	0.017	0.014
						typing efficiency (TE)	0.323	0.444	0.442	0.833	0.778	0.385	0.179
						discriminatory power (D)	0.727	0.72	0.781	0.736	0.629	0.761	0.693
Benin: 15 isolates defining 15 STs specific to Benin (14 STs include new specific alleles)						total:	7	10	8	8	3	8	8
						specific to this area:	4	8	5	5	0	3	4
						haplotype diversity	0.724	0.924	0.79	0.733	0.514	0.876	0.79
						nucleotide diversity	0.009	0.013	0.01	0.005	0.003	0.012	0.009
						typing efficiency	0.28	0.345	0.242	0.727	0.5	0.5	0.444
						discriminatory power	0.758	0.933	0.817	0.767	0.575	0.892	0.817
	1	2207_BN_08	34	1			5	9	16	3	3	3	5
	2	2209_BN_08	35	1			6	1	8	10	1	1	5
	3	2234_BN_09	36	1			1	10	17	1	3	4	6
	4	2313_BN_09	37	1			1	11	8	1	1	6	5
	5	2332_BN_09	38	1			1	12	18	11	1	1	7
	6	2352_BN_09	39	1			7	1	19	1	1	4	5
	7	2378_BN_09	40	1			1	13	8	12	1	10	3
	8	2396_BN_09	41	1			1	3	8	13	3	11	1
	9	2400_BN_09	42	1			7	1	8	1	1	1	8
	10	2405_BN_09	43	1			8	9	8	1	3	3	5
	11	2452_BN_09	44	1			1	3	11	1	1	12	3
	12	2737_BN_10	45	1			1	14	8	1	1	1	5
	13	2762_BN_10	46	1			3	2	1	2	2	13	2
	14	2789_BN_10	47	1			9	15	20	14	1	10	9
	15	2802_BN_10	48	1			1	1	11	1	1	1	5
Burkina Faso: 49 isolates corresponding to 35 ST (33 specific to Burkina Faso & two sampled elsewhere in West Africa; 29 STs include some allele(s) specific to Burkina Faso)						total:	5	9	17	10	6	10	8
						specific to this area:	2	6	14	7	3	4	4
						haplotype diversity	0.628	0.578	0.674	0.669	0.521	0.616	0.579
						nucleotide diversity	0.011	0.013	0.005	0.005	0.007	0.015	0.013
						typing efficiency	0.312	0.409	0.708	0.769	0.75	0.278	0.136
						discriminatory power	0.643	0.595	0.687	0.682	0.54	0.632	0.596

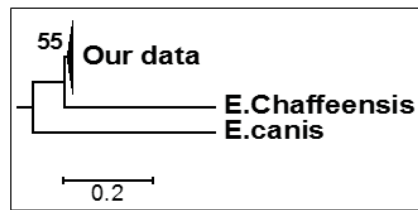
		16	2277_BF_02	25	8	Ghana 1996 + Gambia 2001 + BF 2001-to-08 (S_GHA_96; GAM_01; 2279_BF_01; 2277_BF_02; 2278_BF_02; 2284_BF_02; 2281_BF_03; 1795_BF_08)		2	2	1	2	2	2	2
		20	1270_BF_08	23	5	Senegal 1981 + two BF localities (SEN_1981; 2282_BF_02; 2283_BF_03; 1270_BF_08; 1946_BF_08)		3	2	1	2	2	2	2
		23	2280_BF_03	50	1			2	2	21	2	2	15	10
		24	2285_BF_03	51	1			3	16	1	15	2	2	11
		25	1028_BF_07	52	1			10	3	14	3	1	6	2
		26	1053_BF_07	53	1			1	3	22	3	6	3	12
		27	2_BF_07	1	1			1	1	1	1	1	1	1
		28	19_BF_07	2	1			2	2	2	2	2	2	2
		29	331_BF_07	3	1			2	2	3	2	2	2	3
		30	395_BF_07	4	2	BF: two localities in 2007 (395_BF_07; 476_BF_07)		2	2	4	2	2	2	2
		31	461_BF_07	5	2	BF: one locality in 2007 (461_BF_07; 474_BF_07)		2	2	5	2	2	2	2
		32	463_BF_07	6	1			3	2	6	2	2	2	2
		33	466_BF_07	7	1			2	2	7	2	2	2	2
		34	469_BF_07	8	1			2	2	3	2	2	2	2
		37	623_BF_07	9	1			1	3	8	3	3	3	4
		38	629_BF_07	10	3	BF: once in 1997 & twice in 2007 (BF_97; 629_BF_07; 635_BF_07)		1	1	1	1	1	4	5
		39	630_BF_07	11	1			1	4	1	1	1	4	5
		40	631_BF_07	12	1			1	3	9	3	3	3	5
		42	668_BF_07	13	1			1	5	10	1	1	5	5
		43	708_BF_07	14	1			1	3	11	1	1	5	3
		44	810_BF_07	15	1			2	2	1	2	2	2	3
		45	891_BF_07	16	1			2	6	1	2	2	2	2
		46	903_BF_07	17	1			4	2	1	4	2	2	2
		47	1062_BF_07	18	1			1	7	1	3	1	6	5
		48	1114_BF_08	19	1			3	2	12	2	2	2	2
		49	1210_BF_08	20	1			2	2	13	5	2	2	2
		50	1232_BF_08	21	1			1	8	11	6	1	5	3
		51	1267_BF_08	22	1			1	3	14	3	1	6	1
		53	1754_BF_08	24	1			2	2	1	7	2	7	2
		55	1796_BF_08	26	1			2	2	1	2	2	8	2
		56	1798_BF_08	27	1			2	2	1	7	4	2	2
		57	1799_BF_08	28	1			2	2	15	2	2	2	2
		58	1905_BF_08	29	1			2	2	1	8	2	2	2
		60	1948_BF_08	30	1			2	2	1	2	2	9	2
		61	1951_BF_08	31	1			1	1	1	9	1	1	1
		62	2165_BF_08	32	1			2	2	1	8	5	2	2
		63	2185_BF_08	33	1			2	3	1	2	2	2	2
Other West-African origins: 6 isolates defining 5 STs (3 new & 2 sampled in Burkina Faso;							total:	4	3	4	2	3	4	3
one ST new specific alleles)							specific to this area:	0	0	1	0	1	0	0
							haplotype diversity	0.867	0.733	0.8	0.533	0.733	0.8	0.6
							nucleotide diversity	0.013	0.016	0.007	0.004	0.01	0.017	0.011

							typing efficiency	0.4	0.273	0.571	0.667	0.5	0.333	0.3
							discriminatory power	0.905	0.81	0.857	0.667	0.81	0.857	0.714
		65	NIG_83	56	1			7	1	8	1	1	1	5
		66 & 69	GAM-01 & S_GHA_96	25	8	cf 2277_BF_02 above		2	2	1	2	2	2	2
		67	SAP_81	59	1			1	1	25	1	9	5	3
		68	P_GHA_96	62	1			3	3	10	2	1	14	2
		70	SEN_81	23		cf 2282_BF_02 above		3	2	1	2	2	2	2
South- & East-Africa: 12 isolates defining 10 new specific STs (6 STs include new specific alleles)							total:	6	4	6	3	3	4	4
							specific to this area:	5	3	2	2	2	2	2
							haplotype diversity	0.803	0.636	0.018	0.318	0.318	0.742	0.742
							nucleotide diversity	0.004	0.003	0.004	8E-04	0.004	0.005	0.007
							typing efficiency	1.2	1.333	0.857	1.5	0.429	0.8	0.571
							discriminatory power	0.833	0.692	0.846	0.423	0.423	0.782	0.782
South-Africa: 6 isolates defining 6 new specific STs (4 STs include new specific alleles)							total:	5	3	5	3	3	2	3
							specific to this area:	4	2	2	2	2	2	1
							haplotype diversity	0.933	0.733	0.933	0.6	0.6	0.533	0.733
							nucleotide diversity	0.006	0.003	0.004	0.002	0.008	0.003	0.004
							typing efficiency	1	1.5	0.833	1.5	0.429	1	0.75
							discriminatory power	0.952	0.81	0.952	0.714	0.714	0.667	0.81
	RSA	72	ERWO_85	54	1			11	17	8	1	1	10	5
		73	K_RSA_84	57	1			13	18	24	17	8	10	5
		74	Z_RSA_79	60	1			14	19	26	1	1	16	3
		75	B_RSA_52	61	1			15	18	26	1	1	10	3
	Zambia	76	ZAM_86	58	1			11	17	10	1	1	10	3
	Zimbabwe	77	ZIM_90	55	1			12	18	23	16	7	16	13
East-Africa: 6 isolates defining 4 new specific STs (2 STs include new specific alleles)							total:	2	2	2	1	1	3	2
							specific to this area:	0	0	0	0	0	0	1
							haplotype diversity	0.333	0.333	0.333	0	0	0.6	0.533
							nucleotide diversity	8E-04	0.002	7E-04	0	0	0.006	0.005
							typing efficiency	2	1	2	Infini	Infini	0.6	0.5
							discriminatory power	0.524	0.524	0.524	0.286	0.286	0.714	0.667
	Sudan	78	SUD_81	63	1			11	17	11	1	1	10	3
	Uganda	79; 80 & 83	A4_UGA_08-09	64	3	Two localities in 2008-2009: Amuria (A4_UGA_08-09; A6_UGA_08-09 BF) and Tororo (T9_UGA_08-09)		1	17	11	1	1	1	14
		81	P3_UGA_08-09	65	1			1	17	11	1	1	5	14
		82	S13_UGA_08-09	66	1			1	1	8	1	1	1	3
West Indies, Guadeloupe: one isolate defining one new ST (no specific alleles at any locus)														
		71	ERGA_82	49	1			1	3	10	1	1	14	1

Additional_file_S2: Phylogenetic network based on strains without those included in epidemic peak. The differences between samples are measured in base-pair differences among the concatenated sequences. The sampling geography is color-coded as defined in Figure 1. The figures used as sample-ID are defined in the Additional_file_S1.

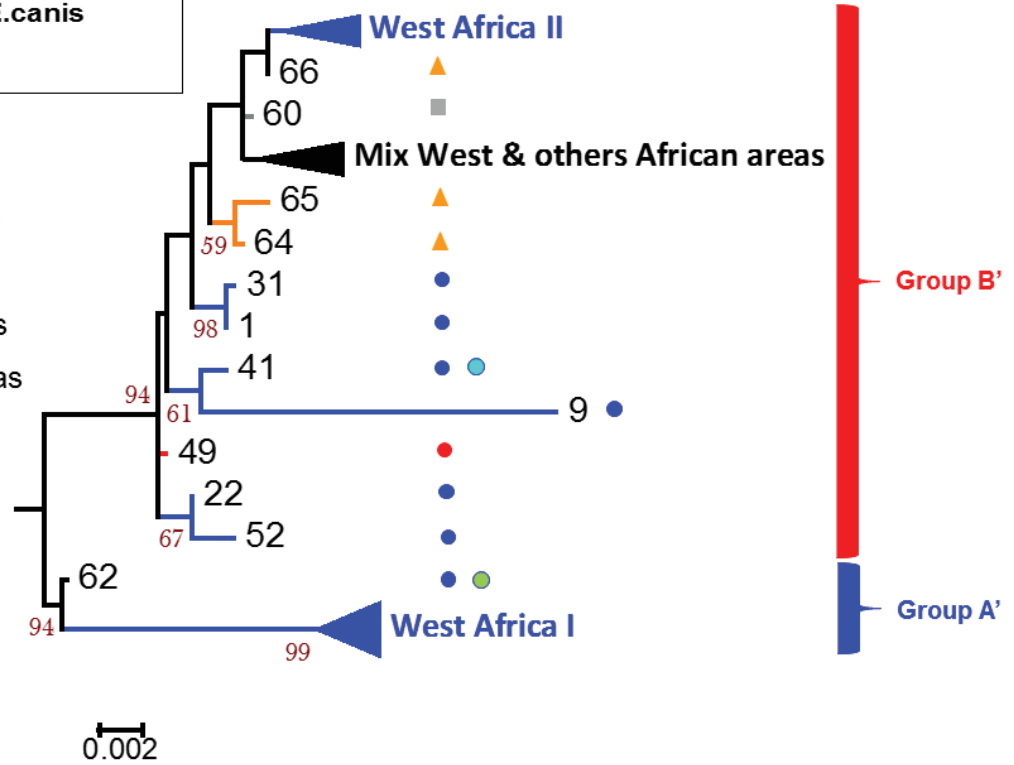


Additional file S3: Phylogeny. The group A' defines here is a part of the group A defined in figures 1 & 2 while the group B' is composed of the strains of group B and some of group A defined in figure 1 & 2. For the sake of clarity, three sub-clades are detailed in separate panels below. The confidence in nodes was assessed with the Maximum Likelihood method using 10 000 permutations. Sequences labels are ST numbers as defined in the Additional_file_S1. For samples collected in West Africa, a single dark-blue circle is represented whenever this sequences were only detected in Burkina Faso. Otherwise, a second circle appears at right in light-blue, or green to indicate the circulation of this sequence in Benin, or in either Ghana or Nigeria. The sub-clade 'West-African I' corresponds to the strains related to the 2008-to-2010 epidemic circulation in Burkina Faso. In subtree of "West-African I" strains followed by asterisks correspond to strains from Burkina Faso representing ST members originating from others West African countries.



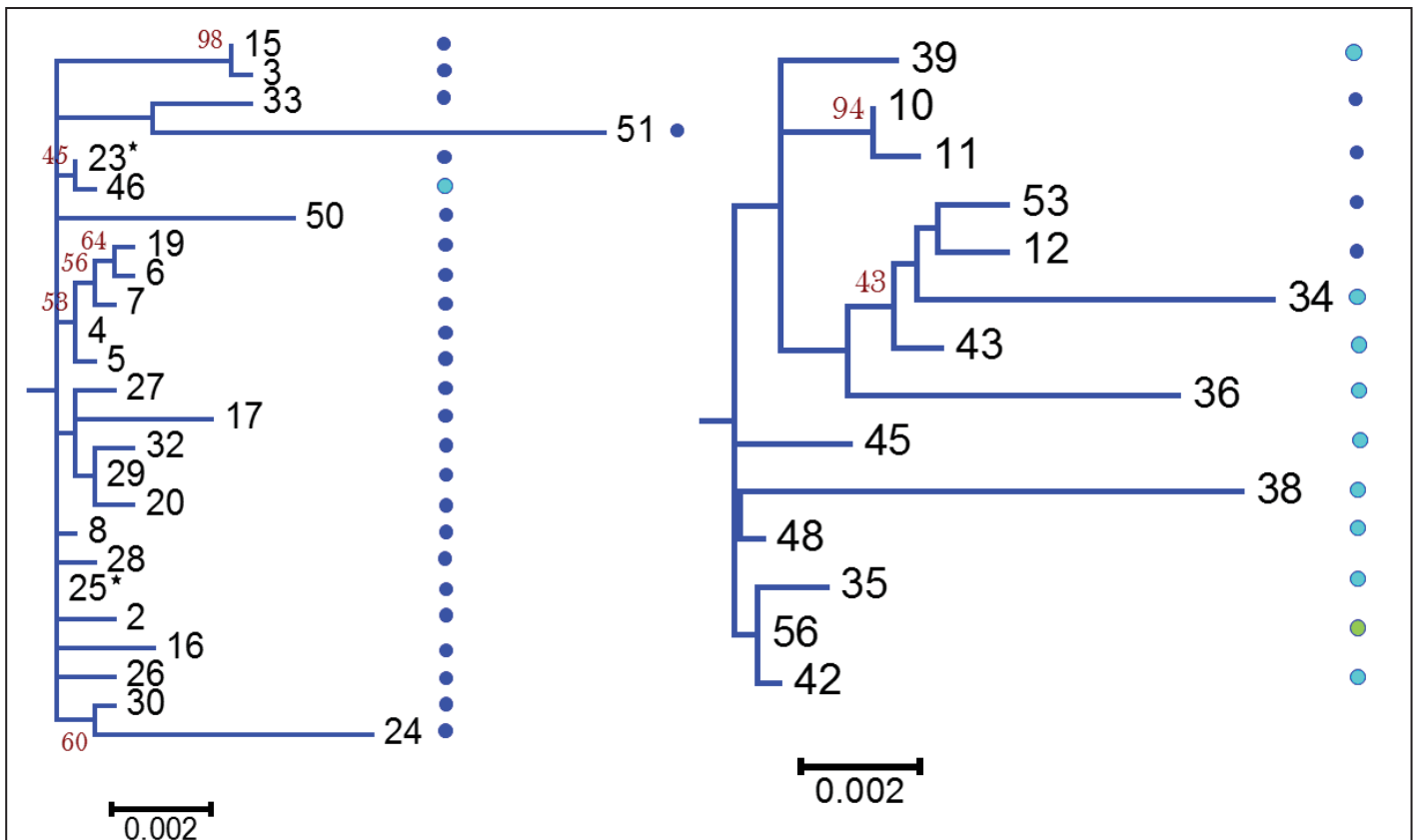
Our data:

- Western areas
- ▲ Eastern areas
- Southern areas
- Caribbean areas

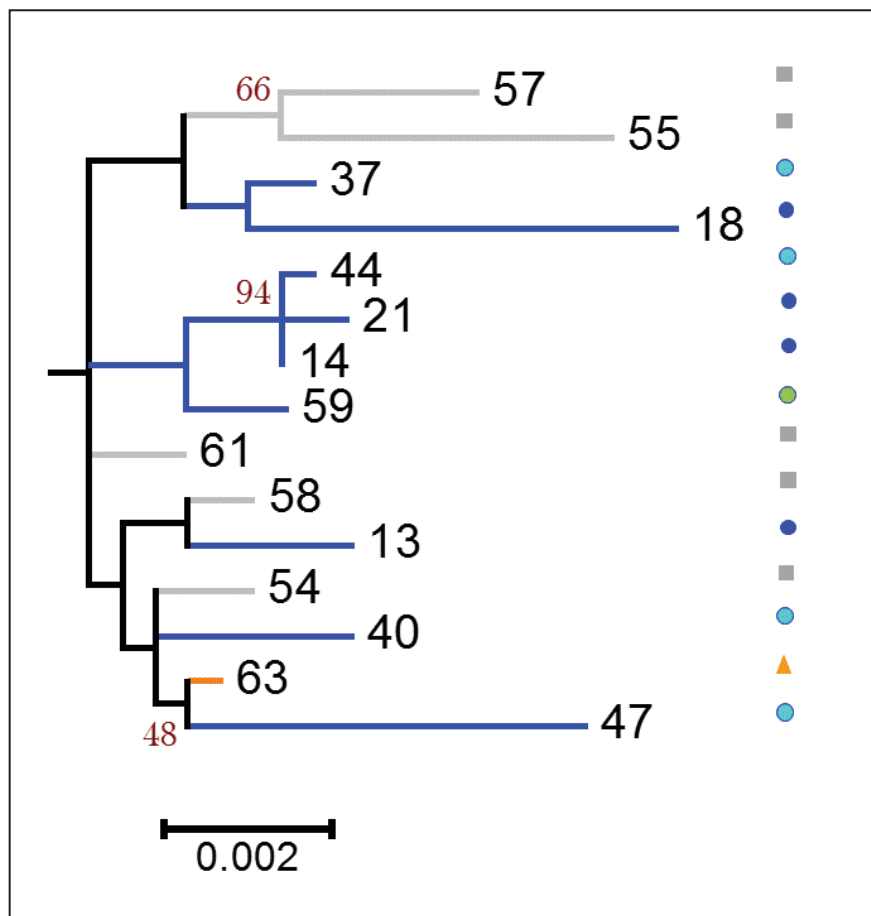


West Africa I

West Africa II



Mix West and others African areas



Additional file S4: Recombination events. The size of the concatenated sequences is 2832 bp including 395bp, 401bp, 475bp, 415bp, 341bp, 358bp, 447bp for *gltA*, *sucA*, *lepA*, *sodB*, *lipA*, *lipB*, *groEL* respectively. + corresponds to detection of significant recombination events (p<0,05). a: Breakpoint position is Undetermined but a proposition of a position is given in bracket. b: Parent of recombination is not clearly determined but an identification which can be a missidentification is done and is in bracket.

Events	Breakpoint		Genes concerned	Recombinant	Major Parent	Minor Parent	Detection method					
	Beginning	Ending					GeneConv	BootScan	MaxChi	Chimaera	SiScan	3Seq
1	2292	2695	LipB(93bp); groEL(310bp)	623_LB_2007	2_BK_2007	Unknown (2280_E008_2005)b	+	+	+	+	+	+
2	728	1132	SucA(68bp); lepA(336bp)	2_BK_2007	2332_PhBn_2009	1754_BK_2008	+	+	+	+	+	+
	728	1132		629_LB_2007	2332_PhBn_2009	1754_BK_2008	+	+	+	+	+	+
	728	1132		630_LB_2007	2332_PhBn_2009	1754_BK_2008	+	+	+	+	+	+
	728	1132		1951_SR_2008	2332_PhBn_2009	1754_BK_2008	+	+	+	+	+	+
	400	1132	SucA(396bp); lepA(336bp)	1062_LB_2007	2332_PhBn_2009	1754_BK_2008	+	+	+	+	+	+
	136	1360	gltA(259bp); SucA(401bp); lepA(475bp); sodB(89bp)	2207_PhBn_2008	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
	Undetermine d (454)a	1678	SucA(342bp); lepA(475bp); sodB(407bp)	2737_PhBn_2010	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
	Undetermine d (4)a	704	gltA(391bp); SucA(309bp)	668_SR_2007	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		704		ERWO_RSA	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		1360	gltA(391bp); SucA(401bp);	2234_LeBn_2009	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		1360	lepA(475bp); sodB(89bp)	2378_PhBn_2009	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		1360		2789_LeBn_2010	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		1360		2405_TcBn_2009	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		1360		Kwanyanga_RSA	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		1360		Lutale_ZAM_1986	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		1360		Zeerust_RSA_1979	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		1360		Ball3_RSA	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		1360		Umbanein_SUD	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
		1351	gltA(391bp); SucA(401bp); lepA(475bp); sodB(80bp)	Crystal_Springs_ZIM_19 90	1754_BK_2008	2332_PhBn_2009	+	+	+	+	+	+
3	388	798	gltA(7bp); SucA(401bp); lepA(2bp)	2185_LB_2008	891_SR_2007	631_LB_2007	+		+	+	+	+
	453	771	SucA(318bp)	2285_BK_433S_2007	891_SR_2007	631_LB_2007	+		+	+	+	+
	Undetermine d (388)a	Undetermined (2367)a	gltA(7bp); SucA(401bp); lepA(475bp); sodB(415bp); lipA(341bp); lipB (340bp)	Pokoase_GHA_1997	891_SR_2007	631_LB_2007	+		+	+	+	+
4	Undetermine d (1781)a	Undetermined (2408)a	lipA(246bp); lipB (358bp); groEL (23bp)	2285_BK_433S_2007	Undetermined (1754_BK_2008)b	2165_SR_2008		+	+	+		+

III.2 Communauté d'agents pathogènes transmis par les tiques du sous-genre *Boophilus* en Afrique de l'ouest

Ces résultats font partie de l'article n°4 inséré en encart n°4 en page 115

A. marginale, *B. bigemina* et *B. bovis* sont des hémoparasites transmis par les tiques du sous-genre *Boophilus*. Ils sont respectivement responsables des anaplasmoses et babésioses bovines, *B. bovis* causant la forme la plus sévère des babésioses. Des études récentes montrent que les prévalences de ces agents pathogènes chez les bovins en Afrique de l'ouest se situent entre 12 et 77.78% pour *A. marginale*, 6 et 57.89% pour *B. bigemina* et 13.16 et 59.33% pour *B. bovis* (Farougou *et al.* 2007c; Patsanza 2012; Rio *et al.* 2013; Djakaridja *et al.* 2014). De plus les résultats des travaux de Rio *et al.* (2013) au Nigeria indiquèrent une prévalence de 31% d'*Anaplasma* sp et 86% de *Babesia* sp. Cependant au Brésil plusieurs travaux firent cas de fortes prévalences de ces agents pathogènes (>80%) en rapport avec l'infestation des animaux par la tique *R. (B.) microplus* (Oliveira-Sequeira *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2005; Brito *et al.* 2013). De plus en Afrique du Sud, l'invasion de *R. microplus* a été faite conjointement avec celle de *B. bovis* (Tønnesen *et al.* 2004). Par ailleurs, Pastanza (2012) mit en évidence au Bénin une corrélation positive entre *B. bovis* et *R. (B.) microplus* et une absence de corrélation avec les autres vecteurs, espèces sœurs de *R. (B.) microplus*. L'invasion du Burkina Faso par *R. (B.) microplus* étant assez récente (Adakal *et al.* 2013a) nous avons entrepris au sud ouest de ce pays un suivi longitudinal de 12 mois sur 36 bovins de trois sites pour prospecter cette corrélation et l'élargir à *A. marginale* et *B. bigemina*. Nous avons réalisé la même analyse sur 60 bovins récoltés sur cinq sites au sud et au nord du Bénin. Les sites d'études des deux pays ont été regroupés en trois zones, dont deux au Bénin et une au Burkina Faso. Des analyses d'interactions des tiques récoltées sur les animaux suivis dans ces zones d'études avaient fait ressortir des interactions agrégatives. Aucune étude n'ayant jusque là encore examiné les interactions entre *A. marginale*, *B. bigemina* et *B. bovis* en Afrique de l'ouest, nous avons comblé ce vide dans notre étude. En outre, le même animal ayant été étudié à plusieurs reprises (1moisX12) pour la recherche des mêmes agents pathogènes nous avons déterminé la durée d'infestation moyenne d'un animal.

Les résultats révèlent que *A. marginale* est le plus prévalant des trois agents pathogènes étudiés (**Encart N°4**). Les prévalences de *B. bigemina* se situent entre celles de *A. marginale* et celles de *B. bovis*. Les durées moyenne d'infestation respectent le même schéma que les



prévalences, *A. marginale* ayant la durée d'infestation la plus élevée. Les grandes valeurs de durée d'infestation paraissent être en rapport avec le temps d'incubation du parasite (i.e. *A. marginale*). Principalement, l'évitement est le type d'interaction mis en évidence entre les trois agents pathogènes étudiés, l'évitement entre *A. marginale* et *B. bigemina* étant observé à l'échelle régionale. Cette interaction pourrait influencer l'épidémiologie des maladies causées par ces agents pathogènes. En effet, l'évitement en cas de multi-infection serait dans certains cas favorable aux animaux infectés, augmentant leur durée de vie que lors d'une infection par un seul agent pathogène. Aussi, s'avère-t-il nécessaire d'appréhender quel(s) mécanisme(s) sous-tend(ent) cet évitement mis en évidence entre ces agents pathogènes transmis par les tiques du sous-genre *Boophilus*. Ces résultats constituent un tremplin pour des travaux visant à déterminer les impacts d'une telle interaction sur les maladies concernées dans la sous-région. En outre, une corrélation positive entre *B. bovis* et l'abondance de *R. (B.) microplus* a été mise en évidence au sud du Bénin. Mais la présence de la tique invasive est aussi positivement corrélée avec *A. marginale* au sud ouest du Burkina Faso.



Encart N°4: Abel S Biguezoton, Safiou Adehan, Hassane Adakal, Honorine Badolo, Mamadou Toure, Sébastien Zoungrana, Souaïbou Farougou, Christine Chevillon. Interactions between *Rhipicephalus* (*Boophilus*) tick-borne pathogens in the cattle herds from Benin and Burkina Faso. En Préparation

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Full title	Interactions between <i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> tick-borne pathogens in the cattle herds from Benin and Burkina Faso
Short Title	Avoidance between <i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> Tick-borne Pathogens

Abel S BIGUEZOTON^{1,2,3*¶}, Safiou ADEHAN^{1¶}, Hassane ADAKAL^{2,#a}, Honorine BADOLO², Mamadou TOURE², Sébastien ZOUNGRANA², Souaïbou FAROUGOU¹, Christine CHEVILLON^{3,4}

¹Unité de Recherche en Biotechnologie de la Production et de la Santé Animales (URBPSA) – Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, Ecole Polytechnique d’Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin.

²Unité de Recherche sur les bases biologiques de la Lutte Intégrée (URBIO) – Centre International de Recherche-Développement sur l’Elevage en zone Subhumide (CIRDES) –Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

³IRD, UR 224 ‘Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC), Montpellier, France.

⁴CNRS, Université Montpellier, UMR 5290 MIVEGEC, Montpellier, France.

^{#a}Current address : Département des Sciences et Techniques de l’Elevage (DSTE/FASE), Université Dan Dicko Dan Koulodo, Maradi, Niger.

*Corresponding author:

Email : babels005@yahoo.fr (ASB)

¶ : These authors contributed equally to this work.

21 Abstract

22 Bovine anaplasmosis and babesiosis are tick-borne diseases responsible of high economic costs worldwide.

23 Previous invasive waves of the Asian cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* were reported to have come

24 along with the apparition of epidemics by the tick-borne pathogen *Babesia bovis* in South Africa and to have

25 generated high prevalence of *B. bigemina* and *B. bovis* in cattle in Brazil. As this *R. microplus* is currently invading

26 West Africa, the present study was aimed at investigating whether similar increases in the prevalence of *A.*

27 *marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis* are observable in West Africa, and, more generally, at analysing the

28 interactions between these tick-borne pathogens and between these pathogens and the relative abundances of

29 their native (*R. annulatus*, *R. decoloratus*, *R. geygyi*) and invasive (*R. microplus*) vectors.

30 Eight cattle herds were monitored for 12 months within three areas corresponding to South-Benin, North-Benin

31 and South-West Burkina Faso. Twelve sentinel steers were randomly chosen within herds in order to monthly

32 collect blood sample from each sentinel steer and to diagnose possible infections of the steers. Infection

33 diagnostics were performed using blood smears test and molecular methods. This allowed identifying *A.*

34 *marginale* as the most prevalent pathogen across the three surveyed regions (0.60-1), followed by *B. bigemina*

35 (0.24-0.85) and *B. bovis* (0.10-0.64); the same ranking order of the tick borne pathogens was observed when

36 considering the apparent duration of cattle infection. Moreover, tick-borne pathogens assemblage varies

37 according to herds. Regarding interactions pattern, mainly avoidance was revealed between *A. marginale*, *B.*

38 *bigemina* and *B. bovis*. Meanwhile, a positive correlation between *B. bovis* prevalence and *R. microplus*

39 abundance was observed in South-Benin.

40 Altogether, studied *Boophilus* tick-borne pathogens (i.e. *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis*) avoid each other

41 within cattle in Benin and Burkina Faso. This pattern raises new questions regarding the underlying mechanisms.

42

43 **Key words:** Interactions, Tick-borne pathogens, *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*,

44 *Rhipicephalus microplus*, West Africa.

45 Author Summary

46 *R. microplus* is currently invading West Africa. This cattle tick past invasion was followed by the apparition of
47 epidemics of *B. bovis* in South Africa and high prevalence of *B. bovis* and *B. bigemina* within cattle in Brazil. Given
48 that *Boophilus* ticks vectored also *A. marginale*, therefore, we aimed here to check whether high prevalence of *A.*
49 *marginale*, *B. bovis* and *B. bigemina* occurred currently within cattle in West Africa and are correlated with *R.*
50 *microplus* abundance. We also analysed these tick-borne pathogens interactions pattern given that we recently
51 demonstrated an aggregation between their vectors. To do so, we use blood sample from 96 cattle belonged to
52 eight herds surveyed for 12 months in Benin and Burkina Faso. We found highest prevalence of *A. marginale*,
53 relatively high prevalence of *B. bigemina* and relatively medium even low prevalence of *B. bovis*. Interestingly, we
54 highlighted mainly an avoidance between *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis*, though only avoidance between
55 *A. marginale* and *B. bigemina* was recorded at regional scale. Our results suggest that imported Girolando bovine
56 reach enzootic stability in *A. marginale* in Benin where *R. microplus* seem to be co-introduced with its vector, *B.*
57 *bovis* and that surveyed steers would subvert to *B. bovis* babesiosis.

58

59 Introduction

60 Ticks are the most relevant vectors of disease-causing pathogens in domestic and wild animals [1]. Among such
61 tick-borne diseases, bovine anaplasmosis and babesiosis are respectively caused by *Anaplasma* and *Babesia*
62 species [2,3].

63 *Anaplasma marginale* is an obligate intracellular bacteria that circulates on all continents, causing high morbidity
64 and mortality in cattle across temperate, subtropical and tropical regions [4]. It may be transmitted mechanically
65 by blood sucking flies, by infected blood via fomites as well as transplacentally from infected cow to its offspring
66 [5]. Nevertheless, the most efficient transmission is the tick-borne transmission by tick species of the *Boophilus*
67 subgenus (*R. annulatus*, *R. decoloratus* and *R. microplus*; [5–7]) in which the bacterial pathogen is maintained via
68 intrastadial and interstadial transmission [8,9]. The high efficiency of the tick-borne transmission results from the
69 bacterial replication within the tick-vector [5]. *A. marginale* infects ruminants erythrocytes causing anaplasmosis,
70 whose acute phase is characterized by anaemia, fever, weight loss, reduced milk production and often lead to
71 death [10]. The incubation period (or prepatent period) varies with the infective dose, ranging from 7 to 60 days
72 with an average of 28 days. The cattle surviving the acute phase of infection develop persistent infections that are
73 characterized by low but cyclical rickettsemia levels [11–13]. Meanwhile, such persistent infection promotes life-
74 long immunity on cattle which will thus no further develop clinical symptoms of the disease upon a next
75 challenge-exposure.

76 *Babesia bigemina* and *B. bovis* are two protozoan parasites (Apicomplexa) which also are infecting erythrocytes
77 and circulate among cattle throughout Africa, Asia, Australia, Southern Europe, Central and South America [14].
78 Young cattle (less than 9 month-old) present a higher natural resistance to clinical infection caused by babesiosis
79 than older cattle [15]. *B. bovis* is generally responsible for the more serious pathological signs that include
80 anorexia, depression, increased respiratory rate, weakness, anaemia, jaundice, reluctance to move,
81 haemoglobinuria and abortion [16]. After recovery of the acute phase of the disease, cattle may remain
82 subclinical pathogen carriers for several years. The expression of *B. bigemina* infection include rapid intravascular
83 haemolysis, haemoglobinuria, anaemia, and jaundice [16]. These clinical signs appear very suddenly and may lead
84 to death in some cases. After recovery from the acute phase of the disease cattle remain pathogen carriers able

85 to infect tick-vectors life-long [16]. The incubation period of *B. bigemina* infection usually lasts for 12-to-18 days
 86 after tick attachment but may be divided by almost two (6-to-12 days) when the pathogen was vectored by *R.*
 87 *microplus* ticks, particularly by *R. microplus* males [17–19]. By comparison, the prepatent period for *B. bovis*
 88 generally lasts from 6 to 12 days; it is followed in the next 3 to 5 days by the parasitemia peak [17]. Such
 89 prepatent period can be shortened by heat stimulation and thus high environmental temperatures [20]. Both *B.*
 90 *bigemina* and *B. bovis* are vectored by *R. annulatus*, *R. geigy* and *R. microplus* [7,14,21] with the fourth West-
 91 African species of the *Boophilus* subgenus, *R. decoloratus*, representing an additional competent vector for *B.*
 92 *bigemina* [14]. In the tick vectors there is transovarial transmission of *B. bovis* but not of *B. bigemina* (which is
 93 thus obligatory transmitted by the nymphal and adult stages of individual that has been infected along a previous
 94 blood-meal).
 95 *R. microplus* invasion in South Africa was jointly achieved with the apparition and diffusion of *B. bovis* among
 96 cattle herds [22]. In Brazil, several studies highlighted that high prevalence levels of *B. bigemina* and *B. bovis* were
 97 associated with cattle infestation by *R. microplus* [23–25]. Now, West Africa is currently invaded by *R. microplus*
 98 that reached South-Benin in 2004, North-Benin between 2004 and 2011 and South-West Burkina Faso in late
 99 2011 [26,27]. In 2012-2013, *R. microplus* displayed a highly heterogeneous distribution among these three West-
 100 African areas and tended to aggregate on the same steers within herds than the co-occurring native tick species
 101 (including *R. annulatus* and *R. decoloratus*) [28]. How does such inter-specific aggregation among *Boophilus* tick-
 102 species translate on the pathogen species they are vectoring to cattle in West-Africa? Are the variations in
 103 prevalence of such pathogens primarily driven by the variation in *R. microplus* abundance? The present study was
 104 aimed at addressing such questions.
 105 To do so, the recently published analysis in the spatio-temporal variations in the structure of the ticks
 106 communities performed in 2012-2013 among cattle herds from Benin and Burkina Faso [28] was doubled by
 107 investigating the contemporaneous variations in prevalence of three pathogens vectored by the *Boophilus* ticks
 108 and known to circulate in West African [29–32]: *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis*. Cases of infections by
 109 either one of these three pathogens were searched for among the monthly blood-samples of sentinel-steers from
 110 eight herds located in three areas (South-Benin, North-Benin and South-West Burkina Faso) where *R. microplus*

111 was present [28]. Infection diagnostics were performed via blood smears and molecular methods. Each sentinel
112 steer had been followed for 12 consecutive months, this thus allowed estimating how long lasted in average the
113 infections caused by either *A. marginale*, *B. bigemina* or *B. bovis* within herds as well as the variations in such
114 infection durations and/or in the pairwise co- infection patterns across the herds and areas considered.

116 **Materials and Methods**

117 **Sampling areas**

118 Three areas with different climate were considered (Fig 1). South-Benin has a Guinean climate characterized by a
119 long rainy season from April to July, a short dry season in August, a short rainy season between September and
120 November and a long dry season from December to March. North-Benin included two sites where one rainy
121 season (May to October) is followed by one dry season (November to April). Overall, the amount of annual rainfall
122 is 1400 mm in South-Benin and 1300 mm in North. In South-West Burkina Faso the rainy season lasts from June to
123 September and the dry season from October to May. Overall, the amount of maximum rainfall is higher in North-
124 Benin (i.e. 1300 mm) than in Burkina Faso (1200 mm).

126 **Fig 1. Sampling geography.** Sampling sites (triangles) are identified by the combination of one number (referring to the area)
127 and one letter (referring to the locality name). In South-Benin (area #1), three cattle herds were monitored at Athiémé (1A; N
128 6.5864; E 1.6653), Kpinnou (1K; N 6.5681; E 1.781) and Ouidah (1O; N 6.3336; E 2.0064). In North-Benin (area #2), the two
129 cattle herds monitored were located in Okpara (2O; N 9.305; E 2.7314) and Gogounou (2G; N 10.7383; E 2.9233). In south-
130 west Burkina Faso (area #3), samples were collected at Farnifaso (3F; N 10.07338; W 4.94975), Kimini (3K; N 10.07162; W
131 4.808) and Ouangolodougou (3O; N 10.0858; W 4.77828).

133 These three areas also represent different steps in *R. microplus* invasion of West Africa. The state farm Kpinnou in
134 South-Benin (site 1K, Fig 1) was the place where the invasive tick was introduced in 2004 [27]. Evidence of *R.*
135 *microplus* presence in North-Benin and South-West Burkina Faso were obtained in 2011 [27,33].

Two to three herds were monitored in each of these three areas. Hereafter, each sampling site is designated by a number that identifies the geographical area (South-Benin: area #1; North-Benin: area #2; South-West Burkina Faso: area #3) followed by the initial letter of the locality name (e.g., site 1K corresponds to Kpinnou in South-Benin) (Fig 1).

Blood sampling

Twelve sentinel steers were randomly chosen within each monitored herd. Sampling started in February 2012 in the Beninese areas (areas #1 and #2 in North- and South-Benin) and in April 2012 in Burkina Faso (area #3) and lasted for 12 months everywhere. Each month, in addition to the tick sampling [28], two blood-samples were taken on each sentinel steer. The first one, taken from ear vein, was thinned on slide and stained with Giemsa for microscopic identification of infection cases (smear test). The second, taken from the jugular vein, was preserved into a well labelled EDTA bottle before being deposited on filter paper to obtain dry filter paper blood spots (DBS) for the later purposes to perform DNA extraction and molecular diagnostics.

Diagnostic methods

DNA extraction from DBS was performed as described by Plowe et al. [34]. PCR and quantitative PCR were performed as described in the literature for the specific detection of *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis* [35–37].

In the few cases where a contamination of the blood samples was suspected, the infection rate (prevalence) of the three pathogens were only driven from the microscopic inspection of blood smears (S1 Table). The prevalence estimates driven by either molecular or microscopic diagnostic methods were then compared using student paired t-tests to check for a putative divergence between methods. Although both methods of diagnostic were applied, preference was given to molecular results for statistical analyses. This choice based on the sensitivity and precision of molecular methods relatively to smear test [38].

Prevalence and infection duration

162 Prevalence of each pathogen species and pairwise co-infection estimates were computed for each sampling date
163 within herds and areas. Yearly averages (and associated standard errors to the means) in pathogen prevalence
164 were then computed taking into account the twelve sampling events performed within herds in order to allow
165 comparing them among areas differing in climates, and hence in the seasonal patterns in tick infestation [28] and
166 thus probably also in the acquisition of tick-borne pathogens.

167 The mean duration of infection was computed by examining the changes in infection pattern (i.e., presence or
168 absence of infection) along the 12 consecutive blood samples that had been monthly taken from each sentinel-
169 steer. When a sentinel steer was diagnosed positive for a given pathogen on two consecutive collection events,
170 infection duration was considered as equal to two months. When it was diagnosed positive at one sampling date
171 but not at the next sampling date, the infection duration was estimated as equal to one month. After analysing
172 each steer separately, the means (and associated standard errors) of infection duration were computed per
173 monitored herd.

174

175 **Statistical analyses**

176 Co-infection patterns by distinct tick-borne pathogens and/or by ticks and tick-borne pathogens were mainly
177 examined among the first sampling event performed within each monitored herd in order to limit the confusing
178 bias caused by long lasting infection by tick-borne pathogens. However, whole longitudinal dataset and datasets
179 related to tick-vectors' low and high season of abundance were also used for tick-borne pathogens interactions
180 analyses.

181 Tick-borne pathogens co-occurrence (i.e. association) according to herds was assessed computing
182 correspondence analysis (a multivariate analysis) using ade4 package in R ([https://cran.r-](https://cran.r-project.org/web/packages/ade4/index.html)
183 [project.org/web/packages/ade4/index.html](https://cran.r-project.org/web/packages/ade4/index.html)).

184 Concerning tick-borne pathogens interactions, analyses were realized at three levels: (i) regional (global), (ii)
185 within areas, (iii) within herds. Given the complexity and/or the sizes of samples at each level different
186 approaches were engaged. For regional dataset analysis, the repeated measures performed were taken into
187 account as described by Crawley [39]: the glmer function implemented in the R package lme4 (<https://cran.r->

project.org/web/packages/lme4/index.html) was used to build generalized linear mixed models (GLMM) with binomial structure. Akaike Information Criterion index (AIC) was then used to select the most parsimonious base model. In model comparisons, preference was given to models that minimized the AIC, while maximizing the percentage of explained variance. Model simplification was achieved by removing the terms without significant effect ($P > 0.05$) on the analyzed pathogen's incidence.

Investigation of pathogens' interaction at within areas level using first sampling event dataset used generalized linear models (GLM) with binomial structure to fit the prevalence of a given tick-borne pathogen species so that the presence or absence of infections by each other species in the steers of a given area were described by factors taking the values 1 or 0, respectively [39]. Analyses started with the maximal model including all possible interactions. Model simplification was then achieved by removing the terms with no significant effect ($P > 0.05$). The possibility of overdispersion was checked *a posteriori* by computing the ratio of residual deviance onto the residual freedom degrees [39].

The third analysis that investigated the nature of co-infection patterns among tick-borne pathogens within herds used exact Fisher test approach. Independence between the infections caused by any pair of tick-borne pathogens was tested *via* exact Fisher tests on 2 x 2 contingency tables defined within herds as follows: the two rows corresponded to the presence or absence of infection by the first considered pathogen while the two columns corresponded by the presence or absence of the second considered pathogen. Here, analyses were performed on datasets: (i) of the first sampling event, (ii) related to first date of tick-vectors collection as well as to low and high season of tick-vectors abundance, (iii) corresponding to the highest co-occurrence prevalence of tick-borne pathogens. Considering dataset related to tick-vectors, tick-borne pathogens datasets analysed corresponded to sampling events of one month later taking into account the means prepatent period of *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis*.

Furthermore, the relative variations in pathogens' prevalence observed among sampling dates (factor Date), cattle herds (factor Herd) and co-infection patterns by alternative pathogens species (factors Amg, Bbg or Bbv) were analyzed over the entire data set. For this purpose, generalized linear mixed models (GLMM) with binomial structure was used as described above.

214 Finally, Pearson's product-moment test [39] was computed to test whether a linear relationship existed within
215 herds between, on the one hand, temporal variations in pathogens' prevalence and, on the other hand, the
216 temporal variations of several estimates described in the companion paper focusing on tick-vectors [28] such as
217 the overall abundance of the four *Boophilus* species, the overall monthly incidence rate of *Boophilus* ticks, the *R.*
218 *microplus* abundance or the *R. microplus* incidence rate.

219 All the statistical analyses were performed using R software version 3.0.2 (<http://www.R-project.org>).

220

221 **Ethics statement**

222 Herders received full information on the study objectives and procedures before signing a written informed
223 consent. Sampling was systematically coupled with veterinary inspection of the herd; in the case of infection,
224 animals received free treatment. All study procedures were reviewed and approved by the CSIRO Social Science
225 Human Research Committee under approval number Ref 038/12.

226

227 **RESULTS**

228 **Comparison of diagnostic methods**

229 Smear tests and molecular methods drove similar prevalence estimates of *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis*
230 within the two Beninese areas ($P > 0.088$ in all cases) but not in South-West Burkina Faso ($P=0.018$, $P<0.001$, $P=0.05$
231 for *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis* respectively). In South-West Burkina Faso, smear tests underestimated
232 the pathogens' prevalence relatively to molecular methods.

233

234 **Yearly averages in infection duration and tick-borne pathogens prevalence**

235 The Fig 2 detailed for each of the eight monitored cattle herds the yearly averages in pathogens' prevalence and
236 the apparent mean duration of infection. No significant difference in the yearly prevalence averages was observed
237 within areas (Table 1). However significant differences ($P<0.05$) were noticed when prevalence of *A. marginale* and
238 *B. bovis* were compared between areas (Table 1).

239

240 **Fig 2. Infection duration and prevalence.** Histograms display the yearly averages in prevalence for *A. marginale* (Amg), *B.*
 241 *bigemina* (Bbg) and *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis* (Bbv). The mean apparent duration of infection (in months) are
 242 indicated within parentheses.

243

244 **Table 1. Comparison of infected animals’ proportion within and across areas and countries.**

			245
Pathogens	Scale	P-value	
A. marginale	Area1	0.192	246
	Area2	0.217	
	Area3	0.638	247
	Area1 Vs Area2	0.885	
	Area1 Vs Area2 Vs Area3	0.017*	248
	Benin Vs Burkina Faso	0.006**	249
B.bigemina	Area1	0.982	
	Area2	0.092	250
	Area3	0.232	
	Area1 Vs Area2	0.950	251
	Area1 Vs Area2 Vs Area3	0.106	
	Benin Vs Burkina Faso	0.071	252
B.bovis	Area1	0.109	253
	Area2	1.000	
	Area3	0.755	254
	Area1 Vs Area2	0.381	
	Area1 Vs Area2 Vs Area3	0.05•	255
	Benin Vs Burkina Faso	0.061	

256 Significant codes are as follows: • means P-value =0.05; * means P-value <0.05; ** means P-value <0.01

257

258 *A. marginale* was the most frequently observed pathogen species (Fig 2). Its yearly average in prevalence ranged
 259 from 0.75 to 1 in South-Benin, from 0.78 to 1 in North-Benin and from 0.55 to 0.62 in South-West Burkina Faso.
 260 Meanwhile the apparent mean duration of *A. marginale* infection ranged from 2 to 12 months in South-Benin, from
 261 3 to 12 months in North-Benin but only 3 months in Burkina Faso. Interestingly the observations of the maximal
 262 estimates of prevalence and infection durations (1 and ~12 months) were observed within the only two state farms,
 263 holding Girolando (i.e. hybrid between *Bos indicus* (Gir) and *Bos taurus* (Holstein) breeds) involved in the study (1K
 264 and 2O; Fig 2).

265 The yearly averages in *B. bigemina* prevalence ranged from 0.62 to 0.78 in South-Benin, from 0.41 to 0.85 in South-
 266 Benin and from 0.22 to 0.60 in South-West Burkina Faso. Cattle infection by this pathogen lasted in average about
 267 2 months in South-Benin, from 2 to 4 months in North-Benin and from 1 to 2 months in South-West Burkina Faso.
 268 If *B. bovis* was detected in all surveyed cattle herds, it was less frequently observed than the two other pathogens
 269 over the entire study (Fig 2). Its yearly prevalence averages ranged from 0.18 to 0.58 in South-Benin, from 0.18 to
 270 0.22 in North-Benin and from 0.08 to 0.20 in South-West Burkina Faso. The mean duration of *B. bovis* infection was
 271 about 1 month in all the monitored cattle herds but was 2 ± 0.6 months in the state farm of Okpara (20).
 272

273 Co-occurrence and mutual impacts of pathogen's incidence

274 Co-infection occurred within herds with uneven percentage, that involving *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis*
 275 altogether recording the least percentage within the three areas (Table 2).
 276

277 **Table 2. Pathogens co-occurrence prevalence.**

Pathogens' co-occurrence	Site	Prevalence (%)	SE
Amg + Bbg	1A	59.30	18.37
	1K	64.08	17.61
	1O	49.52	21.31
	2G	68.07	27.43
	2O	43.75	20.49
	3F	14.28	9.84
	3K	29.70	11.87
	3O	25.66	14.21
	Area1	57.41	12.09
	Area2	54.18	19.19
	BENIN=Area1+Area2	56.79	13.38
	BURKINA=Area3	23.23	6.43
Amg + Bbv	1A	26.17	8.64
	1K	57.01	21.53
	1O	9.91	10.17
	2G	12.33	7.70
	2O	27.08	16.67
	3F	5.62	6.56
	3K	12.89	11.98
	3O	3.47	6.37
	Area1	31.14	11.03
	Area2	20.37	11.09
	BENIN=Area1+Area2	26.68	9.37
	BURKINA=Area3	7.34	3.98
Bbg + Bbv	1A	29.89	14.63
	1K	27.53	14.98
	1O	14.22	10.75
	2G	13.77	10.21
	2O	15.97	9.14
	3F	8.40	7.03
	3K	10.68	8.02
	3O	1.39	2.55
	Area1	22.79	10.72
	Area2	15.11	8.68

Amg + Bbg + Bbv	BENIN=Area1+Area2	19.75	9.28
	BURKINA=Area3	6.84	2.60
	1A	19.97	10.44
	1K	27.53	14.98
	1O	8.52	8.59
	2G	9.99	7.89
	2O	15.97	9.14
	3F	3.47	5.21
	3K	6.45	6.45
	3O	0.69	1.27
	Area1	18.00	8.60
	Area2	13.38	6.94
	BENIN=Area1+Area2	16.13	7.11
	BURKINA=Area3	3.55	1.93

Amg, Bbg, Bbv referred to *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis* respectively.

Regarding tick-borne pathogens association according to herds, two herds (i.e. 1A and 1K) in South-Benin presented different pattern relatively to the six others (Fig 3).

Fig 3. Association of tick-borne pathogens agent according to localities. Amg, Bbg and Bbv referred respectively to *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*.

Considering tick-borne pathogens relationships, significant negative correlation was observed in South-Benin between the infections caused by *B. bigemina* and *B. bovis* ($P < 0.05$; Table 3). Likewise, in North-Benin, we observed that infections caused by *A. marginale* and *B. bigemina* were significantly ($P < 0.01$) negatively correlated (Table 3). Furthermore, pathogens' interactions analyses revealed that infection of *B. bigemina* negatively impact on that of *A. marginale* (and *vice versa*) at the regional scale using whole longitudinal dataset (Fig 4). Such interaction pattern including both latter pathogens was also noticed within area #3 using dataset of the first sampling event (Fig 4). In addition, negative impact of *B. bovis* infection on that of *B. bigemina* (and *vice versa*) was registered within area #1 (Fig 4). The interactions' pattern observed above between *B. bigemina* and *A. marginale*/ *B. bigemina* and *B. bovis* were afterwards confirmed within respective areas/herds, including area #2, at various sampling event related to tick vectors collection (Fig 4). Surprisingly, positive impact, though marginal, of *B. bovis* infection on that of *A. marginale* (and *vice versa*) was encountered within area#1 considering dataset of the sampling event corresponding to the highest prevalence of the three pathogens studied co-occurrence (Fig 4).

299 Table 3. Relationships between pathogens and *Boophilus* ticks abundance and incidence.

300

Pearson's product-moment correlation														
		Pathogens			Boophilus ticks abundance					Boophilus ticks incidence				
		Amg	Bbg	Bbv	R.a	R.d	R.g	R.m	BoophNSp	R.a	R.d	R.g	R.m	BoophNSp
Area1	Amg													
	Bbg			—*		—*		—*			—*			
	Bbv		—*			+		+						
Area2	Amg		—**											
	Bbg	—**						—*	+					
	Bbv													
Benin=Area1+Area2	Amg		—**						—*					
	Bbg	—**				—*		—*			—*			
	Bbv					+		+						
Area3	Amg												+	
	Bbg													
	Bbv													

301 Since the average incubation period of the pathogens studied is around one month, Pearson's product-moment was computed using *Boophilus* tick data corresponding
302 event collection and pathogens data of the second event collection. Positive correlations are represented by + while negative correlations are mentioned by —. Significant
303 codes are as follows: * means P-value =0.5; * means P-value <0.5; ** means P-value <0.01; *** means P-value =0.001. Amg, Bbg, Bbv, R.a, R.d, R.g, R.m and BoophNSp refer
304 respectively to *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *R. (Boophilus) annulatus*, *R. (Boophilus) decoloratus*, *R. (Boophilus) geigy*, *R. (Boophilus) microplus* and *R. (Boophilus)*
305 ticks which were not identified on species level because their mouthparts were damaged.

306 **Fig 4. *Boophilus* tick-borne pathogens interactions in Benin and Burkina Faso.** Characters in blues referred to regional
 307 results whereas green and red characters corresponded to areas and localities levels' results respectively. Amg, Bbg and Bbv
 308 referred respectively to *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis*. Areas and localities ID were indicated in brackets for
 309 interactions analyses at areas and localities levels. For details concerning areas and localities ID see Figure 1. t1 and t2
 310 referred to first and second sampling events datasets respectively. "Max. Abund." corresponded to dataset taking into
 311 account tick vectors high season abundance while "Max.tripl.infect." evoked dataset of sampling event where the maximum
 312 of the three pathogens studied co-infection prevalence was observed. NS means non-significant.

313

314 ***Boophilus* ticks and environmental factors relationships with pathogen's incidence**

315 None of the climatic parameters considered (monthly rainfall and monthly mean in temperature) was correlated
 316 with the monthly estimates in pathogens' prevalence.

317 By contrast, a few correlation cases were observed between the variations in pathogens' prevalence and those in
 318 the abundance and incidence of possible vectors (Table 3). For instance, *A. marginale* prevalence was positively
 319 correlated ($\rho > 0$; $P < 0.05$) with the monthly incidence rate of *R. microplus* in South-West Burkina Faso (Table 3).

320 Within both North- and South-Benin, *B. bigemina* prevalence was negatively correlated ($\rho < 0$; $P < 0.05$) with the
 321 abundance of ticks *R. microplus*. Negative correlation was also determined between prevalence of *B. bigemina* and
 322 *R. decoloratus* abundance and incidence rate within South-Benin (Table 3). Nonetheless, *B. bovis* prevalence was
 323 positively correlated ($\rho > 0$; $P < 0.05$) with both *R. decoloratus* and *R. microplus* abundance within South-Benin.

324

325 **Discussion**

326

327 **Weak level of pathogens infection within herds of South-West Burkina Faso**

328 Smear tests and molecular methods provided similar prevalence estimates across Beninese herds but greatly
 329 diverged for the samples taken in South-West Burkina Faso (S2 Fig). The hypothesis that such discordances result
 330 from differences in expertise can be ruled out since the samples collected in Benin and Burkina Faso were all
 331 treated by the same persons. The underestimation of pathogen prevalence in South-West Burkina Faso is more

likely to result from the lower infection level of cattle there: smear tests would be less accurate when parasitemia is too low. Molecular methods are actually known to be more sensitive than smear tests when ruminants were inoculated with attenuated parasites [38]. In the present study, the sensitivity of the PCR method used to identify *Babesia* pathogens was such as they can detect 1000 copies (0.1 fg) of the target DNA [35]. Such a precision is likely to drive to a negative result in smear test.

337

The higher the local prevalence, the longer the apparent duration of infection: Imported Girolando reach enzootic stability in *A. marginale* infection in Benin

In the present study, *A. marginale* was the most prevalent, followed by *B. bigemina* and then by *B. bovis* (Fig 2). The same ranking order of the three tick-borne pathogens was noticed for infection duration calculated (Fig 2). This pattern could result from differences in incubation periods (prepatent period) between pathogens. Regarding *A. marginale*, this period lasts in average 28 days varying from 7 to 60 days according to the infective dose. For *Babesia* species, prepatent period is shorter, lasting generally 12–18 days after tick attachment for *B. bigemina* and 6–12 days for *B. bovis* [17]. However, *B. bigemina* prepatent period could be shortened (6-12 days) when vectored by male *R. microplus* [18,19].

Besides, the maximal duration of infection observed in this study concerned *A. marginale* in herds 1K and 2O (i.e. 11 to 12 months) (state farms). Such results are very likely to result from chronic infection of the steers. Given the associated high prevalence estimates (i.e. 1) during the twelve months' longitudinal survey and the absence of mortality, we concluded that the concerned steers reach enzootic stability in *A. marginale*. The high prevalence estimates registered here might arise from the cattle race involving in this study in herds 1K and 2O: Girolando, i.e. hybrid between *Bos indicus* (Gir) and *Bos taurus* (Holstein) breeds given that hybrids are known to be more sensitive to *A. marginale* than pure *Bos indicus* breeds raised in the other monitored herds (e.g local breed of West Africa) [40]. It is noteworthy to mention that cattle Girolando were imported from Brazil and some of them died in the past in herds 1K and 2O due to *A. marginale* infection (Farougou Souaïbou, personal communication). Thus, the current enzootic stability is a post event after the elimination of the animals with weak immunity

357 against *A. marginale* strains within the state farms where cattle Girolando share the same spaces with local cattle
358 races.

359
360 **Current prevalence compared to past results in West Africa: has current strains of *B. bovis* been co-**
361 **introduced with *R. microplus* in Benin?**

362 Globally, in Benin, 86.20 % of surveyed steers were infected by *A. marginale* while 67.96% were infected by *B.*
363 *bigemina* and 30.88 % by *B. bovis*. In Burkina Faso, 57.24 % of steers were infected by *A. marginale*, 46.87% by *B.*
364 *bigemina* and 12.52% by *B. bovis*. The higher levels of *A. marginale* infection in both countries could be explained
365 by strains superinfection [41] or host susceptibility. Such trends of higher prevalence estimates concerning *A.*
366 *marginale* were reported in Côte d'Ivoire, where 77.78% of animals were infected by *A. marginale* in the North
367 whereas 45.28% were infected by *B. bovis* [29]. Although the prevalence estimates were lower, Bell-Sakyi et al.
368 [42] recorded in Ghana from May 1994 to December 1996 0.12 as prevalence of *Anaplasma* sp and 0.06 as that of
369 *B. bigemina*. However, contrary to the prevalence estimates trends between *Babesia* and *Anaplasma* in our study,
370 in Ikwuano Local Government Area of Abia State, Nigeria, [32]recorded recently higher prevalence of *Babesia*
371 (0.86) than that of *Anaplasma* (0.31). Likewise, in Centre Côte d'Ivoire 55% of steers were infected by *A.*
372 *marginale* whereas 59.33% of them were infected by *B. bovis* [29].

373 Furthermore, a previous study performed in 2003-2004 in North-Benin, using smear tests method, indicated
374 lower prevalence than ours: i.e. 39.5% of surveyed steers (Vs 88.94% in this study) were infected by *A. marginale*
375 and 57% (Vs 63.76% in this study) by *B. bigemina* [30]. In addition, Pastanza [31] reported in this area (i.e. North
376 Benin) 57.89% of cattle infection by *B. bigemina* in 2011. Interestingly, lower prevalence of *Boophilus* pathogens-
377 borne disease were recorded based on survey of August-October in 1987 and 1988: 25%, 20.83% and 14.58% of
378 the 368 cattle blood sampled were infected by *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis* respectively [43]. Possible
379 increase of hosts susceptibility or pathogens virulence could be the reasons of such differences, though the
380 number and races of the cattle surveyed in the compared studies might induce these results.

381 Besides, since current prevalence of *B. bovis* in North-Benin is higher than in past studies and given that *R.*
382 *microplus* is known to be a better competent vector, therefore, we check the possibility of recent new

introduction of *B. bovis* through *R. microplus* introduction in Benin. Prior to that it is noteworthy to underline that the review of past researches published in West Africa concerning *B. bovis* indicated that first infections to cattle were encountered before 1990's and its prevalence was even sometimes superior to that of *B. bigemina* (e.g. in Benin 0.31 for *B. bovis* and 0.14 for *B. bigemina*) [43–45]. However, in begin of 2000's most of tick-borne pathogens studies didn't report the presence of this Babesia [30,42] until the introduction of the invasive tick, *R. microplus*. Further to this introduction, some mortalities of bovines due to suspect cases of babesiosis caused by *B. bovis* were recorded in Benin (Maxime Madder, personal Communication) as when animals get first contact with a virulent pathogen. Thereafter, in 2011 an epidemiologic study determined a prevalence of 0.24 of *B. bovis* on 210 bovines at the national scale with a variation of 0.09 (Atacora, North-Benin) to 0.58 (Zou, towards the Centre Benin) [31]. The same study highlighted a positive correlation between the invasive tick and *B. bovis* [31]. Thus, *R. microplus* would have been introduced into Benin with strains of its vectored pathogens, *B. bovis*, just like it was the case in South Africa [22].

395

Variation in *Boophilus* tick-borne pathogens assemblage and host susceptibility

Tick-borne pathogens are not homogeneously distributed in the eight herds (Fig 3). Herds 1A and 1K presented singular pattern due to most frequent *B. bovis* infection (Figs 2 and 3). Within the others herds, most infection of *A. marginale* (i.e. 2O, 3F), *B. bigemina* (i.e. 1O, 2G, 3O) or both *A. marginale* and *B. bigemina* (i.e. 3K) recorded drove pathogens assemblage. Such variability in these blood-associated pathogens assemblage could be derived from host characteristics and not interspecific interactions [46]. The diversity of cattle race involving in our study reinforce this hypothesis.

Furthermore, the significant difference ($P<0.05$) arisen from comparison of *A. marginale* and *B. bovis* infected animal's percentage between areas (Table 1) could also indicate variation in the cattle susceptibility among areas. As the monitored steers were not all from the same breed, and given that West Africa hold a great bovine genetic diversity [47], surveyed steers' immune reaction could be different. For instance, Zebu, as that sampled in South-West of Burkina Faso, is known to be less susceptible to babesiosis than taurine cattle and to display less sever

clinical symptoms whenever babesiosis occurs [48]. Indeed, less animal were infected by *B. bovis* in herds within South-West of Burkina Faso than elsewhere (Fig 2). Such variation of *Bos taurus* and *Bos indicus* susceptibility regard to *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis* was investigated [40]. Results revealed that *Bos indicus* was less sensitive than *Bos taurus* [40]. Moreover, variation of susceptibility between *Bos taurus* and *Bos indicus* to tick infestation was shown to lay on differentiation of genes involved in innate inflammatory processes [49]. It is noteworthy that parasites co-infection affects host susceptibility even within a subpopulation [50]. Herein, parasites co-infection variation among hosts could influence hosts susceptibility variation. In other words, steers from the different areas may be co-infected with variable degrees or with variable prevalence as observed among areas in the present study (Table 2).

417

***B. bovis* in herds of Benin and Burkina Faso: did cattle subvert to infections?**

B. bovis, the most virulent babesia [51] would be more virulent for West African cattle. However, in spite of non-zero prevalence (Fig 2) of this *Boophilus* tick-borne pathogen registered in the herds of both Benin and Burkina Faso, neither clinical case nor surveyed steers mortality was encountered till the end of the twelve longitudinal survey. Thus, it is possible that steers immunity helped them to escape from babesiosis caused by *B. bovis*. But steers could also have been infected by multiple *B. bovis* strains, which competition enhanced animals' survival. Such intraspecific competition enhancing host survival was observed with the causal agent of human African sleeping sickness, *Trypanosoma brucei* [52]. In this case the explanation of the results could base on: resource competition, direct allelopathic interference competition or immune-mediated apparent competition [52]. However, given that steers were not only infected by *B. bovis*, tick-borne pathogens interspecific competition helping host to more survived in the case of multiple-infection could also explain our results [53]. In this latter cited work, authors demonstrated that concurrent *Strongyloides ratti* and *Trypanosoma brucei* infection resulted in the prolongation of the life span of host (Onah et al 2004). Immune responses would be the mainly mechanism of such result [53].

432

Interactions between *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis* in herds of Benin and Burkina Faso

Mainly, negative interaction between *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* was highlighted in this study, though at regional scale, only avoidance between *A. marginale* and *B. bigemina* were revealed (Fig 4). Thus, these tick-borne pathogens seemed to avoid each other according to areas/herds where analyses were possible. In others words, pathogens studied are mainly in competition on the contrary to their vectors which were demonstrated to be aggregative [28]. Pathogens' competition could be due to cross-immunization or resource competition [54]. Interestingly, it could help animals to more survive than in case of single infection [53] or other pattern of interactions. Since any animal mortality was not observed during current study, in spite of non-zero prevalence of the most virulent *Babesia*, *B. bovis*, we assumed that such competition might be useful to the steers. However, the three tick-borne pathogens targeted in this study might not be the only one which contributed to the extending of the steers' life span. Otherwise, other pathogens transmitted by other tick species (e.g. *Amblyomma variegatum*) could also be in cause.

Besides, even if it was marginal, positive interaction between *B. bovis* and *A. marginale* was observed within South-Benin when the three studied pathogens prevalence reached its highest value (i.e. area#1) (Fig 4). Cooperation between pathogens where the immunocompromising by one agent opening the way to infection by the other could explain positive association observed here [54,55]. However, since both pathogens are vectored by the same *Boophilus* species, identical ecological needs could also lead to such aggregative interaction [54].

Another explanation of this interaction could be the immunosuppressive effects such as that observed with rodent babesioses and other parasites in mice or with anaplasmosis and louping ill virus in sheep and goats [56]. The pattern of the interaction between pathogens could influence disease epidemiology or the host survival [53] and consequently the disease control strategy. Unfortunately, interactions between cattle blood parasites were scarcely studied, particularly in West Africa. Researches achieved there focused in majority on single or co-occurred prevalence of parasites [29,32,42]. Therefore, current work is the first one in West Africa dealing with *Boophilus* tick-borne pathogens interaction. But deep analyses are now needed to more understand the mechanism involving in revealed interactions.

Worldwide, researches focusing specifically on interactions between babesiosis and anaplasmosis pathogens agents transmitted by *Boophilus* ticks didn't yet exist. But others vector-borne pathogens interactions researches

were achieved, including sometimes at least one of the *Boophilus* tick-borne pathogens studied here. For instance, in Algeria, absolute exclusion between *T. annulata* and *B. bovis*, strong avoidance between *T. annulata* and *A. marginale* and a moderate one between *A. marginale* and *T. orientalis* within cattle, were demonstrated [54]. On the contrary, positive interaction was reported within mice between *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* [55]. Indeed, authors of this work demonstrated that antibody response to *A. phagocytophilum*, but not *B. burgdorferi*, decreased when coinfection occurred [55].

Variation of relationships between *Boophilus* tick-borne pathogens and vectors according to *R. microplus* history of invasion

It is noteworthy to recall the chronology of invasion of *R. microplus*: it was imported in South Benin in 2004 (area #1), colonized North-Benin (area #2) between 2004 and 2011 but was firstly detected in South-West Burkina Faso (area#) in late 2011, i.e. a few months before the start of the present survey. Positive correlations were noticed between *B. bovis* prevalence and *R. decoloratus* abundance as well as between *B. bovis* prevalence and *R. microplus* abundance in area #1 (Table 3). Thus, variations in prevalence of *B. bovis* sounded to be driven by the variation in *R. microplus* abundance as well as that of *R. decoloratus* in South Benin. Positive correlation was also previously evidenced between *B. bovis* and *R. microplus* in 2011 in Benin [31]. *R. microplus* introduction in Benin was achieved with like in South Africa [22] but this positive correlation is worrying. Since *R. microplus* present high abundance in several sites/areas in Benin [28,33], this result is in fact more worrying. Because *B. bovis* is an acute infection resulting in more severe disease of cattle – though, fortunately, it was not the case with the surveyed steers – and in Benin, as in most West African countries, breeding lay in 95% on agro-pastoral system with low input [57]. Interestingly, in areas #2 and #3 where the presence of *R. microplus* is more recent than in area #1 [26,27,33] no significant correlation was evidenced between *B. bovis* and *R. microplus* abundance. Moreover, negative correlation was noticed between *BoophNsp* (i.e. *Boophilus* ticks which were not identified on species level because their mouthparts were damaged) abundance and *A. marginale* (within #area1+#area2). But within area#2 results revealed positive correlation between *BoophNsp* and *B. bigemina*. Given that ticks species

485 included in this group could be variable any conclusion done here would only be speculation. However, these
486 results point out the necessity of a good field job in order to facilitate tick species identification.
487 Besides, since the way of transmission is not the same for the three parasite studied, and as we only focused our
488 analyses on adult tick, relationships between ticks' incidence and that of pathogens were also investigated.
489 Negative correlation was revealed between *B. bovis* and *R. decoloratus* incidences within area #1 (Table 3).
490 Moreover, positive correlation was observed between *A. marginale* and *R. microplus* incidences within area #3
491 (Table 3).
492 Thus, relationships between vectors and pathogens are variable according to areas. Since the cattle breeds reared
493 differ among areas, such a variation may be partly due to variations in susceptibility among breeds. However,
494 climate difference between areas could also lead to such results.
495 To conclude, prevalence pattern between the three blood-associated parasites studied is similar to some of past
496 researches in West Africa. Large prevalence of *A. marginale* are likely related to large apparent period of infection
497 which could be in relation with host susceptibility. This study has shown for the first time that imported Girolando
498 in Benin within the state farms (1K & 2O) reach enzootic stability in *A. marginale* infection. We also demonstrated
499 that tick-borne pathogens assemblage varies according to herds. Furthermore, results suggest that *R. microplus*
500 was co-introduced in Benin with its pathogen: i.e. *B. bovis* like in South Africa. Interestingly, cattle seemed to
501 subvert to babesiosis caused by *B. bovis* within herds from both Benin and Burkina Faso. One of the most
502 attractive result of this paper is the mainly avoidance evidenced between the *Boophilus* tick-borne parasites using
503 samples from West Africa. This main interaction is opposite to that observed with the vectors. Such results open
504 the way to future works focusing on the mechanisms and impacts of these interactions on epidemiology of
505 concerned diseases. Moreover, positive correlation was evidenced between *B. bovis* and *R. microplus*. Given the
506 potential impacts of these two parasites, more attention has to be required in corresponded areas towards
507 breeders and veterinary surgeons.

508

509 **Acknowledgments**

510 We thank the farmers for their kind cooperation to this survey. We also thank M. Pascal YAKA (Direction Générale
511 de la Météorologie du Burkina Faso) for his help in getting climatic data for Burkina Faso. Likewise, we are
512 thankful to Thierry De MEEUS and Frederic STACHURSKI for their advices during the data analyses.

513

514

515 **References**

516 1. de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. Overview: Ticks as vectors of
517 pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2008;13: 6938–6946.

518 2. Guglielmone AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol.*
519 1995;57: 109–119.

520 3. Montenegro-James S. Prevalence and control of Babesiosis in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*
521 1992;87: 27–36. doi:10.1590/S0074-02761992000700003

522 4. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet*
523 *Parasitol.* 2010;167: 95–107. doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.012

524 5. Aubry P, Geale D. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis.* 2011;58: 1–30.

525 6. Futsé JE, Ueti MW, Knowles DP, Palmer GH. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*:
526 Retention of Vector Competence in the Absence of Vector-Pathogen Interaction. *J Clin Microbiol.* 2003;41:
527 3829–3834. doi:10.1128/JCM.41.8.3829-3834.2003

528 7. Uilenberg G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world
529 animal health. *Vet Parasitol.* 1995;57: 19–41. doi:10.1016/0304-4017(94)03107-8

530 8. Aguirre DH, Gaido AB, Vinabal AE, Echaide STD, Guglielmone AA. Transmission of *Anaplasma marginale* with
531 adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. *Parasite.*
532 1994;1: 405–407. doi:10.1051/parasite/1994014405

533 9. Uilenberg G. Notes sur les babesioses et l’anaplasmoses des bovins à Madagascar. IV. Note additionnelle sur
534 la transmission. *Rev Délevage Médecine Vét Pays Trop.* 1970;23: 309–312.

535 10. Kocan KM, de la Fuente J. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.*
536 2003;112: 295–305. doi:10.1016/S0304-4017(03)00018-9

537 11. French DM, Brown WC, Palmer GH. Emergence of *Anaplasma marginale* Antigenic Variants during Persistent
538 Rickettsemia. *Infect Immun.* 1999;67: 5834–5840.

539 12. French DM, McElwain TF, McGuire TC, Palmer GH. Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface
540 Protein 2 Variants during Persistent Cyclic Rickettsemia. *Infect Immun.* 1998;66: 1200–1207.

541 13. Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle.
542 *Infect Immun.* 1990;58: 1117–1119.

543 14. Bock R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 2004;129: S247–S269.

544 15. Zintl A, Gray JS, Skerrett HE, Mulcahy G. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine
545 babesiosis. *Parasite Immunol.* 2005;27: 115–120. doi:10.1111/j.1365-3024.2005.00748.x

546 16. Suarez CE, Noh S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet*
547 *Parasitol.* 2011;180: 109–125. doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.032

548 17. Callow L. Piroplasms. *Animal Health in Australia, Protozoal and Rickettsial Diseases.* Canberra, Australian
549 Bureau of Animal Health, AGPS; 1984. pp. 121–160.

550 18. Callow LL. Some aspects of the epidemiology and control of bovine babesiosis in Australia. *J S Afr Vet Assoc.*
551 1979;50: 353–356.

- 552 19. Callow LL, Hoyte HMD. Transmission Experiments Using *Babesia Bigemina*, *Theileria Mutans*, *Borrelia* Sp.
553 and the Cattle Tick,. *Aust Vet J.* 1961;37: 381–390. doi:10.1111/j.1751-0813.1961.tb03790.x
- 554 20. Dalglish RJ, Stewart NP. Some effects of time, temperature and feeding on infection rates with *Babesia*
555 *bovis* and *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus* larvae. *Int J Parasitol.* 1982;12: 323–326.
556 doi:10.1016/0020-7519(82)90035-2
- 557 21. Akinboade O., Dipeolu O. Detection of *Babesia bovis* infections in *Boophilus geigyi* with egg crushings, larval
558 smears, and haemolymph puncture. *Vet Q.* 1981;3: 143 – 147.
- 559 22. Tønnesen MH, Penzhorn BL, Bryson NR, Stoltz WH, Masibigiri T. Seroprevalence of *Babesia bovis* and
560 *Babesia bigemina* in cattle in the Soutpansberg region, Limpopo Province, South Africa, associated with
561 changes in vector-tick populations. *J S Afr Vet Assoc.* 2006;77: 61–65.
- 562 23. Brito LG, Rocha RB, Barbieri F da S, Ribeiro ES, Vendrami FB, Souza GCR, et al. *Babesia bovis* infection in
563 cattle in the southwestern Brazilian Amazon. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2013;4: 78–82.
564 doi:10.1016/j.ttbdis.2012.08.001
- 565 24. Oliveira MCS, Oliveira-Sequeira TCG, Araujo Jr. JP, Amarante AFT, Oliveira HN. *Babesia* spp. infection in
566 *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;130: 61–67.
567 doi:10.1016/j.vetpar.2005.03.007
- 568 25. Oliveira-Sequeira TCG, Oliveira MCS, Araujo JP, Amarante AFT. PCR-based detection of *Babesia bovis* and
569 *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol.* 2005;35: 105–111.
570 doi:10.1016/j.ijpara.2004.09.002
- 571 26. Adakal H, Biguezoton A, Zoungrana S, Courtin F, De Clercq EM, Madder M. Alarming spread of the Asian
572 cattle tick *Rhipicephalus microplus* in West Africa—another three countries are affected: Burkina Faso, Mali
573 and Togo. *Exp Appl Acarol.* 2013;61: 383–386. doi:10.1007/s10493-013-9706-6
- 574 27. Madder M, Adehan S, De Deken R, Adehan R, Lokossou R. New foci of *Rhipicephalus microplus* in West
575 Africa. *Exp Appl Acarol.* 2012;56: 385–390. doi:10.1007/s10493-012-9522-4
- 576 28. Biguezoton A, Adehan S, Adakal H, Zoungrana S, Farougou S, Chevillon C. Community structure, seasonal
577 variations and interactions between native and invasive cattle tick species in Benin and Burkina Faso. *Parasit*
578 *Vectors.* 2016;9: 43. doi:10.1186/s13071-016-1305-z
- 579 29. Djakaridja B, Kouassi YP, Biego GG, Acapovi-Yao G, Mavoungou J., Kouakou NE. Situation épidémiologique
580 des hémoparasites des bovins dans deux zones d'élevage de la Cote d'Ivoire : cas des anciennes régions des
581 Savanes et de la vallée du Bandama. *Rev Med Veterinaire.* 2014;165: 297–303.
- 582 30. Farougou S, Tassou A, Tchabode D., Kpodekon M, Boko C, Youssao AK. Tiques et hémoparasites du bétail
583 dans le nord-Bénin. *Rev Med Veterinaire.* 2007;158: 463–467.
- 584 31. Patsanza G. Molecular epidemiology of bovine babesiosis in Benin. Prince Leopold Institute of Tropical
585 Medicine. 2012.
- 586 32. Rio N, A O, Kc I, G D-I, Gco O, U O. Prevalence of Haemoparasites in Livestock in Ikwuano Local Government
587 Area of Abia State. *J Fish Livest Prod.* 2013;2014. doi:10.4172/2332-2608.1000109
- 588 33. De Clercq EM, Vanwambeke SO, Sungirai M, Adehan S, Lokossou R, Madder M. Geographic distribution of
589 the invasive cattle tick *Rhipicephalus microplus*, a country-wide survey in Benin. *Exp Appl Acarol.* 2012;58:
590 441–452. doi:10.1007/s10493-012-9587-0

34. Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52: 565–568.
35. Buling A, Criado-Fornelio A, Asenzo G, Benitez D, Barba-Carretero JC, Florin-Christensen M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet Parasitol.* 2007;147: 16–25. doi:10.1016/j.vetpar.2007.03.031
36. Hornok S, Földvári G, Elek V, Naranjo V, Farkas R, de la Fuente J. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.* 2008;154: 354–359. doi:10.1016/j.vetpar.2008.03.019
37. Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 777–782.
38. Costa-Júnior LM, Rabelo ÉML, Martins Filho OA, Ribeiro MFB. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. *Vet Parasitol.* 2006;139: 231–236. doi:10.1016/j.vetpar.2006.02.034
39. Crawley MJ. *The R book*. Chichester, England ; Hoboken, N.J: Wiley; 2007.
40. Bock R, de VOS A, Kingston T, McLELLAN D. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. *Aust Vet J.* 1997;75: 337–340. doi:10.1111/j.1751-0813.1997.tb15706.x
41. Castañeda-Ortiz EJ, Ueti MW, Camacho-Nuez M, Mosqueda JJ, Mousel MR, Johnson WC, et al. Association of *Anaplasma marginale* Strain Superinfection with Infection Prevalence within Tropical Regions. *PLoS ONE.* 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0120748
42. Bell-Sakyi L, Koney EBM, Dogbey O, Walker AR. Incidence and prevalence of tick-borne haemoparasites in domestic ruminants in Ghana. *Vet Parasitol.* 2004;124: 25–42. doi:10.1016/j.vetpar.2004.05.027
43. Pangui L, Salifou S. Enquêtes parasitologiques sur les hémoparasites des bovins transmis par les tiques au Bénin. *FAO World Anim Rev.* 1992;73.
44. Miller DK, Diall O, Craig TM, Wagner GG. Serological prevalence of bovine babesiosis in Mali. *Trop Anim Health Prod.* 1984;16: 71–77. doi:10.1007/BF02239848
45. Ajayi SA, Dipeolu OO. Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *B. bovis* in Nigerian cattle using serological methods. *Vet Parasitol.* 1986;22: 147–149. doi:10.1016/0304-4017(86)90017-8
46. Cohen C, Einav M, Hawlena H. Path analyses of cross-sectional and longitudinal data suggest that variability in natural communities of blood-associated parasites is derived from host characteristics and not interspecific interactions. *Parasit Vectors.* 2015;8: 429. doi:10.1186/s13071-015-1029-5
47. Hanotte O, Bradley DG, Ochieng J., Verjee Y, Hill E., Rege JE. African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science.* 2002;296: 336–339.
48. Chartier C, Itard J, Morel P., Troncy P. *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale*. Editions TEC et DOC. Paris, France; 2000.

49. Piper EK, Jackson LA, Bagnall NH, Kongsuwan KK, Lew AE, Jonsson NN. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;126: 110–119. doi:10.1016/j.vetimm.2008.06.011
50. Cattadori IM, Albert R, Boag B. Variation in host susceptibility and infectiousness generated by co-infection: the myxoma–*Trichostrongylus retortaeformis* case in wild rabbits. *J R Soc Interface.* 2007;4: 831–840. doi:10.1098/rsif.2007.1075
51. Coetzer J, Tustin R. *Infectious Diseases of Livestock*, 2nd edn. Oxford University Press. Cap Town; 2004.
52. Balmer O, Stearns SC, Schötzau A, Brun R. Intraspecific competition between co-infecting parasite strains enhances host survival in African trypanosomes. *Ecology.* 2009;90: 3367–3378. doi:10.1890/08-2291.1
53. Onah DN, Onyenwe IW, Ihedioha JI, Onwumere OS. Enhanced survival of rats concurrently infected with *Trypanosoma brucei* and *Strongyloides ratti*. *Vet Parasitol.* 2004;119: 165–176.
54. Dib L, Bitam I, Tahri M, Bensouilah M, De Meeûs T. Competitive Exclusion between Piroplasmosis and Anaplasmosis Agents within Cattle. *PLoS Pathog.* 2008;4. doi:10.1371/journal.ppat.0040007
55. Holden K, Hodzic E, Feng S, Freet KJ, Lefebvre RB, Barthold SW. Coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* Alters *Borrelia burgdorferi* Population Distribution in C3H/HeN Mice. *Infect Immun.* 2005;73: 3440–3444. doi:10.1128/IAI.73.6.3440-3444.2005
56. Persing DH. The Cold Zone: A Curious Convergence of Tick-Transmitted Diseases. *Clin Infect Dis.* 1997;25: S35–S42. doi:10.1086/516170
57. CORAF/WECARD. *Priorités de recherche pour le développement de l'élevage, de la pêche et de l'aquaculture en Afrique de l'ouest.* Dakar, Sénégal; 2010 p. 92 p.

Supporting information

S1 Table. Number of samples used for PCR. D0= February 2012 and D13= March 2013. *All or a part of Blood samples collected on these dates were not used for PCR due to contamination. Globally, except collection for D2 in the locations of Burkina Faso, number of animal inferior to 12 correspond to dates where contaminations occurred within samples.

S1 Fig. (2 pages) Differences in the estimates of prevalence between diagnostic methods. Histograms refer to prevalence estimates averaged over the 12 months of sampling by areas or by monitored herds. The within herds estimate in infection duration are given in parentheses.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

661

662 **Authors' contributions**

663 ASB, SA, SF, HA, CC designed the study. HA, ASB, SA, SZ coordinated and participated to field sampling, and
664 identified the collected ticks. SA and SZ performed the infection diagnostic from blood smears; ASB, HB and MT
665 performed the molecular diagnostics of infection. ASB and CC performed the data analysis and wrote the first
666 draft. All authors read and approved the final version of the manuscript.

667

Fig 1.

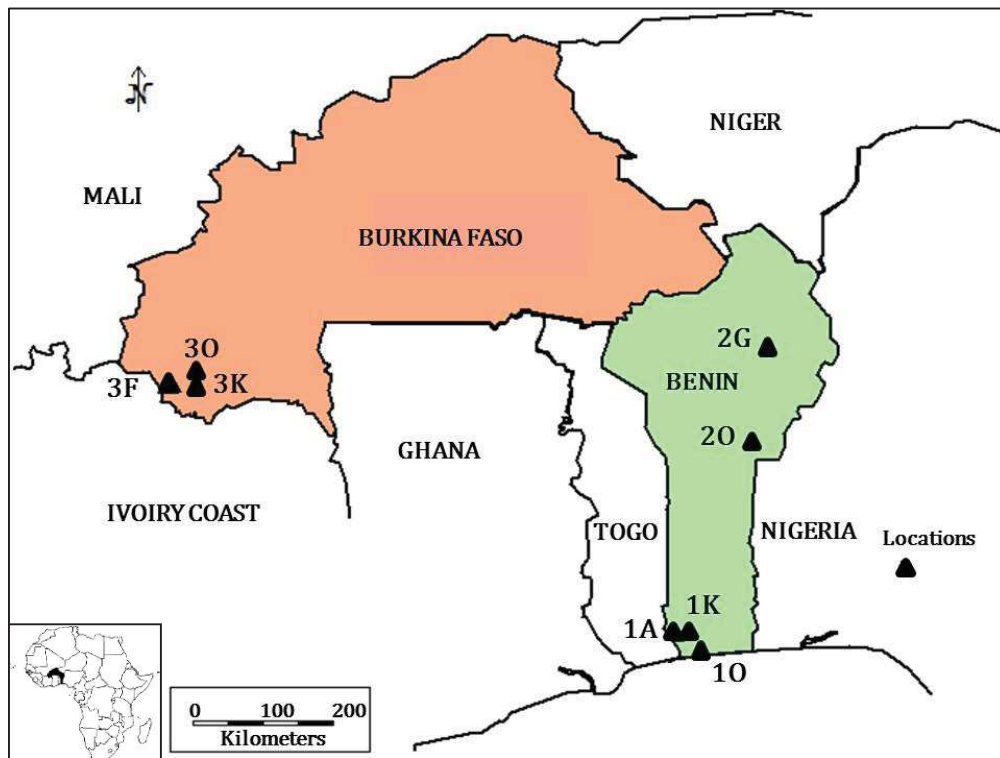
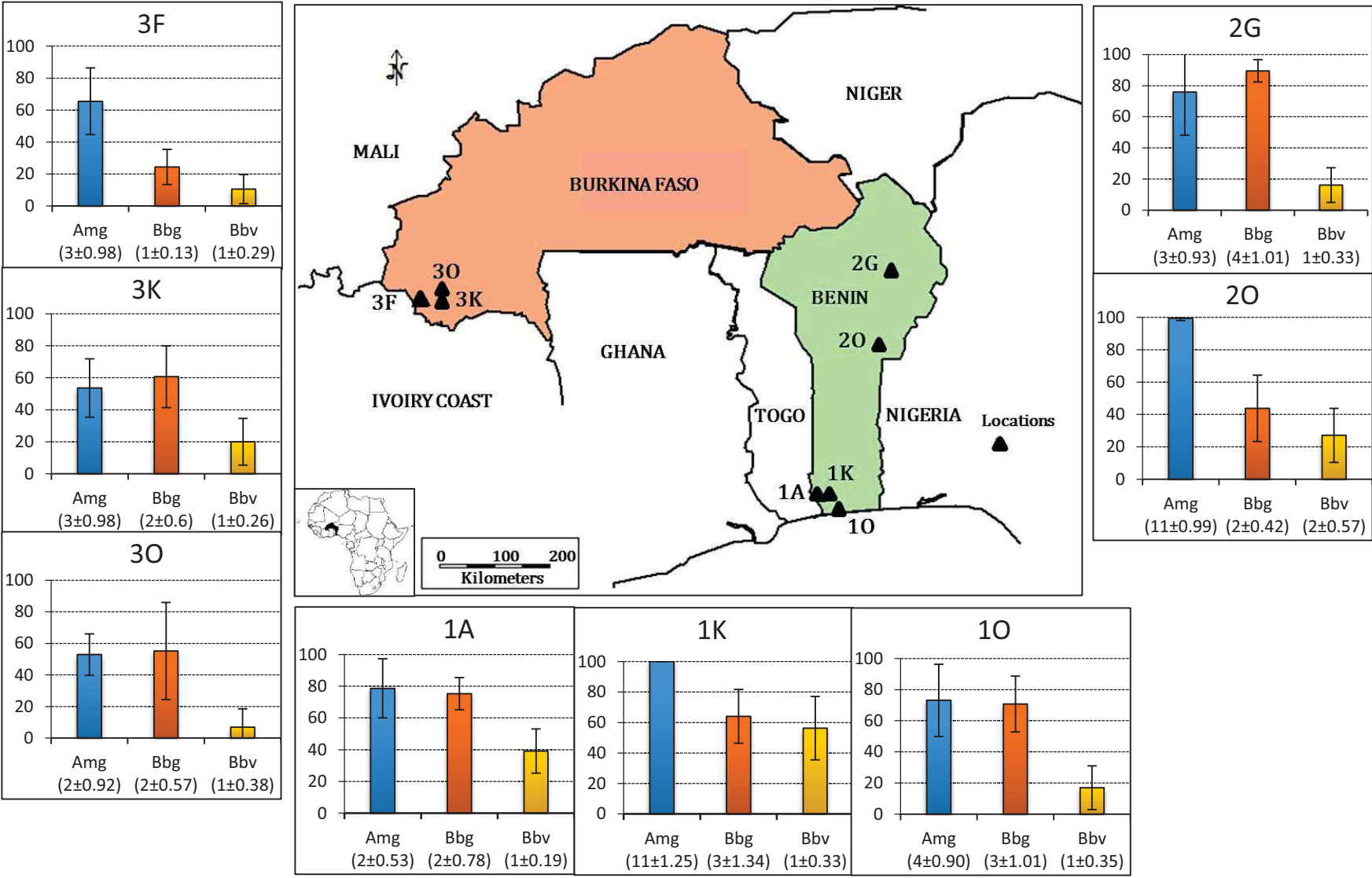
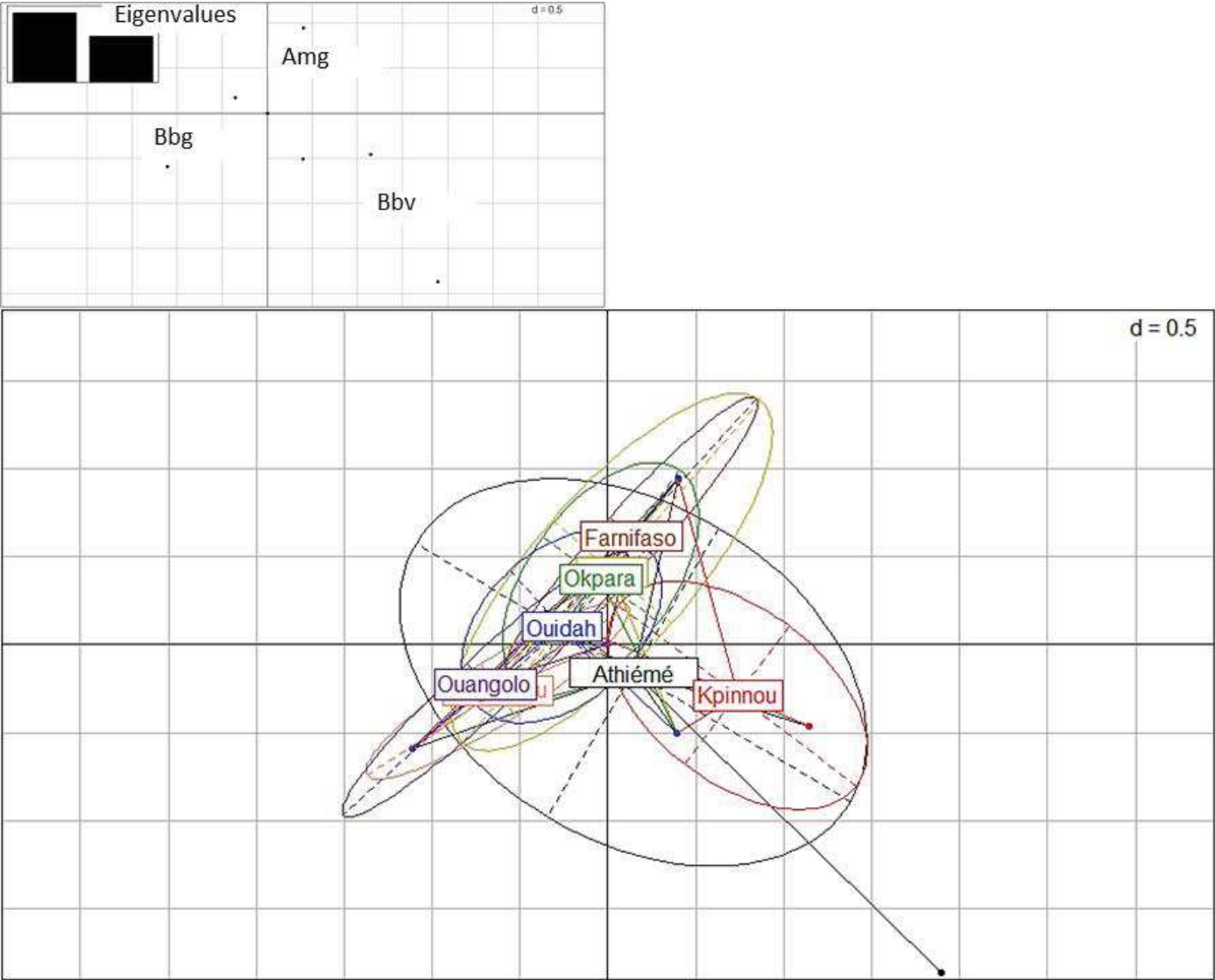


Fig 2.





705

706

707 Fig 4.

708

On \ Impact of	Amg	Bbg	Bbv
Amg		#3 #3^(t1) #2^(t2)	NS NS + #1 (Max. Triple.infect)
Bbg	#3 #3^(t1), 3K^(Max. Abund.) #2^(t2)	NS #1	
Bbv	NS NS + #1 (Max. Triple.infect)	NS #1 #1^(t1, t2)	

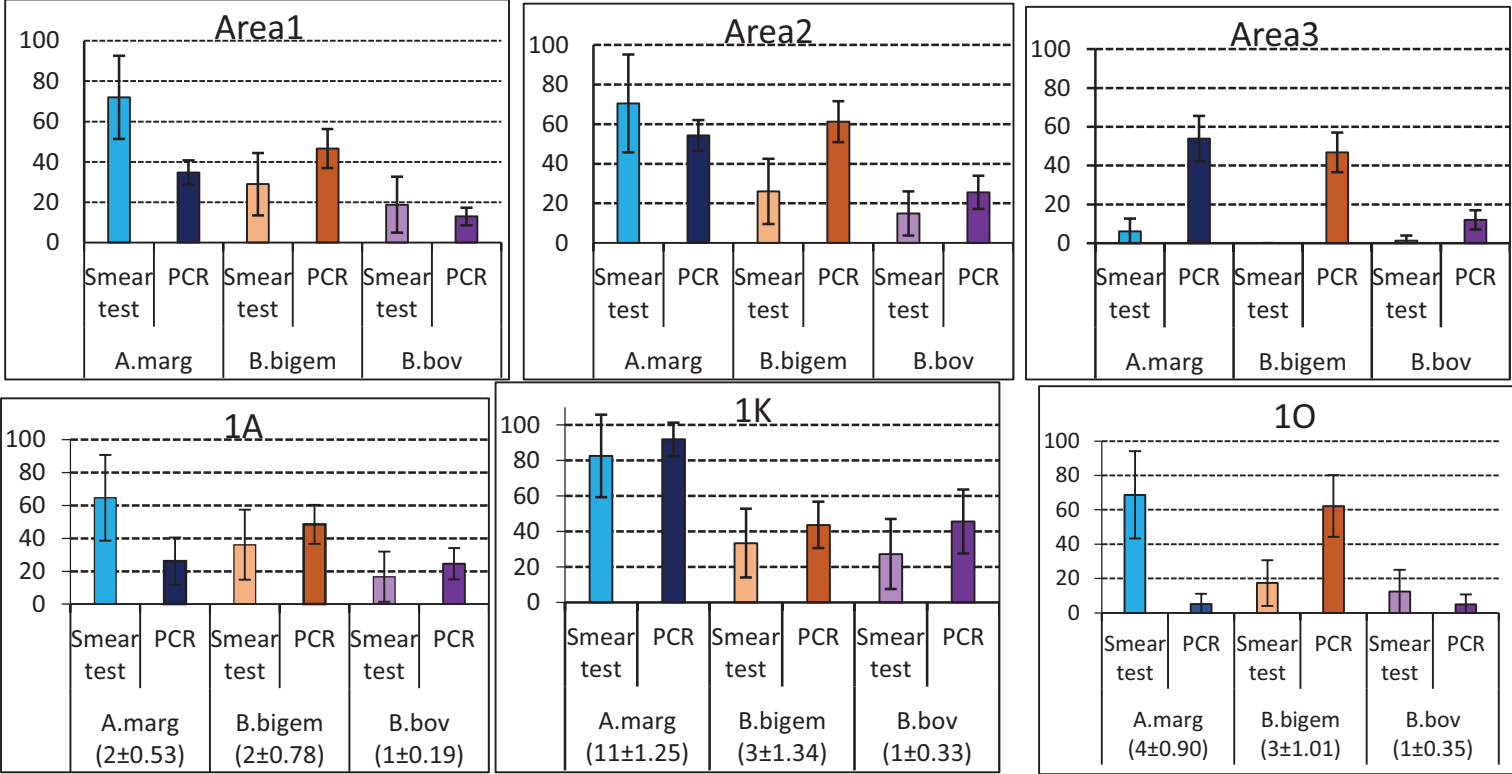
709

Country	Location	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13
Benin	1A	12	12	12	11	4*	12	*	12	6	6	11	12		
Benin	1K	11	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	11		
Benin	1O	12	10	12	12	12	11	12	12	12	12	12	11		
Benin	2G	10	12	12	12	12	12	11	12	*	11	11	12		
Benin	2O	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
	TOTAL	57	58	60	59	52	59	47	60	42	52	57	58		
Burkina Faso	3F			10	10	12	12	12	12	12	12	11	11	12	12
Burkina Faso	3K			10	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12
Burkina Faso	3O			10	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12
	TOTAL			30	34	36	36	35	36	36	36	34	35	36	36

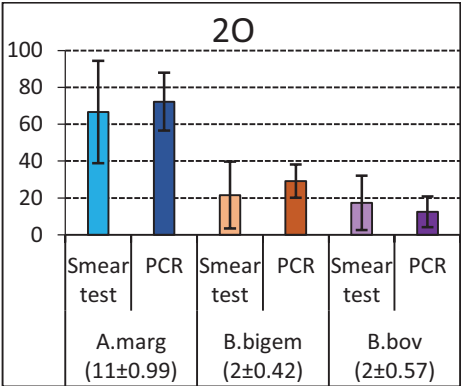
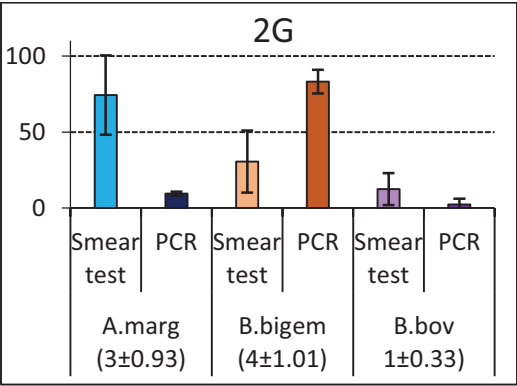
712 S2 Fig.

713

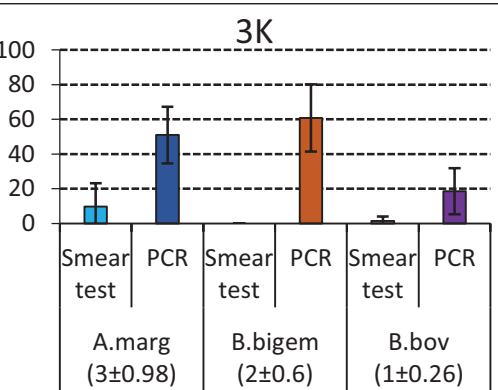
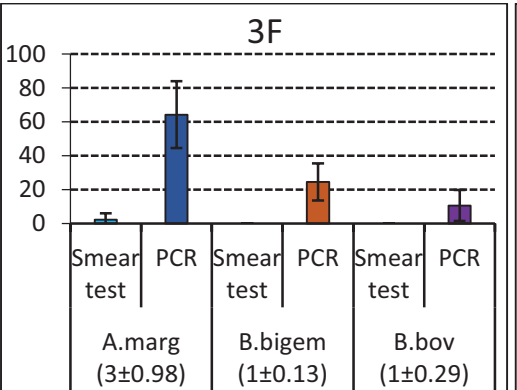
714



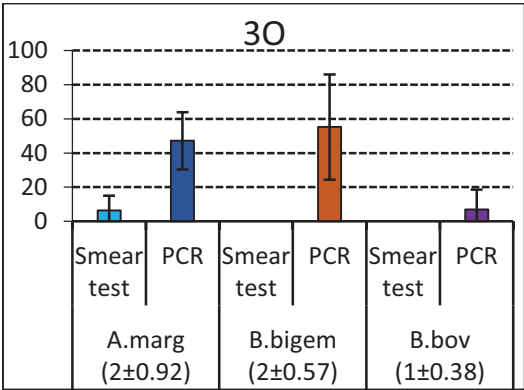
715



716



717



III.3 Probable transmission d'*Ehrlichia ruminantium* par *R. (B.) microplus*

Ces résultats font partie de l'article n° 5 inséré en encart n°5 en page 153

L'explosion démographique de *R. (B.) microplus* documentée en Afrique de l'ouest (cf le chapitre 2 ; l'encart n°2 et les point II.2 et II.3) augmente les risques locaux pour la santé du bétail ne serait-ce que du simple fait des effets délétères directs de cette espèce sur son hôte (Frisch 1999). Par ailleurs, cette explosion démographique augmente le taux de contact de cette tique avec des agents pathogènes généralement transmis par des tiques natives d'Afrique de l'ouest. Quel peut être l'impact de cette augmentation de taux de contact sur la circulation de ces agents pathogènes ?

Nous avons documenté cette question pour l'agent pathogène le plus surveillé d'Afrique de l'ouest : *E. ruminantium*. Des travaux antérieurs réalisés au Bénin et au Burkina Faso avaient révélé que la prévalence de cet agent pathogène au sein des stades adultes et nymphaux de son vecteur local – *A. variegatum* – était d'environ 10% quelle que soit la zone d'étude au sein de ces deux pays (Adakal 2009; Farougou *et al.* 2012). Nous avons utilisé les méthodes classiques de PCR diagnostic [i.e., PCR ciblant le locus *pCS20* ; (Martinez *et al.* 2004)] sur 24 adultes *R. (B.) microplus* qui avaient été collectés sur des bovins du Bénin, du Burkina Faso et de Côte d'Ivoire et avons détecté de l'ADN d'*E. ruminantium* au sein de sept de ces adultes soit au sein de 29.17 % de notre échantillonnage.

N'avait-on détecté que l'ADN de l'agent pathogène (du fait par exemple de digestion incomplète d'un repas de sang prélevé sur un bovin infecté) ou ces tiques étaient-elles réellement infectées ? Pour répondre à cette question, nous avons saisi l'opportunité offerte par l'existence d'élevages de souches de *R. (B.) microplus* au CIRDES et du fait que le bovin utilisé pour élever la souche *KIMINI* s'avérait être infecté par *E. ruminantium*.

La méthode classique de diagnostic par PCR révéla l'ADN de l'agent pathogène sur chacune des quatre femelles *KIMINI* après gorgement sur le bovin infecté ainsi que sur les descendants de chacune d'entre elles, tant au stade œuf que larvaire. Ces résultats confirment donc l'infection de *R. (B.) microplus* par *E. ruminantium* mais indiquent également une forte probabilité de transmission verticale. Etant donné qu'*Ehrlichia mineirensis*, une nouvelle espèce d'*Ehrlichia*, a récemment été isolée de l'hémolymphe d'une tique *R. (B.) microplus* récoltée sur un bovin au Brésil (Cruz *et al.* 2012), il s'est avéré nécessaire de réaliser des



analyses de séquences du locus *pCS20* pour confirmer nos résultats de diagnostic. Après quelques difficultés d'obtention de séquences, nous avons réussi à obtenir des séquences de ce locus à partir des œufs d'une de ces quatre femelles. Ceci nous a permis d'écarter l'hypothèse de détection d'*E. mineirensis* et donc de confirmer nos résultats quant à la susceptibilité d'infection par *E. ruminantium* des femelles *KIMINI* et de leur efficacité de transmission de cet agent pathogène à leurs descendants. Dès lors, en supposant que ces propriétés s'étendent à la plupart des génotypes de *R. (B.) microplus* présents en Afrique de l'ouest, l'invasion de cette région par *R. (B.) microplus* entraîne donc une modification profonde du mode d'évolution de cet agent pathogène (d'une transmission quasi-strictement horizontale à un mélange de transmission horizontale via son vecteur ancestral à une transmission verticale au sein de *R. (B.) microplus*, Cf **Encart n° 5**).



Encart N°5: Biguezoton A, Noël V, Adéhan S, Adakal H, Zoungrana S, Farougou S, Chevillon C. *Ehrlichia ruminantium* infects *Rhipicephalus microplus* in West-Africa.
Accepté pour publication dans Parasites & Vectors en tant que ‘short note’.

***Ehrlichia ruminantium* infects *Rhipicephalus microplus* in West-Africa**

Abel BIGUEZOTON ^{1,2,3,*}

***corresponding author**

Email: babels005@yahoo.fr

Valerie NOEL ^{3,5}

Email: valerie.noel@ird.fr

Safiou ADEHAN ¹

Email: adehankarim@yahoo.fr

Hassane ADAKAL ⁴

Email : hassaneadakal@yahoo.fr

Guiguibaza-Kossigan DAYO ²

Email: charlesdayo@yahoo.fr

Sébastien ZOUNGRANA ²

Email: zoungranasebastien@yahoo.fr

Souaïbou FAROUGOU ¹

Email : farougou@gmail.com

Christine CHEVILLON ^{3,5}

Email : christine.chevillon@ird.fr

1 : Unité de Recherche en Biotechnologie de la Production et de la Santé Animales (URBPSA) –

Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, Ecole Polytechnique d’Abomey-Calavi, 01 BP 2009,

Cotonou, Bénin

2 : Unité de Recherche sur les bases biologiques de la Lutte Intégrée (URBIO) – Centre International

de Recherche-Développement sur l’Elevage en zone Subhumide (CIRDES) – 559, 3-51 Avenue du

Gouverneur Louveau, 01 B.P. 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

3 : IRD, UR 224 'Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle
(MIVEGEC)

4: Département des Sciences et Techniques de l'Elevage (DSTE/FASE), Université Dan Dicko Dan
Koulodo, BP 465 Maradi, Niger

5 : CNRS, Université Montpellier, UMR 5290 MIVEGEC, Montpellier, France

Abstract

Background

The invasion of West Africa by *Rhipicephalus microplus* along the past decade has changed the ecological situation of the agent of heartwater *Ehrlichia ruminantium* there. Before, its local vector, *Amblyomma variegatum*, was the most abundant tick-species found on livestock. Today, the abundance of the *R. microplus* is one magnitude higher than that of *A. variegatum* in many West-African localities. We investigated the potential of this new ecological situation to impact the circulation of *E. ruminantium* in West-Africa.

Methods

E. ruminantium infections were assessed with the specific PCR-diagnosis targeting the PCS20 region. This screening was applied on a field sampling of 24 *R. microplus* adults, on four females from a laboratory strain that had blood-fed since larvae on one *E. ruminantium*-infected steer as well as on the offspring of these females at egg and larval stages.

Results

The PCR detected *E. ruminantium* in 29% of the field-collected *R. microplus*, *i.e.* twice as much as reported for *A. variegatum* with the same protocol. Regarding the laboratory strain, the PCR-diagnosis performed showed that all females were infected and passed the rickettsia to

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49 their progeny. Sequencing of the PCR product confirmed that the maternally-inherited
50 rickettsia was *E. ruminantium*.

51 **Conclusion**

52 According to the present findings, the invasive dynamic of *R. microplus* in West Africa is
53 currently impacting the local evolutionary conditions of *E. ruminantium* since it offers new
54 transmission roads such as maternal transmission in *R. microplus*.

55
56 **Keywords (4):** *Ehrlichia ruminantium*; transovarial transmission; *Rhipicephalus microplus*;
57 heartwater
58

Background

Ehrlichia ruminantium, an obligatory intracellular rickettsia, is the causative agent of heartwater, a tick-borne disease that circulates throughout sub-Saharan Africa, the Caribbean's and Indian Ocean islands [1]. Heartwater imposes a high economic cost to livestock industries since it induces high mortality (up to 80%) in susceptible animals, especially goats and sheep [2]. *E. ruminantium* is transmitted transtadially by the three-host ticks of the *Amblyomma* genus with transovarial transmission reported only in *A. hebraeum* [3].

In West Africa, the only vector present, *A. variegatum*, was the most abundant tick-species encountered on livestock [4-6] until the accidental introduction of *Rhipicephalus microplus* in the early 2000s [7]. The newly introduced tick was so successful to invade this region that its abundance is currently one magnitude higher than that of *A. variegatum* in many West African localities [8]. As a result, *R. microplus* is currently representing more than 60% of the cattle tick-burden [8, 9] and is expected to frequently face *E. ruminantium*-infection risk in West Africa where the prevalence of *E. ruminantium* ranges from 39 to 61% in cattle and from 28 to 51% in sheep and goats [10, 11]. Noting that *E. ruminantium* was successfully cultured in *R. microplus* cell-lines [12] and that natural *E. ruminantium* infections of *R. microplus* were reported in the Caribbean's [13], we investigated the ability of *E. ruminantium* to successfully infect the *R. microplus* ticks present in West Africa.

Methods

We started the screening of *E. ruminantium* infection with a sample of 24 *R. microplus* adults collected in Benin (N = 7), Burkina Faso (N = 11) and Côte d'Ivoire (N = 6). We then detected *E. ruminantium* infection in one of three steers entering into the facilities of the

International Center for Research - Development on livestock in Subhumid area (CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso) Freshly-hatched larvae of the KIMINI strain (created by a sample of *R. microplus* collected on cattle at Kimini, Burkina Faso in July 2014) were allowed to complete their parasitic life-cycle on the *E. ruminantium*-infected steer. Five weeks later, four fully-engorged female ticks of the KIMINI strain were allowed to lay eggs in individual vials before preserving them in 70% ethanol until DNA extraction. The descent of each female was divided in two halves in order to be preserved in 70% ethanol either as eggs or as freshly hatched (<15 days-old) larvae.

Ticks were washed with PBS (Phosphate Buffered Saline) buffer before proceeding to DNA extraction using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to manufacturer instructions. *E. ruminantium* infection was detected using the semi-nested PCR targeting the PCS20 genomic region [14]. A template of one field-collected *A. variegatum* specimen that had previously shown to be infected by *E. ruminantium* [4] was used as a positive control. PCR-products were purified and sent to be sequenced (EUROFINS, Ebersberg, Germany). The phylogenetic relationships among the presently acquired sequences and those of reference strains retrieved from GenBank were investigated with the Maximum Likelihood heuristic implemented in MEGA [15].

Results and discussion

The PCR-diagnosis showed the presence of *E. ruminantium* DNA in seven of the 24 field-collected *R. microplus* ticks (Table 1). The same result was obtained for each of the four females of the KIMINI strain that had fed on the infected steer (Table 1). These results could refer to the successful infection of *R. microplus* ticks by *E. ruminantium* and/or to the persistence of undigested DNA of the pathogen in tick blood-meals. This later hypothesis is

107 however ruled out by the detection of *E. ruminantium* DNA in the descent of each laboratory
108 female (Table 1): The female ticks exposed to *E. ruminantium* infection were all successfully
109 infected and able to transmit the rickettsia to their offspring. Even if the specificity of the PCR-
110 diagnosis method was already settled [16–17], we confirmed our results by sequencing the
111 PCR-products obtained from the field-collected *A. variegatum* positive control, one field-
112 collected *R. microplus* adult from Ivory Coast and the descent of the KIMINI females. This
113 provided sequences of high quality (in both forward and reverse directions) except in three
114 egg-pools. The obtained sequences, submitted to GenBank, belonged unambiguously to the
115 *E. ruminantium* species (Fig. 1).

116 Therefore, in KIMINI strain, the evaluation of *R. microplus* mothers that had passed *E.*
117 *ruminantium* to their offspring would be 25% or 100% according to the sequencing or PCR-
118 diagnosis results, respectively. For the sake of comparison, most of the attempts to document
119 transovarial transmission of *E. ruminantium* in *Amblyomma* vectors failed with the exception
120 of one study performed in *A. hebraeum* [3]. In this study, 40 *A. hebraeum* females previously
121 exposed to *E. ruminantium* infection were dispatched in five groups of eight females and the
122 infection status of the progeny produced by each group was evaluated through their ability to
123 induce immunity and/or pathology in the susceptible sheep on which they blood-fed as larvae,
124 nymphs or adults [3]. One of the five groups of offspring (20%) transmitted heartwater as soon
125 as the larval stage but three (60%) induced pathology and/or promoted immunity as adults;
126 such an increase from larval to adult stage was interpreted as an increase of infectivity
127 resulting from the multiplication of the pathogen in the tick-individuals [3].

128 The present results highlight that the recent changes in West-African tick communities that
129 have resulting from *R. microplus* invasion [8, 9] is very likely to impact the circulation of *E.*
130 *ruminantium* in West Africa, and thus the constraints modelling its evolution there. The high

rate of circulation of *E. ruminantium* [10, 11, 20, 21] and the invasive dynamics of *R. microplus* in West Africa [8,9, 18,19] suggested a high rate of contact between these two species in this region. We presently confirmed this expectation by detecting *E. ruminantium* in 29% field-collected *R. microplus* adults that has to be compared to the 10-to 16% reported, with the same protocol, in *A. variegatum* nymphs and adults [20-21]. From then, the possibility of high rate of maternal inheritance in *R. microplus* -presently evidenced in the KIMINI strain of Ivorian origin- can drive some *E. ruminantium* genotypes to strictly adapt to this mode of transmission (i.e., to evolve toward a tick-endosymbiont life-cycle). Complementarily, as *R. microplus* is a one tick-species, the maternal-inheritance of *E. ruminantium* opens the possibility for this invasive species to play a role in heartwater epidemiology. Indeed, it was demonstrated that the repeated multiplication in *R. microplus* cells did not impact the infectivity of *E. ruminantium* for bovine endothelial cells [12]. Moreover, as many sheep breeds are highly sensitive to heartwater, it is noteworthy that *R. microplus* can feed on sheep in experimental settings [22] as well as in Burkina Faso natural conditions [23]. All these data converge to support the hypothesis that the transovarial transmission of *E. ruminantium* in *R. microplus* might profoundly impact heartwater epidemiology in West Africa. To quantify such an impact, it remains to evaluate other parameters such as the efficiency of *R. microplus* to transmit the maternally-inherited *E. ruminantium* to ruminants (mainly sheep and goats) or the possible variation in *E. ruminantium* virulence between this potential vector and the known tick-vector.

List of abbreviations

Not applicable

Ethics statement

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and material

Data supporting the findings can be found in Additional file and Table1.

Funding

This research was funded in part by the Australian AusAid program (AusAID, project WECATiC). AB benefited from a SCAC fellowship from the Embassy of France in Benin and complementary funding from IRD, ARS-USDA (Kerrville, Texas), the International Foundation for Science (<http://www.ifs.se>) and from the International Laboratory of Vector-borne Diseases in West Africa (<http://www.lamivect.net/>) that regroups different laboratories working on vectors and vector-borne diseases in West Africa. The funders had no role in the study design, analysis and interpretation of data, as well as in manuscript writing.

Additional file

Additional file : alignment of the presently acquired sequences with those of Ehrlichia spp references strains

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

179

180 **Authors' contributions**

181 AB and CC designed the study and wrote the first draft. AB, VN and CC conducted the
182 analyses. All authors read and approved the final version of the manuscript.

183

184 **Acknowledgments**

185 We thank all organisms which fund this work.

186

187 **References**

- 188 1. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR.
189 Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order
190 Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*
191 and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and
192 designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia*
193 *phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51:2145–65.
- 194 2. Camus EFJ, Barré N, Martinez D, Uilenberg G. *Heartwater (cowdriosis), a Review*. Office
195 International des Epizooties (OIE). Paris, France; 1996.
- 196 3. Bezuidenhout JD, Jacobsz CJ. Proof of transovarial transmission of *Cowdria ruminantium* by
197 *Amblyomma hebraeum*. Onderstepoort J Vet Res. 1986; 53:31–4.
- 198 4. Farougou S, Kpodekon M, Tchabode DM, Youssao AKI, Boko C. Abondance saisonnière des tiques
199 (Acari: Ixodidae) parasites des bovines dans la zone soudanienne du Bénin: cas des départements de
200 l'Atacora et de la Donga. Ann Méd Vét. 2006;150:145-52.

5. Farougou S, Kpodekon M, Tassou AWY. Abondance saisonnière des tiques (Acari : Ixodidae) parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin : cas des départements du Borgou et de l'Alibori. Rev Afric Santé Prod Anim. 2007; 5:61-7.
6. Grindatto A, Bayala I, Sidibé I, Kanwé A, Mattoni M, Tomassone L. Ticks and tick-borne pathogens in cattle from peri-urban area of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Proceedings of the VI International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens. 2008; 183.
7. Madder M, Adehan S, De Deken R, Adehan R, Lokossou R. New foci of *Rhipicephalus microplus* in West Africa. Exp Appl Acarol. 2012; 56:385–90
8. Biguezoton AS, Adehan S, Adakal H, Zougrana S, Farougou S, Chevillon C. Community structure, seasonal variations and interactions between native and invasive cattle tick species in Benin and Burkina Faso. Parasite Vector. 2016; 9:43
9. Toure A, Diaha C, Sylla I, Kouakou K. Récente reconstitution des populations de tiques prévalant en Côte d'Ivoire. Int J Biol Chem Sci. 2014; 8:566-78
10. Koney EBM, Dogbey O, Walker AR, Bell-Sakyi L. *Ehrlichia ruminantium* seroprevalence in domestic ruminants in Ghana. II. Point prevalence survey. Vet Microbiol. 2004; 103:183–93.
11. Farougou S, Adakal H, Boko C. Evaluation de la prévalence de la cowdriose chez les ruminants domestiques au Bénin. Rev Med Veterinaire. 2013; 164:572–6.
12. Bell-Sakyi L. *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four Ixodid tick genera. J Comp Pathol. 2004; 130:285–93.
13. Robinson JB, Eremeeva ME, Olson PE, Thornton SA, Medina MJ, Sumner JW, Dasch GA. New approaches to detection and identification of *Rickettsia africae* and *Ehrlichia*

- 222 *ruminantium* in *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) Ticks from the Caribbean. J Med
1
2 Entomol. 2009; 46:942–51.
3
4
5
6 224 14. Martinez D, Vachiéry N, Stachurski F, Kandassamy Y, Raliniaina M, Aprelon R, Gueye A.
7
8 225 Nested PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*: use in genetic diversity
9
10 analysis. Ann N Y Acad Sci. 2004; 1026:106–13.
11
12
13
14
15 227 15. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics
16
17 228 Analysis and sequence alignment. Brief Bioinform. 2004; 5: 150–163.
18
19
20
21 229 16. Peter TF, Barbet AF, Alleman AR, Simbi BH, Burrridge MJ, Mahan SM. Detection of the
22
23 230 agent of heartwater, *Cowdria ruminantium*, in *Amblyomma* ticks by PCR: validation and
24
25 application of the assay to field ticks. J Clin Microbiol. 2000; 38:1539–44.
26
27
28
29 232 17. Mahan SM, Simbi BH, Burrridge MJ. The pCS20 PCR assay for *Ehrlichia ruminantium* does
30
31 not cross-react with the novel deer ehrlichial agent found in white-tailed deer in the United
32 233 States of America. Onderstepoort J Vet Res. 2004; 71:99-105
33
34
35 234
36
37
38 235 18. Madder M, Thys E, Achi L, Touré A, De Deken R. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a
39
40 most successful invasive tick species in West-Africa. Exp Appl Acarol. 2011; 53:139–45.
41 236
42
43
44 237 19. Adakal H, Biguezoton A, Zoungrana S, Courtin F, De Clercq EM, Madder M. Alarming
45
46 spread of the Asian cattle tick *Rhipicephalus microplus* in West Africa—another three
47 238 countries are affected: Burkina Faso, Mali and Togo. Exp Appl Acarol. 2013; 61:383–86.
48
49
50 239
51
52
53 240 20. Faburay B, Münstermann S, Geysen D, Jongejan F. A Contribution to the Epidemiology of *Ehrlichia*
54
55 *ruminantium* Infection (heartwater) in Small Ruminants in the Gambia. Animal Health Research
56 241 Working Paper 4. ITC (International Trypanotolerance Centre). Banjul, Gambia; 2004.
57
58 242
59
60
61
62
63
64
65

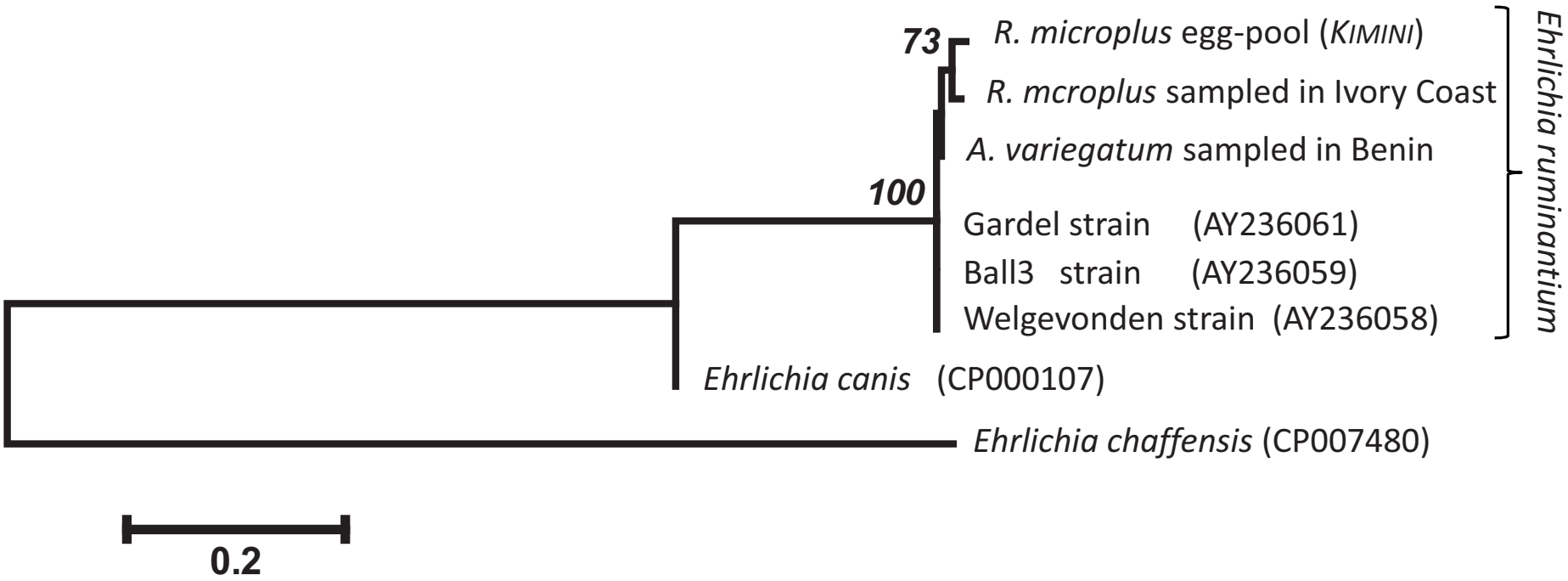
- 243 21. Farougou S, Adakal H, Biguezoton A., Boko C. Prévalence de l'infection d'*Amblyomma*
244 *variegatum* par *Ehrlichia ruminantium* dans les élevages extensifs du Bénin. Rev Med
245 Veterinaire. 2012; 163:261–6.
- 246 22. Garcia M, Andreotti R, Reis F, Aguirre A, Barros J, Matias J, Koller W. Contributions of the
247 hair sheep breed Santa Ines as a maintenance host for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
248 (Acari: Ixodidae) in Brazil. Parasit Vectors. 2014; 7:515.
- 249 23. Biguezoton AS, Invasion biologique & écologie de la santé vétérinaire : Le cas des communautés
250 de tiques et pathogènes associés au Bénin et au Burkina Faso à l'heure de leur invasion par la tique
251 du bétail *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. PhD thesis, University Abomey-Calavi, Benin. 2016;
252 274 pages

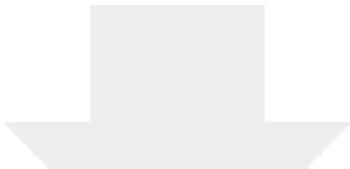
Figure1- Phylogenetic relationships between the presently acquired sequences and reference strains (GenBank accession numbers in parentheses) using maximum likelihood. Obtained sequences were submitted to GenBank; but accession numbers have not yet been given. A discrete Gamma distribution with invariant sites ($G=2.38$ and $I= 6.55\%$) was used to model evolutionary rate differences among sites. Branch numbers indicate percent bootstrap support (5,000 bootstraps). The scale bar is in units of substitution/site.

259 **Table 1.** Detection of *E. ruminantium* in *R. microplus* ticks

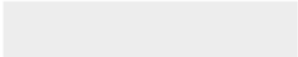
Sampling origin		Number of positive cases obtained via	
		PCR	PCS20 sequences
Field sampling			
Benin	(N = 7)	3	NA
Burkina Faso	(N = 11)	2	NA
Ivory Coast	(N = 6)	2	1 obtained out of 1 attempt
KIMINI strain			
Engorged females	(N = 4)	4	NA
Egg pools	(N=4)	4	1 obtained out of 4 attempts
Larval pools	(N=4)	4	NA

260





Click here to access/download
Supplementary Material
additional file-PCS20 alignement.txt



Chapitre 4 : Apport de l'analyse de la génétique des populations de *R. (B.) microplus*

Ces résultats font partie de l'article de l'article n°6 inséré en encart n°6 en page 174

Il est impératif de trouver des méthodes de lutte efficaces contre *R. (B.) microplus* en Afrique de l'ouest. Mais pour optimiser les stratégies de lutte, il paraît important de mieux comprendre les mécanismes populationnels mis en jeu dans l'invasion en cours. Autrement dit, il faudra déterminer entre autres : (i) l'unité démographique de la tique, (ii) les tailles efficaces des populations et leur variation, (iii) de potentiels signaux d'isolement par la distance, etc. Ceci permettra de décider où et quand il est plus rentable de concentrer les actions de lutte chimique. Des travaux antérieurs basés sur des loci microsatellites (SSRs) en Afrique du sud (Boucher 2013) et en Nouvelle Calédonie (Koffi *et al.* 2006a) ont permis de mettre en évidence des mécanismes populationnels mis en jeu par la tique invasive dans chacun de ces pays (Cf. le point III.3 du chapitre 1). Nous avons donc dans un premier temps vérifié la pertinence des marqueurs utilisés, au cours de ces deux études, pour étudier la génétique des populations de *R. (B.) microplus* de l'Afrique de l'Ouest. Malheureusement, seuls deux des marqueurs existants (i.e. BmC07 et BmA05) fournirent des résultats satisfaisants (i.e. au moins 60% de taux d'amplification) sur 20 tiques récoltées dans la ferme de Kpinnou au Bénin. Il fallut donc entreprendre le développement *in silico* de nouveaux marqueurs SSRs appropriés à l'étude des populations de *R. (B.) microplus* actuellement présentes en Afrique de l'ouest.

A partir des séquences relativement longues (>1000 kb) mais non ordonnées du génome de *R. (B.) microplus* publié dans GenBank (i.e. HM748966 ; HM748962 ; HM748960 ; HM748958 ; HM748967 ; HM748965 ; HM748963) et du logiciel *WebSat* (<http://purl.oclc.org/NET/websat/>) (Martins *et al.* 2009) nous avons identifié des loci SSRs, puis dessiné des paires d'amorces spécifiques. *WebSat* utilise le logiciel *Primer3* (Rozen & Skaletsky 2000) pour le *design* des paires d'amorces. Cette recherche *in silico* nous a permis d'identifier une cinquantaine de marqueurs. Nous avons ensuite réalisé des PCR et amélioré les conditions d'amplification pour les marqueurs les plus prometteurs (i.e. au moins 60% de taux d'amplification et facilité de lecture des génotypes). Au total, dix marqueurs microsatellites ont donné de meilleurs résultats et nous les avons retenus. Il s'agit de L01, L03, L03bis, L22, L26, L29, L33, L37, L40 et L47 (Cf. **Encart n° 6** pour détails). Parmi ces dix



marqueurs, cinq ont été validé et utilisé au cours de cette étude. A ce lot ont été rajoutés deux marqueurs des travaux antérieurs pour l'étude de la génétique des populations de *R. (B.) microplus* du Bénin et du Burkina Faso.

Au total 447 tiques récoltées en juillet 2012 au Burkina Faso et de février à juillet 2012 au Bénin ont été étudiées. Les tiques ont été récoltées sur 20 individus-hôtes (i.e. vaches) appartenant à sept troupeaux (cinq au Bénin et deux au Burkina Faso). Dans chaque troupeau trois vaches étaient considérées à l'exception du site Gogounou (nord Bénin) où deux vaches ont été prises en compte. De plus, des tiques provenant d'un mouton et de deux sites dans la végétation vers le centre du Bénin ont été incorporées au jeu de données. Ces dernières collectes ont aussi été réalisées en juillet 2012. Les tiques collectées sur le mouton ont été considérées comme provenant d'un troupeau unique et celles collectées dans les deux sites de végétations comme appartenant à un autre troupeau. Ce qui ramenait à neuf le nombre de troupeaux étudiés. A quelques exceptions près nous avons tenu compte d'un sexe-ratio 1:1 dans notre jeu de données (Cf. **Encart N°6**). La taille de nos populations de tiques par individu-hôte est de $15 \leq N \leq 20$.

A l'aide des logiciels Fstat *version* 2.9.3.2 (Goudet 1994), MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004), BAPS4 (Corander *et al.* 2008), BOTTLENECK (Piry *et al.* 1999), GENEPOP *version* 3.4 (Raymond & Rousset 1995) et du package HierFstat (Goudet 2005) nous avons analysé la congruence de nos marqueurs SSRs, les estimateurs de F-statistiques, la présence d'éventuels allèles nuls ou d'effet Wahlund, l'unité démographique des tiques, de potentiels biais de dispersion par sexe, les tailles efficaces, d'éventuels goulot d'étranglement (Cf. **Encart n° 6** pour détails). Toutes ces analyses nous ont ainsi permis de mieux appréhender les mécanismes populationnels mis en œuvre par *R. microplus* au cours de son invasion en Afrique de l'ouest, notamment au Bénin pour qui nous disposons d'un jeu de données plus complet.

Malgré que deux des nouveaux marqueurs développés présentaient des déficits d'hétérozygotes élevés ($F_{is}=0.4$ pour L22 et L33) et des déséquilibres de liaisons, les résultats des analyses réalisées en les enlevant des jeux de données n'étaient pas différents de ceux réalisées avec, si ce n'est que l'analyse perdait de la puissance. Cependant, pour la limite d'une population, en plus du niveau troupeau, qui a été démontré significatif pour l'ensemble des données et pour celle du Bénin avec les sept marqueurs, lorsqu'on enlève les



marqueurs L22 et L33 du jeu de données, le niveau individu-hôte (infrapopulation) devient en plus significatif pour l'ensemble du jeu de données et pour le Burkina Faso. Par ailleurs, les résultats indiquent une différenciation génétique significative entre les populations de tiques du Bénin et du Burkina Faso. Ceci, en plus des données géographiques entre le sud-ouest du Burkina Faso et la Côte d'Ivoire d'une part et le sud-ouest du Burkina Faso et le Bénin d'autre part suggère que les tiques *R. (B.) microplus* du Burkina Faso proviennent de la Côte d'Ivoire. Une étude phylogénétique à l'aide de marqueurs mitochondriaux et incluant des échantillons de ces trois pays auraient pu aider à en savoir plus sur ces populations, si les travaux de Binetruy, Duron & Chevillon (Communication personnelle) sur des échantillons du Bénin et du Burkina Faso n'avaient pas révélé une quasi-absence de polymorphisme de marqueurs mitochondriaux et de gènes d'endosymbiontes, *Coxiella*-like.

Notons aussi que les populations de la tique invasive des troupeaux du Bénin se sont révélées très proches dans certains cas, même avec des troupeaux distants (i.e. nord-sud) ($F_{st}=0$). Ce qui contraste avec la structuration en fonction de la distance géographique que suggère les résultats d'isolement par la distance. Cet isolement par la distance a d'ailleurs permis d'estimer à 29 600 le nombre de tiques qu'il y aurait par km^2 à Kpinnou et seulement 42.29m la distance qui sépare les parents de leur progéniture dans cette ferme. Ceci rend bien compte de la densité de la tique à Kpinnou (Biguezoton *et al.* 2016) mais explique moins comment les migrations inter-troupeaux proviennent plus de la ferme de Athiémé à côté (au moins 20%) que de Kpinnou ($\sim 1\%$), qui rappelons-le a été le premier site envahi par la *R. (B.) microplus* au Bénin (Madder *et al.* 2012). D'autre part, la taille efficace des populations de cette tique est $N_e > 100$ dans les fermes au sud alors qu'au nord $N_e < 85$. Autrement dit la taille efficace des populations du front d'invasion est inférieur à celle des populations initiales d'introduction. La variation de la susceptibilité des animaux des troupeaux n'a donc pas influencé cet attendu. En outre, il se pourrait qu'il n'y ait pas eu de goulot d'étranglement au cours de l'invasion du Bénin. C'est-à-dire qu'il n'y aurait pas eu de réduction de la première population de *R. microplus* introduite à travers les bovins Girolando le 24 Novembre 2004. L'absence de quarantaine et/ou de traitement acaricide approprié pourrait bien être à la base d'un tel résultat, même s'il mérite d'être vérifié avec un jeu de données plus robuste. Ces différents résultats impactent sans doute les stratégies de lutte contre la tique. Tout d'abord ils indiquent que les compositions des produits acaricides



devraient être différentes d'une zone à l'autre. Ensuite ils suggèrent qu'il faut traiter tous les animaux d'un troupeau au même moment pour une meilleure efficacité de la lutte. De plus, le nombre d'adulte reproducteurs au niveau du front d'attaque étant plus faible, une lutte ciblée pourrait bien fragiliser l'installation de *R. microplus* au niveau de ce front, le nord Bénin.



**Encart N°6: Biguezoton A, Noël V, Adéhan S, Adakal H, Zoungrana S, Farougou S, Chevillon C. Population genetics of the invasive tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Benin and Burkina Faso (West Africa).
En préparation.**

Population genetics of the invasive tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Benin and Burkina Faso (West Africa)

Abel BIGUEZOTON ^{1,2,3,*}

***corresponding author**

Email: babels005@yahoo.fr

Valerie NOEL ^{3,5}

Email: valerie.noel@ird.fr

Safiou ADEHAN ¹

Email: adehankarim@yahoo.fr

Hassane ADAKAL ⁴

Email : hassaneadakal@yahoo.fr

Guiguigbaza-Kossigan DAYO ²

Email: charlesdayo@yahoo.fr

Sébastien ZOUNGRANA ²

Email: zoungranasebastien@yahoo.fr

Souaïbou FAROUGOU ¹

Email : farougou@gmail.com

Christine CHEVILLON ^{3,5}

Email : christine.chevillon@ird.fr

**1 : Unité de Recherche en Biotechnologie de la Production et de la Santé Animales (URBPSA)
– Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, 01
BP 2009, Cotonou, Bénin.**

- 23 **2** : Unité de Recherche sur les bases biologiques de la Lutte Intégrée (URBIO) – Centre
24 International de Recherche-Développement sur l’Elevage en zone Subhumide (CIRDES) –
25 559, 3-51 Avenue du Gouverneur Louveau, 01 B.P. 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.
- 26 **3** : IRD, UR 224 ‘Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et
27 Contrôle (MIVEGEC), Montpellier, France.
- 28 **4**: Département des Sciences et Techniques de l’Elevage (DSTE/FASE), Université Dan Dicko
29 Dan Koulodo, BP 465 Maradi, Niger.
- 30 **5** : CNRS, Université Montpellier, UMR 5290 MIVEGEC, Montpellier, France.
- 31

Abstract (371 words)

Background

R. microplus, is an invasive tick species associated with the highest economic losses where it occurs. Invasion of West Africa, where breeding is in 95% of case with low input, started in 2000s and was followed by breeder's complaints of acaricide resistance. As a result, research of efficient compounds, including essential oils, of acaricide were engaged in some West African laboratories. Since understanding of population structure could help tick control, this study aimed to investigate processes which play in *R. microplus* invasion in Benin and Burkina Faso.

Materials and methods

As a prerequisite for population genetics studies, prior investigation of reliable tools are needed. Microsatellites (SSRs) markers, to characterise *R. microplus* population of West Africa were developed, leading to the need of new SSRs markers development. New SSRs markers were developed and applied, in addition to two already published markers, on 436 ticks from Benin and Burkina Faso. Subsequently, determination of population limits, population size, and investigation on isolation by distance pattern were achieved using potential population genetics software.

Results

Published SSRs, but two, failed to amplify on ticks from West Africa. Hence, 50 new SSRs markers were determined in silico and five of them were validated and applied for this study. Analyses revealed that herd is the relevant level of population limit in Benin and with the whole dataset. Significant differentiation was highlighted between herds and between *R. microplus* population from Benin and Burkina Faso, though genotypes from some distant herds were closer (i.e. $F_{st}=0$). Migration occurred between herds, as indicated by assignment results and migration rates. Furthermore, it was not evidenced any bottleneck within dataset

and effective size varied from $N_e=52$ (Gogounou) to $N_e=188$ (Kimini1) within herds. In addition, isolation by distance was demonstrated in Benin.

Conclusion

This study shown that there is significant differentiation between *R. microplus* tick populations from Benin and Burkina Faso and suggest that the origin of *R. microplus* population of Burkina Faso could be Côte d'Ivoire. Limit of population is the herd and obviously has to be taken into account in tick control strategies. This point was discussed and advices were provided. However, because of the lower robustness of dataset for some analyses, it was suggested that additional analyses could be conducted with more samples and markers if possible.

Key words: SSRs markers, genetics of population, limit of population, isolation by distance, tick control.

Introduction

In Benin and Burkina Faso, livestock production represents the second contribution after crops to the gross domestic product, without leading to self-sufficiency in animal protein production (Anonymous 2004; FAO 2009). In both countries, semi-intensive farming systems and the use of exotic breeds remain exceptional: 95% of the livestock industry relies thus on extensive and low-input systems (CEDEAO & CSAO/OCDE 2008; CORAF/WECARD 2010). In Benin, half of the livestock production is concentrated in the north-east where herd rotation among communal pastures, post-harvested crops, savannahs and woodlands optimizes the use of the rare grazing resources (Djenontin 2010; Djenontin *et al.* 2012). In north Benin as in Burkina Faso, the seasonal transhumance of part or whole cattle herds to the south in the dry season (and back to north in rainy season) include very long distance movements; i.e. from hundreds to thousands kilometers long (Nianogo & Somda 1999). Traditional farming systems in Burkina Faso also include sedentary systems where cattle, sheep and goats forage together on communal pastures. In such low-input systems, breeders cannot afford expensive tick control strategies for limiting the economic costs due to ticks and tick-borne pathogens (Adakal *et al.* 2013b).

The nature of the tick-associated economic costs for livestock industries has recently changed in both countries. These costs were used to be driven by a three-host species infesting cattle and small ruminants: *Amblyomma variegatum*. This is the most abundant native tick species (Kaboré *et al.* 1998; Farougou *et al.* 2006, 2007, 2012; Grindatto *et al.* 2008), it impairs animal growth (Stachurski *et al.* 1993) and milk yield (Norval *et al.* 1997; Stachurski 2000) and it vectors *Ehrlichia ruminantium*, a virulent pathogen for sheep and goats (Farougou *et al.* 2012). In 2002 and 2004, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*- the tick responsible of the highest economic losses in cattle production worldwide (Frisch 1999)- was incidentally introduced in

Benin and Ivory Coast (Madder *et al.* 2011, 2012). Within a decade, *R. microplus* had invaded West Africa, from Ivory Coast to Togo along the Atlantic Coast, up to Burkina Faso, Mali and the northern border separating Nigeria and Cameroon (Opara & Ezech 2011; Adakal *et al.* 2013a; Musa *et al.* 2014). In late 2011, *R. microplus* outnumbered the three native species belonging to the same *Boophilus* sub-genus in the southern half of Benin (De Clercq *et al.* 2012). A year later, *R. microplus* predominated the entire cattle tick communities in Ivory Coast (Toure *et al.* 2014) as well as in Benin and south-west Burkina Faso (Biguezoton *et al.* in press). In these areas, *R. microplus* adults were present all year around on cattle (Toure *et al.* 2014; Biguezoton *et al.* in press). Across Benin and south west Burkina Faso, the minimum of the monthly abundance of *R. microplus* adults remained below 2 adults/steer (range: 0.4-1.5) but in two state farms (Okpara, north Benin: 4.9 ± 1.1 adults/steer.month; Kpinnou, south Benin: 18 ± 3.7 adults/steer.month; Biguezoton *et al.* in press). Such a monthly abundance peaked in late rainy seasons when it ranged from 15 to 30 *R. microplus* adults/steer in south Benin, from 9 to 39 adults/steer in north Benin but from 23 to 98 adults/steer in south-west Burkina Faso (Biguezoton *et al.* in press). These later results were compelling since they did not support the expectation that the population sizes of the invasive species were lower in the invasion front (south-west Burkina Faso) than in more anciently colonized areas (Benin). Did these unexpected results translate difference in effective population sizes (i.e., in the number of reproducing adults) or to bias related to tick recruitment during transhumance?

The present population genetics analysis was primarily aimed at analyzing the variations in *R. microplus* effective population sizes across Benin and south-west Burkina Faso. This requested first to develop new microsatellite markers which polymorphism allowed deciphering whether the populations of this one-host tick species were delimited by individual steers or cattle herds. The analysis was completed by testing whether in 2012 the populations of the invasive

tick had already reached mutation/drift equilibrium and migration/drift equilibrium in these recently colonized areas.

Materials and Methods

R. microplus ecology in Benin and Burkina Faso

Cattle hosts primarily consist in local breeds of *Bos indicus*, *B. taurus* and hybrids (e.g. zebu white Fulani, Goudali, M'bororo, Lagune, Borgou, Somba) reared in low input systems.

Excepted in south Benin where foraging resources occur all year around, most cattle move south in dry seasons (to Côte d'Ivoire or South-Benin, respectively) to return in rainy seasons (to Burkina Faso and north Benin, respectively).

The herd practices differ in the rare state farms where cattle are enclosed and higher economic resources allowed chemical tick-control programs. Some of these state farms are involved in programs aimed at improving cattle production via the use of exotic cattle breeds. This is the case of Kpinnou (south-Benin) where the importation of Gir and Girolando steers from Brazil resulted in *R. microplus* introduction (Madder *et al.* 2012).

The spatio-temporal variations in the abundance of the native tick competitors have been recently investigated across the cattle herds of Benin and Burkina Faso (Biguezoton *et al.* submitted). The highest heterogeneity in distribution was observed for *Hyalomma* species which are absent from south-Benin. Otherwise, the native competitors consist in two-host and three-host species (*A. variegatum*, *Hyalomma* spp., *Rhipicephalus* spp.) peaking in abundance as adults in early rainy seasons and in one-host species of the *Boophilus* subgenus (*R. annulatus*, *R. decoloratus*, *R. geygyi*) that shared with the invasive tick to peak in abundance as adults in late rainy seasons (Biguezoton *et al.* submitted).

Sampling

One cohort of *R. microplus* adults was sampled from February to July 2012 with the objectives to involve three steers per herd and to collect 10 males and 10 females per individual-steer (i.e., per infrapopulation). These objectives were mostly completed in five cattle herds located in south-Benin (Athiémé, Kpinnou, Ouidah) and north-Benin (Gogounou, Okpara) , excepted in Gogounou where sampling can only involved two infrapopulations (steer # 1560 on which 10 females & 7 males were collected; steer #1564 on which 9 females and 6 males were collected). The Beninese set was completed by the addition of three central Beninese samples collected on July 2012 (**Figure 1**). The first consists in 17 *R. microplus* adults (12 females and 5 males) collected on one sheep at Dassa; this sample was treated as an ‘infrapopulation’ in population genetic analyses. The two remaining samples were collected at Glazoué on pastures mostly foraged by sheep; one consists in 10 males and 10 females while the other consists in 9 females and 6 males. The two later samples were treated as two distinct ‘infrapopulations’ in population genetic analyses.

Tick sampling also involved two cattle herds from south-west Burkina Faso (**Figure 1**). The sampling objectives were almost achieved in Kimini 1 where 9 females and 10 males *R. microplus* adults were collected on each of two steers while 8 females and 10 males adults were collected on a third steer. Similarly, two steers from Kimini 2 lead to samples of 10 males ticks and either 9 or 7 female ticks while a third one allowed collecting 10 adults of either sex.

In silico search for new microsatellite markers

The advances of the genomic sequencing of one *R. microplus* strain of American origin were visible in 2012 through the occurrence of several contigs in GenBank. These contigs

(HM748966 ; HM748962 ; HM748960 ; HM748958 ; HM748967 ; HM748965 ; HM748963)
were screened with the *WebSat* software (<http://purl.oclc.org/NET/websat/>)(Martins *et al.*
2009). This screening was aimed at identifying new microsatellite markers. *Primer3* (Rozen &
Skaletsky 2000), implemented in *WebSat*, helped designing PCR-primers in order to obtain
PCR-products of sizes ranging from 120 bp to 500bp.

Genotyping

Ticks were removed from alcohol (70%), sexed and washed twice in sterile water for five
minutes. Female blood-meal content was removed to avoid blood PCR-inhibitory effects
(Wilson 1997). DNA extraction was performed with DNeasy Tissue Kit (QIAGEN). Genotyping
was processed as previously described (Koffi *et al.* 2006a,b) except for three newly
developed markers which required 5 to 10 additional cycles to ease genotype lectures. PCR
products were then engaged in automatic electrophoresis on ABI PRISM 310 sequencer
pooling 0.15 µL of size standard (GeneScan-500 LIZ, Applera), Hi-Di formamide (13.5 µL QSP),
and 1 µL of the PCR product of each locus. When it was possible, multiplex of loci were done
for automatic electrophoresis.

Evaluation of microsatellite markers

A preliminary Beninese sample of *R. microplus* from Kpinnou was used to evaluate the
efficiency of genotyping for the microsatellite markers that were previously developed on
Pacific or south-African samples (Koffi *et al.* 2006b; Boucher 2013) and/or for the newly
developed markers from *in silico* examination of partial genomic sequences of a American

strain (see above). We retained markers that allowed easy genotype reading in at least 60% individuals from that preliminary sampling.

Population genetic analyses

Genotypic biases

Absence of stuttering errors and large allele dropout (i.e., short allele dominance) was checked using MICRO-CHECKER software (Van Oosterhout *et al.* 2004). Short allele dominance could also change allele frequency estimates (De Meeûs *et al.* 2004).

Hierarchical genetic structure

This analysis was performed without the central samples associated to sheep. HierFstat (Goudet 2005) package in R (<https://cran.r-project.org/web/packages/hierfstat/index.html>) was used to evaluate the relative importance of herds and intrapopulations in *R. microplus* genetic structure. The tests were realised with 10 000 permutations of tick genotypes among intrapopulations within or among herds. These analyses were carried out on the overall sampling performed on cattle as well as the data subsets restricted to either Benin or Burkina Faso. Hierarchical F-statistic was also computed at country and herd levels in order to assess the structure presumably resulting from two independent introduction events (in south Benin and Ivory Coast, respectively).

F-statistics

F-statistics analyses were performed using *FSTAT* software *version 2.9.3.2* (Goudet 1995). Estimates of F_{is} and F_{st} unbiased parameters were computed according to Weir & Cockerham (Weir & Cockerham 1984). F_{is} represents the probability of allele identity between the two alleles born by individuals relatively to that two alleles born by distinct individuals within

214 populations; it is thus a measure of deviation from random union of gametes within
215 infrapopulation (sample) ($F_{is} = 0$ under local panmixia). F_{st} represents the probability of allele
216 identity between two alleles borne by distinct individuals within populations relatively to
217 that of individuals sampled in distinct populations; it is thus a measure of genetic
218 differentiation between infrapopulations ($F_{st} = 0$ under free migration across samples). For
219 per-locus estimates, means and standard errors were computed by jackknifing over
220 populations. The means and standard errors of global F_{is} and F_{st} were computed by
221 jackknifing over loci and confidence intervals by bootstrapping over loci.
222 Hardy–Weinberg equilibrium was tested by performing 10 000 permutations of alleles
223 among individuals within populations. Differentiation between populations was tested using
224 the log-likelihood ratio G (Goudet *et al.* 1996) with 10 000 permutations among samples of
225 individuals genotypes.
226 BAPS4 (Corander & Marttinen 2006) were used to identify possible clustering within
227 infrapopulations and thus to evaluate the possibilities of Wahlund effects and/or sib-
228 clustering within infrapopulations via examining the impact of such a clustering on F_{is}
229 estimates (Chevillon *et al.* 2007).

230 **Sex-biased dispersal**

231 The central samples associated to sheep (Dassa and Glazoué) were removed before
232 investigating the possibility of sex biased dispersal. F_{is} , F_{st} , Alc (i.e. assignment index) and vAlc
233 (i.e. variance of assignment index) tests were used. Analyses were performed with Fstat
234 software (Goudet 1995). The sex that disperses the least is expected to be associated with
235 lower F_{is} , higher F_{st} , higher Alc and lower vAlc. Using bilateral test with 10 000 permutations,
236 statistical analyses were computed according to Goudet *et al.* (Goudet *et al.* 2002).

Assignment and migration

Individual assignment likelihood analysis was carried out with GENECLASS2 software *version 2.0* (Piry *et al.* 2004). This allowed computing the mean individual assignment likelihood of each individual-genotype *i* to each possible source population *s*, and thus the percentages of correct assignments per sample.

Migration rate from one sampling locality to any other was computed using BayesAss software *version 1.3* (Wilson & Rannala 2003). Evidences of migration were also assessed using maximum likelihood method of MIGRATE software *version 3.6.11* (Beerli & Felsenstein 2001).

Population effective size of *R. microplus*

Tick population effective sizes was evaluating using the linkage disequilibrium model of NeEstimator *version 2.01* and considering 0.01 as critical allele frequency (Do *et al.* 2014).

Mutation/drift balance and migration/drift balance (i.e. isolation by distance)

BOTTLENECK software (Piry *et al.* 1999) was used to evaluate whether the sampled *R. microplus* populations were at mutation/drift equilibrium. Given H_e , the expected heterozygosity of a population, let H_{eq} be the heterozygosity that would be expected for a population at mutation/drift equilibrium with the same sampling size and allele number. As allele number decreases faster than heterozygosity when populations size reduced, bottlenecks are signed by $H_e > H_{eq}$ in subsequent generations (Cornuet & Luikart 1996). H_{eq} was determined by assuming infinite allele mutation model, a single-step mutation model and/or a mixed mutation model (Cornuet & Luikart 1996; Piry *et al.* 1999). GENEPOP software *version 3.4* (Raymond & Rousset 1995) was used to investigate the occurrence of a signal isolation by distance between cattle herds. Mantel tests based on

10 000 permutations were carried out to test whether the regression slopes between [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] and the logarithm of geographic distances were positive or null.

Results

Microsatellite polymorphism

Only two previously developed microsatellite markers (BmCO7 and BmA05) met the requirements to produce easily readable genotypes in a minimum of 60% ticks from the preliminary Beninese sample. *In silico* screening identified 50 putative new microsatellite markers. Five of them met the requirements to produce easily readable genotypes in a minimum of 60% ticks from the preliminary Beninese sample (**Table 1**).

No signatures of stuttering or large alleles drop out were evidenced at any of these loci. Marginal significance for linkage disequilibrium was evidenced between L22 and L47 as well as between L33 and L40 ($P = 0.00010$; i.e., slightly lower than the adjusted threshold taking multiple testing into account $P = 0.000104$). However, these signals disappeared when re-performing the analyses on the clusters identified by BAPS 4 rather than on the sampled infrapopulations.

Congruency among markers

Significant heterozygote deficit was evidenced on multi-locus genotypes among infrapopulations ($F_{IS} = 0.161$; $P < 0.0001$) (**Figure 2**). This pattern was separately supported by four individual markers (L22: $F_{IS} = 0.43$; $P < 0.0001$ - L29: $F_{IS} = 0.183$; $P < 0.0001$ - L33: $F_{IS} = 0.405$; $P < 0.0001$ - BmCO7: $F_{IS} = 0.055$; $P < 0.05$) (**Figure 2**). Spearman's correlation computed between F_{IS} values and the null alleles frequencies estimated under the assumption of Hardy-

Weinberg equilibrium were significantly ($P < 0.0001$) positive. If the tick populations were at Hardy-Weinberg equilibrium, then 8% of F_{is} variations would result from null alleles. Computing the values taken by F_{is} values on the clusters identified with BAPS4 resulted nonetheless in the disappearance of all heterozygote deficits but those associated to L22 and L33 (**Figure 2**).

Population structure

There was a significant differentiation between herds ($F_{Herd-total} = 0.008$; $P = 0.001$) but apparently not between infrapopulations within herds ($F_{Host-herd} = 0.011$; $P = 0.08$). This pattern persisted when restricting the dataset to Benin ($F_{Herd-totalBENIN} = 0.001$, $P = 0.001$; $F_{Host-herd} = 0.009$, $P = 0.195$) but not in Burkina Faso ($F_{Herd-totalBF} = 0.002$; $P = 0.20$; $F_{Host-herd} = 0.019$; $P = 0.12$). Interestingly, removing markers L22 and L33 rendered significant the genetic differentiation between infrapopulations within herds both on the entire dataset ($F_{Host-herd} = 0.02$; $P = 0.009$) and on the sampling performed in Burkina Faso ($F_{Host-herd} = 0.02$; $P = 0.018$). Complementarily, the hierarchical analysis evidenced significant genetic differentiation between Benin and Burkina Faso ($F_{countries} = 0.02$; $P = 0.04$). Significant heterozygote deficits relatively to Hardy-Weinberg expectations were observed over infrapopulations ($-0.06 < F_{is_infrapopulation} < 0.325$; $P = 0.0001$) or cattle herds ($-0.06 < F_{is_herds} < 0.292$; $P < 0.0001$). These signals disappeared when the analysis was performed on the clusters identified by BAPS4 ($-0.159 < F_{is_clusters} < 0.088$). Meanwhile, the pairwise estimates of F_{st} among cattle herds remained very low whenever they were significantly non-null (**Table 2**).

Sex-biased dispersal

Even if no linkage disequilibrium was observed between the sex determining locus and any of the microsatellite markers, the values taken by the F_{is} parameter significantly differ between sexes ($F_{is_FEMALES} = 0.09$ *Versus* $F_{is_MALES} = 0.22$; $P=0.0001$). Two other cases indicating higher dispersal in male than in female ticks were observed at Okpara (Alc test; $P = 0.01$) and Kimini1 (Fst test; $P = 0.04$).

Assignment probabilities, population effective sizes and migration pattern

93% of the genotyped ticks were correctly assigned to their sampling infrapopulations according to GENCLASS2. This probability rose to 96.9% or 99.6% when considering the sampling herd or the clusters identified by BAPS4, respectively.

Tick population effective sizes in cattle herds ranged from 52 reproducers in Gogonou to 188 in Kimini1 with most other herds hosting ~100 tick reproducers (**Table 3**).

The local recruitment rates were maximal in Athieme and Kimini2 (over 99% and equal to 98%, respectively) and ranged from 67% to 72% elsewhere (**Table 3**). Athieme was the cattle herd which were the most likely to act as an immigrating source: the Athieme tick population can provide 30% of the migrants reaching any other Beninese localities while all other putative migration rates remain below 1% (**Table 3**). In Burkina Faso, the migration rates between the neighbour herds appeared asymmetrical with 27% estimated from Kimini1 to Kimini2 but 0.16% from Kimini2 to Kimini1. The lowest migrations rates were those estimated between both countries (**Table 3**).

Mutation/drift and migration/drift balances

All the tick samples look at mutation/drift equilibrium irrespectively of the nature of the assumed mutation models (**supplementary file**).

Migration/drift balance resulted in signals of isolation by distance characterized by slopes b ranging from $b = 0.00150295$ (significantly non-null; $P = 0.02$) among Beninese samples (**Figure 3**) to $b = 0.0041874$ (significantly non-null; $P < 0.0001$) over the entire dataset. Such slopes translate in the mean estimates of neighbourhood sizes (De. $\sigma^2 = 1/(4\pi b)$) equal to 53 or 19 reproducing adults on the Beninese dataset or the entire dataset, respectively.

Discussion

Requirements of new markers to characterize each invasive wave

The microsatellites developed from *R. microplus* ticks of Australian and Mexican origins (Chigagure *et al.* 2000) were not suitable for characterizing the population processes at play along the invasion of New Caledonia (Koffi *et al.* 2006b); this led thus to the development of new microsatellite markers (Koffi *et al.* 2006a). Later on, the characterization of the genetic population structure of *R. microplus* in South Africa had again required the development of a new set of microsatellite markers (Boucher 2013). The present study is thus the third reporting the same scenario: limiting the analysis biases associated to null alleles requires the development of new microsatellite markers. Interestingly enough, such a repetition is disconnected from the phylogeographical divergence between, on the one hand, *R. australis* (i.e. the member of *R. microplus* complex that has colonized the Pacific, (Labruna *et al.* 2009)) and, on the other hand, *R. microplus sensu stricto* that has colonized the Americas between the 17th and 19th centuries, South Africa in late 19th or West Africa in early 21st (Labruna *et al.* 2009; Barré & Uilenberg 2010; Burger *et al.* 2014; Binetruy, Duron & Chevillon, unpublished results). The present population genetics analysis of *R. microplus ss* in West Africa provided support for lower null alleles' frequencies at markers BmA05 and BmC07 -initially developed on *R. australis* ticks- than on the markers developed on *R.*

microplus ss indeed. The quasi-absence of polymorphism *R. microplus ss* observed on maternally inherited markers (mitochondrial genes and bacterial genes of the *Coxiella*-like endosymbionts, Binetruy, Duron & Chevillon, unpublished results) interestingly contrasts with the nuclear polymorphism on the microsatellite flanking regions that is responsible for such recurrent difficulties to avoid high frequencies of null alleles when addressing a new invasive wave of these ticks.

Support for *R. microplus* recruitments during transhumance

Several indicators converged for supporting the hypothesis of population admixture within the infrapopulations defined by individual-steers. First, the signals of statistical linkage disequilibrium among pairs of loci observed among the sampled infrapopulations did disappear when re-computed on the clusters identified by BAPS4 (**Figure 2**). Second, the heterozygote deficiencies observed on sampled infrapopulations did also drastically decreased when re-computed on the clusters identified by BAPS4. This is exactly the patterns expected if the BAPS4-identified clusters would represent distinct population origins of the *R. microplus* ticks co-infesting the same steer (generating thus Walhund effects within infrapopulations). Moreover, the high estimate in effective population size driven from Kimini1 (188 *Versus* ~80-to-100; **Table 3**) was associated with a moderate estimate of the self-recruitment rate (0.68 versus 0.993 in Athieme where $N_e \sim 104$; **Table 3**) and with low estimate in the emigration rate toward the neighbour herd Kimini2 (0.002 in **Table 3**; geographic distance of about 30 km at sampling time). As the method used for estimating effective population sizes is based on the examination of linkage disequilibrium patterns, such estimates would be inflated in presence of Walhund effects. It is noteworthy that Kimini1 and Kimini2 are two herds reared by distinct Peulh families and that Peulh societies

have evolved for long cultural practices on cattle production that include long-distance transhumance (Djenontin 2010; Sy 2010). Therefore, the patterns above take sense if we assume that the herders who are managing either Kimini1 or Kimini2 did not follow exactly the same routes along the transhumance event that had preceded our sampling.

The very high level of *R. microplus* self-recruitment estimated in the Kimini2 herd (0.98; **Table 3**) provided further support to the hypothesis of tick recruitment along transhumance event. Such a high estimation indicates that none of the samples presently analysed borne similar genotypes that those from the Kimini2 sample. This makes sense given that the present sampling was mostly performed in Benin but that the cattle herds such as Kimini2 (i.e., located in Burkina Faso in rainy seasons) move in dry seasons to Ivory Coast rather than to Benin (Diop *et al.* 2012).

Overall, the signal of genetic differentiation observed between Beninese samples and these two samples from Burkina Faso (**Table 2**) is thus very likely to translate the difference among the ticks recruited in dry seasons in either mid-to-south Benin or Ivory Coast, respectively. This hypothesis could be easily tested by adding to the analysis several *R. microplus* populations from Ivory Coast (this could not be done in the present study because the civil war was not fully over in Ivory coast when sampling was designed).

The relative importance of herds and individual steers in *R. microplus* genetic structure in Benin

Eight years after the *R. microplus* introduction in south-Benin (Madder et al 2012; Adakal et al 2013), the *R. microplus* populations collected over the entire country appear to have both reached mutation/drift and migration/drift equilibriums. This contrasts with the situation observed in New Caledonia: 70 years after the tick introduction in this island Caledonia, a

403 bottleneck signature was still visible on the microsatellite polymorphism (Koffi *et al.* 2006a).

404 Additional work is needed to decipher whether such a contrast relies on a difference in the

405 demographic growth at the early times of invasion and/or on biases resulting from

406 differences in either markers polymorphism level or in the delay separating the tick

407 introduction and the population genetics analysis.

408 The estimates of population effective sizes driven by Waples *et al.* (2014) and the estimates

409 of neighbourhood sizes driven by the signal of isolation by distance observed among

410 Beninese samples were remarkably similar: N_e ranges from 52 to 148 while $D_e \cdot \sigma^2 = 53$ in

411 Benin while (**Table 3**). These N_e estimates computed within cattle herds in Benin are

412 intermediate to those computed in New Caledonia on cattle herds ($N_e \sim 1\,000$) and on rusa

413 deer ($N_e \sim 10$) (De Meeûs 2012). This takes sense considering that (i) the European cattle

414 races reared in New Caledonia ('charolais' and 'limousin') are well-known for their inability

415 to control their *R. microplus* burden via immunity (Frisch 1999), and (ii) the African cattle

416 displayed a peak in genetic diversity in West Africa (Hanotte *et al.* 2002), including probably

417 at the loci involved in immune response against ticks. Interestingly too, the two state farms

418 Kpinnou and Okpara were not associated with far highest N_e estimates than the other

419 Beninese cattle herds. This may indicate that opposite consequences between the absence

420 of admixture in these *R. microplus* populations (given enclosure of these herds contrarily to

421 all others) and the persistence of higher *R. microplus* burdens in dry seasons on these state

422 farms herds contrarily to all others (Biguezoton *et al.* In press).

423 In Benin, the cattle herd represent the main level defining *R. microplus* population genetic

424 structure. This was also the case in New Caledonia where all herds remained enclosed in

425 private pastures (Koffi *et al.* 2006a) but not in the Republic of South Africa along the Kruger

426 Park where *R. microplus* populations were delimited by individual steers (Boucher 2013).

Such differences highlight how differences in farming practices do determine the population processes of cattle parasites.

The examination of migration pattern among Beninese cattle herds (hence among Beninese populations of *R. microplus*) strengthens the importance of farming practices onto *microplus* demography. Contrarily to any other locality, Athieme appeared as a very likely source of *R. microplus* immigrants for any Beninese herd (table 3: from 0.1% to 1% Versus ~30%). This particularity does not arise from history since *R. microplus* introduction did not take place in Athiémé but in the Kpinnou state farm (Madder et al. 2012). The most parsimonious explanation relies, on the one hand, on the suitability of the South-Beninese climate for *R. microplus* all year around, and on the other hand, the higher economic resources of the Kpinnou state farm relatively to Athiémé (allowing improved control of tick burden all year around via chemical tick-control but also closer and most frequent examination of each individual steer in Kpinnou).

Conclusion: Consequences for future tick-control programs

The present results evidenced that to be efficient tick control programs should primarily focus on the cattle coming back north after transhumance because they borne *R. microplus* ticks that they had recruited in more southern localities. Such a focus involves the use of different chemicals to treat these returning cattle relatively to the chemicals used in tick control programs in the southern areas from where cattle had passed the last dry seasons.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

AB, SA, SF, HA, CC designed the study. HA, AB, SA, SZ coordinated and participated to field sampling. AB, SA and SZ identified the collected ticks to species. AB and VN performed the genotyping. AB and CC analyzed data and wrote the first draft. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

This research was funded by the Australian AusAid program (AusAID, project WECATiC). AB benefited from a SCAC fellowship from the Embassy of France in Benin and complementary funding from IRD, ARS-USDA (Kerrville, Texas), the International Foundation for Science (<http://www.ifs.se>) and from the International Laboratory of Vector-borne Diseases in West Africa (<http://www.lamivect.net/>) that regroups different laboratories working on vectors and vector-borne diseases in West Africa.

Reference

- Adakal H, Biguezoton A, Zoungrana S *et al.* (2013a) Alarming spread of the Asian cattle tick *Rhipicephalus microplus* in West Africa—another three countries are affected: Burkina Faso, Mali and Togo. *Experimental and Applied Acarology*, **61**, 383–386.
- Adakal H, Stachurski F, Chevillon C (2013b) Tick control practices in Burkina Faso and acaricide resistance survey in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *geigy* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, **59**, 483–491.
- Anonymous (2004) *Enquête Nationale sur les effectifs du cheptel*. Ouagadougou. Burkina Faso.
- Barré N, Uilenberg G (2010) Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, **29**, 149–160, 135–147.

474 Beerli P, Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective
 475 population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the*
 476 *National Academy of Sciences*, **98**, 4563–4568.

477 Boucher F (2013) *Génétique des populations de la tique invasive du bétail Rhipicephalus (Boophilus)*
 478 *microplus en Afrique du Sud*. Master 1 Thesis. Montpellier, France.

479 Burger TD, Shao R, Barker SC (2014) Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences
 480 indicates that the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, contains a cryptic species.
 481 *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **76**, 241–253.

482 CEDEAO, CSAO/OCDE (2008) *Élevage et marché régional au Sahel et en Afrique de l'Ouest*
 483 *Potentialités et défis*. CSAO-OCDE / CEDEAO, Paris, France.

484 Chigagure NN, Baxter GD, Barker SC (2000) Microsatellite loci of the cattle tick Boophilus microplus
 485 (Acari: Ixodidae). *Experimental & applied acarology*, **24**, 951–956.

486 CORAF/WECARD (2010) *Priorités de recherche pour le développement de l'élevage, de la pêche et de*
 487 *l'aquaculture en Afrique de l'ouest*. Dakar, Sénégal.

488 Corander J, Marttinen P (2006) Bayesian identification of admixture events using multilocus
 489 molecular markers. *Molecular Ecology*, **15**, 2833–2843.

490 Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent
 491 Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics*, **144**, 2001–2014.

492 De Clercq EM, Vanwambeke SO, Sungirai M *et al.* (2012) Geographic distribution of the invasive
 493 cattle tick Rhipicephalus microplus, a country-wide survey in Benin. *Experimental and Applied*
 494 *Acarology*, **58**, 441–452.

495 De Meeûs T (2012) *Initiation à la génétique des populations naturelles : applications aux parasites et*
 496 *à leurs vecteurs*. IRD, Marseille.

497 De Meeûs T, Humair P-F, Grunau C, Delaye C, Renaud F (2004) Non-Mendelian transmission of alleles
 498 at microsatellite loci: an example in Ixodes ricinus, the vector of Lyme disease. *International*
 499 *Journal for Parasitology*, **34**, 943–950.

500 Diop A., Cesaro J, Touré I, Ickowicz A, Toutain B (2012) Évolution des transhumances. In: *Atlas des*
 501 *évolutions des systèmes pastoraux au Sahel*, pp. 14–15. Touré I., Ickowicz A., Wane A., Garba
 502 I., Gerber P.
 503 Djenontin J (2010) Dynamique des stratégies et des pratiques d'utilisation des parcours naturels pour
 504 l'alimentation des troupeaux bovins au Nord-Est du Bénin. Université de Abomey-Calavi.
 505 Djenontin JA, Madjidou O, Houinato MR, Mensah GA, Sinsin BA (2012) Le calendrier pastoral en
 506 élevage extensif dans le Nord-Est du Bénin : un outil de gestion du cheptel bovin de
 507 l'exploitation. *Science et changements planétaires / Sécheresse*, **23**, 261–270.
 508 Do C, Waples RS, Peel D *et al.* (2014) NeEstimator v2: re-implementation of software for the
 509 estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular*
 510 *Ecology Resources*, **14**, 209–214.
 511 FAO (2009) *Country Stat pour l'Afrique Sub-Saharienne. Bénin- Premier rapport panorama*.
 512 Farougou S, Adakal H, Biguezoton A., Boko C (2012) Prévalence de l'infection d'Amblyomma
 513 variegatum par Ehrlichia ruminantium dans les élevages extensifs du Bénin. *Revue de*
 514 *Médecine Veterinaire*, **163**, 261–266.
 515 Farougou S, Kpodekon M, Tassou A (2007) Abondance saisonnière des tiques (Acari: Ixodidae)
 516 parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin: cas des départements du Borgou et
 517 de l'Alibori. *Rev. Afr. Santé Prod. Anim*, **5**, 61–67.
 518 Farougou S, Kpodekon M, Tchabode D., Youssao AK., Boko C (2006) Abondance saisonnière des
 519 tiques (acari: Ixodidae) parasites des bovines dans la zone soudanienne du Bénin: cas des
 520 départements de l'Atacora et de la Donga. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **150**, 145–152.
 521 Frisch JE (1999) Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *International Journal for*
 522 *Parasitology*, **29**, 57–71.
 523 Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of*
 524 *Heredity*, **86**, 485–486.

525 Goudet J (2005) hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular*
526 *Ecology Notes*, **5**, 184–186.

527 Goudet J, Perrin N, Waser P (2002) Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic
528 markers. *Molecular Ecology*, **11**, 1103–1114.

529 Goudet J, Raymond M, Meeüs T de, Rousset F (1996) Testing Differentiation in Diploid Populations.
530 *Genetics*, **144**, 1933–1940.

531 Grindatto A, Bayala I, Sidibé I *et al.* (2008) Ticks and tick-borne pathogens in cattle from peri-urban
532 area of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

533 Hanotte O, Bradley DG, Ochieng J. *et al.* (2002) African pastoralism: genetic imprints of origins and
534 migrations. *Science*, **296**, 336–339.

535 Kaboré H, Salembere M., Tamboura H. (1998) Seasonal Variation of Ticks on Cattle in Burkina Faso.
536 *Annals of the New York Academy of Sciences*, **849**, 398–401.

537 Koffi BB, De Meeûs T, Barré N *et al.* (2006a) Founder effects, inbreeding and effective sizes in the
538 Southern cattle tick: the effect of transmission dynamics and implications for pest
539 management. *Molecular Ecology*, **15**, 4603–4611.

540 Koffi BB, Risterucci AM, Joulia D *et al.* (2006b) Characterization of polymorphic microsatellite loci
541 within a young *Boophilus microplus* metapopulation. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 502–504.

542 Labruna MB, Naranjo V, Mangold A. *et al.* (2009) Allopatric speciation in ticks: genetic and
543 reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
544 *Bmc Evolutionary Biology*, **9**, 1–12.

545 Madder M, Adehan S, De Deken R, Adehan R, Lokossou R (2012) New foci of *Rhipicephalus microplus*
546 in West Africa. *Experimental and Applied Acarology*, **56**, 385–390.

547 Madder M, Thys E, Achi L, Touré A, De Deken R (2011) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a most
548 successful invasive tick species in West-Africa. *Experimental and Applied Acarology*, **53**, 139–
549 145.

550 Martins WS, Lucas DCS, de Souza Neves KF, Bertoli DJ (2009) WebSat-A web software for
 551 microsatellite marker development. *Bioinformation*, **3**, 282.
 552 Musa HI, Jajere SM, Adamu NB *et al.* (2014) Prevalence of Tick Infestation in Different Breeds of
 553 Cattle in Maiduguri, Northeastern Nigeria. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, **12**,
 554 161–166.
 555 Nianogo AJ, Somda J (1999) Diversification et intégration inter-spécifique dans les élevages ruraux au
 556 Burkina Faso. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **3**, 133–139.
 557 Norval RA, Sutherst RW, Jorgensen OG, Kerr JD (1997) The effects of the bont tick, *Amblyomma*
 558 *hebraeum*, on milk production of Sanga and Sanga x Brahman cattle. *Medical and Veterinary*
 559 *Entomology*, **11**, 143–147.
 560 Opara MN, Ezeh NO (2011) Ixodid ticks of cattle in Borno and Yobe states of northeastern Nigeria:
 561 breed and coat colour preference. *Animal Research International*, **8**, 1359–1365.
 562 Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M *et al.* (2004) GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and
 563 First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, **95**, 536–539.
 564 Piry S, Luikart G, Cornuet J-M (1999) Computer note. BOTTLENECK: a computer program for
 565 detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of*
 566 *Heredity*, **90**, 502–503.
 567 Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests
 568 and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
 569 Rozen S, Skaletsky H (2000) PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers.
 570 *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **132**, 365–86.
 571 Stachurski F (2000) Modalités de la rencontre entre la stase adulte de la tique “*Amblyomma*
 572 *variegatum* (Acari, Ixodida)” et les bovins (applications potentielles à la lutte contre ce
 573 parasite).

574 Stachurski F, Musonge E., Achu-kwi M., Saliki J. (1993) Impact of natural infestation of *Amblyomma*
575 *variegatum* on the liveweight gain of male Gudali cattle in Adamawa (Cameroon). *Veterinary*
576 *Parasitology*, **49**, 299–311.

577 Sy O (2010) La transhumance transfrontalière, source de conflits au Ferlo (Sénégal). *Mappemonde*.

578 Toure A, Diaha C, Sylla I, Kouakou K (2014) Récente recombposition des populations de tiques
579 prévalant en Côte d’Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **8**, 566–
580 578.

581 Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: software for
582 identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*,
583 **4**, 535–538.

584 Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure.
585 *Evolution*, **38**, 1358–1370.

586 Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental*
587 *Microbiology*, **63**, 3741–3751.

588 Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus
589 genotypes. *Genetics*, **163**, 1177–1191.

590

Figure 1. Sampling geography. The sampled localities are represented by triangles annotated respectively with the first two letters of the locality names. At, Kp and Ou refer thus to the southern Beninese localities of Athiémé (N 6.5864; E 1.6653), Kpinnou (N 6.5681; E 1.7810) and Ouidah (N 6.3336; E 2.0064), respectively. Da and Gl refer to the central Beninese localities of Dassa (N 7.7500; E 2.1830) and Glazoué (N 7.9707; E 2.2489). Ok and Go refer to the northern Beninese localities of Okpara (N 9.3050; E 2.7314) and Gogounou (N 10.7383; E 2.9233), respectively. Ki1 and Ki2 respectively correspond to two cattle herds managed by Peulh populations in Kimini (Kimini1: N 10.0716; W 4.808; Kimini2: N 10.0857; W -4.778). Letters are followed by two numbers (in square brackets) indicating the number of sampled infrapopulations and the sampling sizes per locality, respectively.

Figure 2. Variation in F_{IS} estimates. Means and confidence intervals are pictured for the per-locus and multi locus estimates after computations over the infrapopulations sampled on cattle herds (raw) or among the clusters identified by BAPS4 within these infrapopulations (BAPS).

Figure 3. Isolation by distance among the infrapopulations sampled on Beninese cattle herds.

Figure 1. Sampling geography.

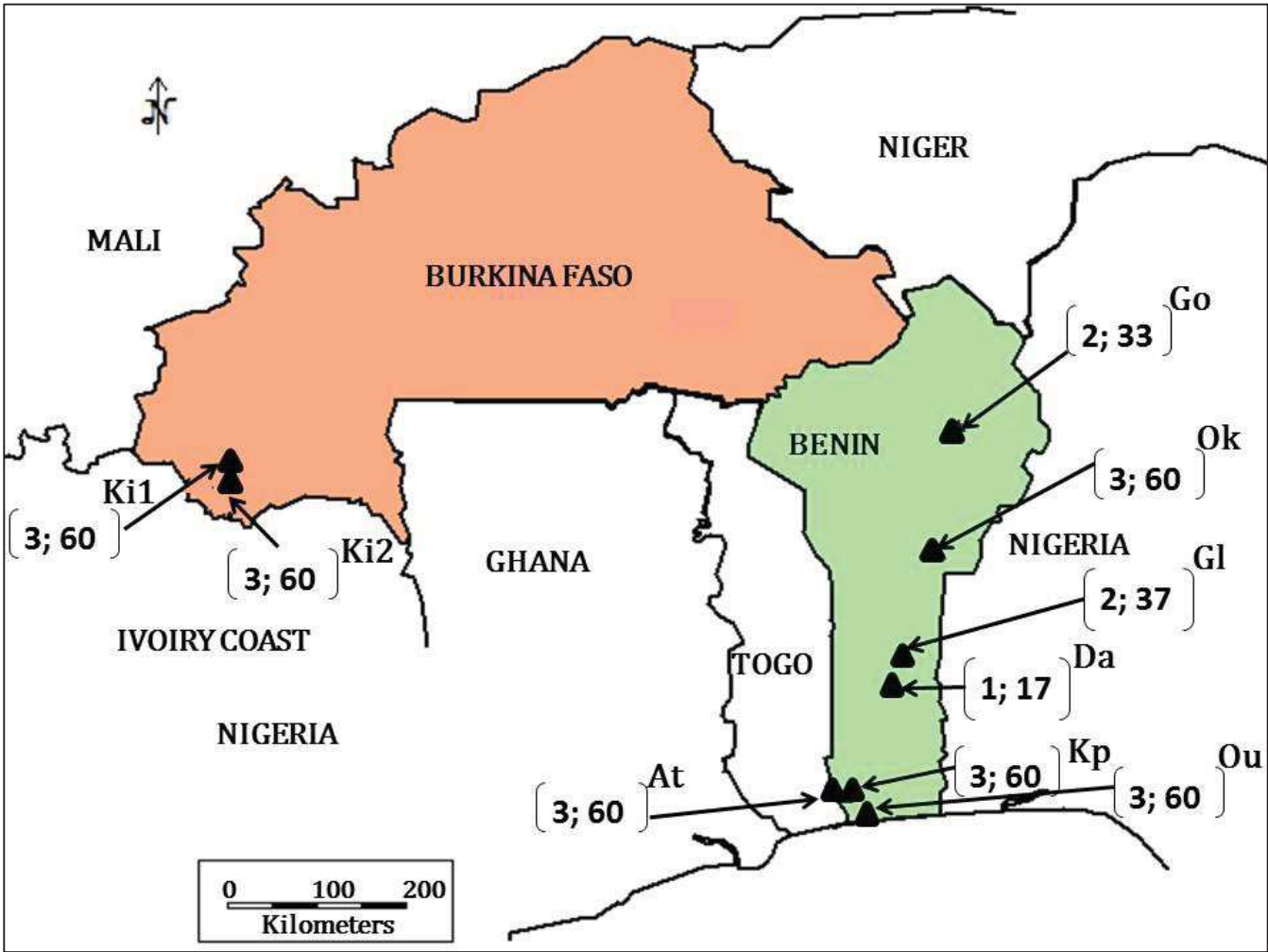


Figure 2.

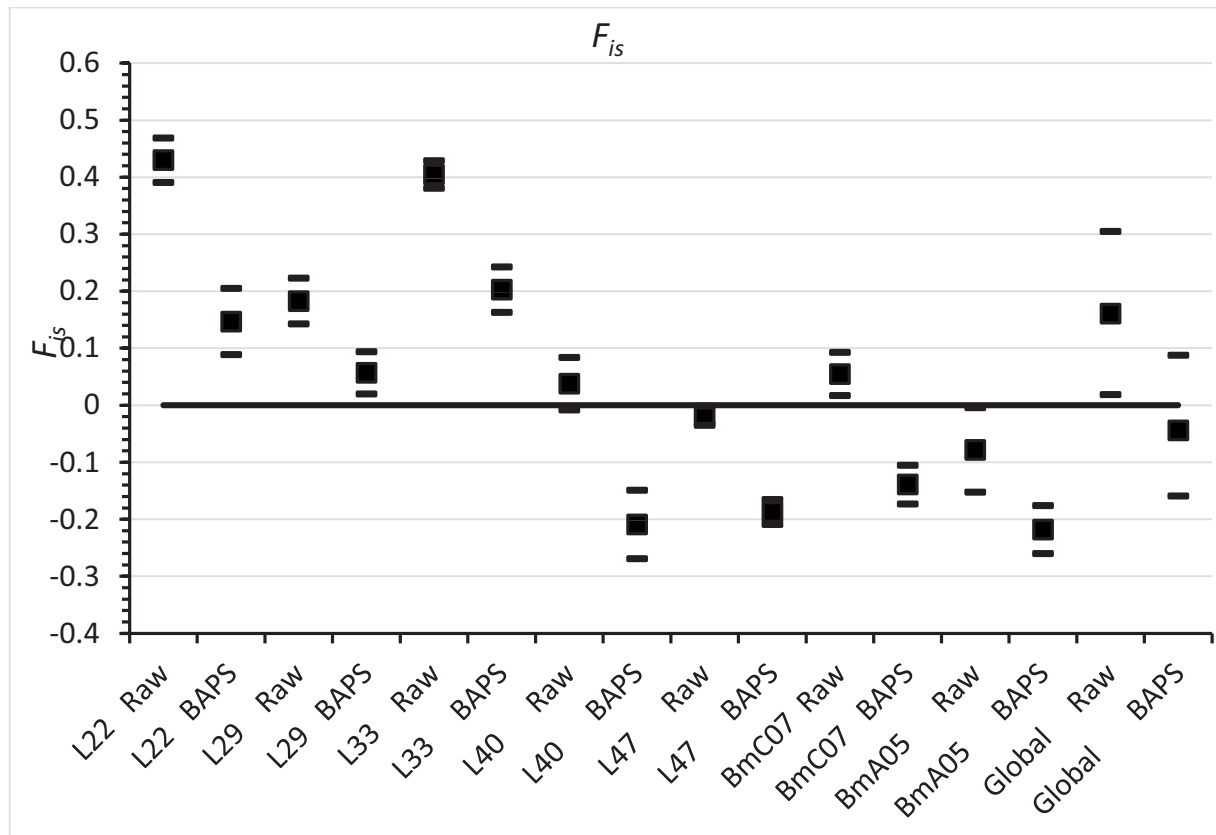


Figure 3.

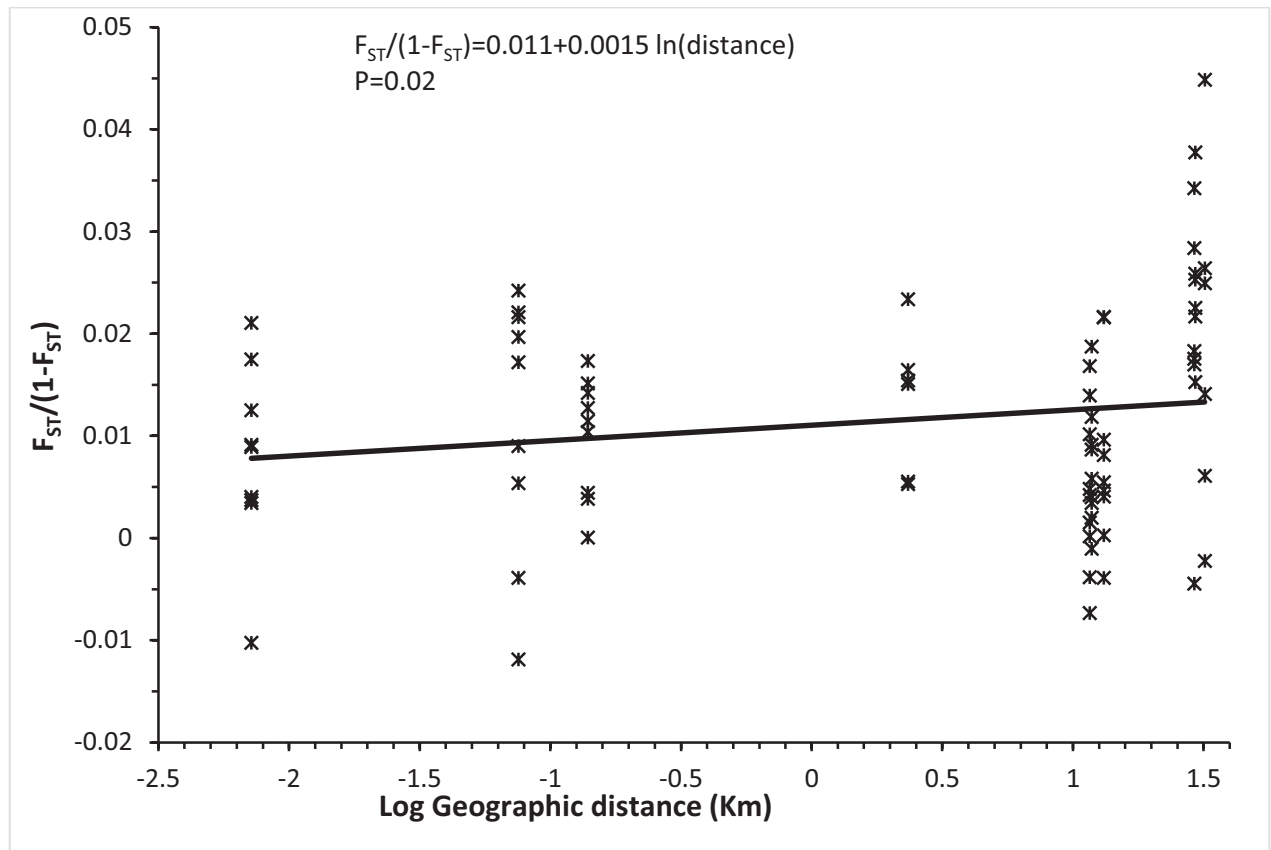


Table1. Newly developed markers. Locus names are indicated with the GenBank accession number of the contig, primers' sequences, the repeated motif, PCR-annealing temperature (Ta), the number of alleles detected (Na); allele size range; observed heterozygosity Ho, and the Nei's (1987) average estimate of within-sample gene diversity (Hs).

Locus name	SEQ-ID (GenBank)	Primers (5' – 3')	Repeated array	Ta (°C)	Na	Alleles Size range (bp)	Ho	Hs
L22	HM748967	F : GTGGTGGCGTACAACTACGA	(TCA)12	60	7	[260 ; 296]	0.32	0.57
		R : GCAAGCACAGGAACGAGTTA		59				
L29	HM748965	F : CGCCAAGTCAAGTGGTGAT	(GATA)9	60	22	[388 ; 458]	0.51	0.62
		R : TGCTATCGTGTTCGTTGCTC		60				
L33	HM748963	F : TCGATGGTGATCGTTAGAGC	(TAGA)7	59	37	[196 ; 360]	0.47	0.80
		R : CCATTACGGCACCTCTCATA		59				
L40	HM748963	F : CCGTAATTGCAGAAGGCAGT	(GTCT)7	60	5	[328 ; 348]	0.40	0.42
		R : AGAAGGATGAGCTTACCGACAG		60				
L47	HM748967	F : ATACGTGTTGTTGTGGTGCC	(GACA)16	59	19	[234 ; 364]	0.87	0.86
		R : GGACTTGTGGCTCGCTAACT		60				

Table 2: Pairwise Fst estimates. Significantly positive values appear in bold characters.

	Athieme	Kpinnou	Okpara	oudah	Gogounou	Bétécoucou	Glazoue	Kimini1
Kpinnou	0.002							
Okpara	0.003	0.001						
oudah	0.003**	0.005**	0.002					
Gogounou	0.015	0.01	0.01	0.009				
Bétécoucou	0.000	0.000	0.006	0.005	0.017			
Glazoue	0.002	0.003	0.000	0.000	0.006	0.005		
Kimini1	0.027**	0.016*	0.024**	0.021**	0.029	0.022	0.015	
Kimini2	0.023**	0.007*	0.021**	0.021**	0.024**	0.02	0.013	0.008

Table 3- Migration rates among localities. Bold characters refer to resident rates (i.e., the proportion of non-emigrating ticks). 95% confidence intervals of population effective sizes and migration rates are given in parentheses).

Emigration sources:									
Name	Athieme	Kpinnou	Ouidah	Dassa	Glazoue	Okpara	Gogounou	Kimini1	Kimini2
Ne	104	148	109	3368	∞	83	52	188	96
(95% CI)	(36; ∞)	(48; ∞)	(40; ∞)	(16; ∞)	(81; ∞)	(25; ∞)	(18; ∞)	(33; ∞)	(28; ∞)
Immigration targets:									
Athieme	0.99 (0.997; 0.9998)	0.001 (10^{-09} ; 0.007)	0.001 (2.10^{-10} ; 0.009)	0.003 (10^{-5} ; 0.014)	0.003 (6.10^{-6} ; 0.014)	0.001 (10^{-10} ; 0.008)	0.001 (5.10^{-10} ; 0.007)	0.001 (10^{-10} ; 0.009)	0.002 (5.10^{-10} ; 0.012)
Kpinnou	0.24 (0.17; 0.29)	0.67 (0.667; 0.690)	0.003 (10^{-05} ; 0.015)	0.003 (9.10^{-06} ; 0.014)	0.003 (4.10^{-05} ; 0.015)	0.003 (10^{-05} ; 0.015)	0.003 (10^{-05} ; 0.013)	0.003 (10^{-05} ; 0.014)	0.078 (0.029; 0.134)
Ouidah	0.30 (0.26; 0.33)	0.002 (10^{-06} ; 0.014)	0.67 (0.667; 0.690)	0.002 (4.10^{-06} ; 0.012)	0.002 (10^{-06} ; 0.014)	0.002 (10^{-06} ; 0.012)	0.002 (10^{-06} ; 0.013)	0.002 (10^{-06} ; 0.012)	0.002 (10^{-05} ; 0.059)
Dassa	0.12 (0.04; 0.22)	0.008 (2.10^{-05} ; 0.044)	0.044 (6.10^{-04} ; 0.130)	0.68 (0.667; 0.723)	0.009 (2.10^{-05} ; 0.045)	0.101 (0.039; 0.184)	0.008 (2.10^{-05} ; 0.040)	0.009 (2.10^{-05} ; 0.041)	0.014 (3.10^{-05} ; 0.072)
Glazoue	0.064 (0.02; 0.12)	0.008 (2.10^{-05} ; 0.036)	0.095 (0.046; 0.155)	0.005 (2.10^{-05} ; 0.022)	0.68 (0.667; 0.702)	0.102 (0.046; 0.178)	0.006 (10^{-05} ; 0.027)	0.006 (2.10^{-05} ; 0.028)	0.037 (10^{-03} ; 0.097)
Okpara	0.31 (0.279; 0.330)	0.002 (10^{-07} ; 0.013)	0.003 (10^{-07} ; 0.014)	0.003 (4.10^{-06} ; 0.013)	0.003 (8.10^{-06} ; 0.012)	0.67 (0.667; 0.686)	0.002 (10^{-07} ; 0.013)	0.002 (10^{-06} ; 0.012)	0.015 (10^{-06} ; 0.034)
Gogonou	0.24 (0.17; 0.29)	0.010 (10^{-06} ; 0.051)	0.009 (10^{-06} ; 0.049)	0.007 (2.10^{-05} ; 0.035)	0.008 (10^{-05} ; 0.036)	0.007 (10^{-06} ; 0.041)	0.72 (0.669; 0.776)	0.012 (3.10^{-05} ; 0.066)	0.008 (10^{-06} ; 0.040)
Kimini1	0.036 (0.002; 0.093)	0.004 (10^{-06} ; 0.022)	0.003 (10^{-06} ; 0.021)	0.004 (2.10^{-05} ; 0.018)	0.004 (4.10^{-05} ; 0.017)	0.004 (10^{-06} ; 0.022)	0.003 (10^{-06} ; 0.016)	0.68 (0.667; 0.703)	0.27 (0.210; 0.320)
Kimini2	0.012 (10^{-09} ; 0.075)	0.002 (10^{-09} ; 0.011)	0.002 (10^{-09} ; 0.011)	0.003 (2.10^{-06} ; 0.015)	0.003 (10^{-06} ; 0.013)	0.001 (10^{-09} ; 0.0092)	0.001 (10^{-09} ; 0.010)	0.002 (10^{-09} ; 0.010)	0.98 (0.913; 0.996)

Supplementary file - Absence of bottleneck signatures. IAM, SMM and TPM refer to the infinite allele mutation model, single-step mutation model and the mixed mutation model (presently used with the parameters default values indicated in the software). Proportion of SMM in TPM is 70%.

Herd	IAM			TPM			SMM		
	He<Heq	He>Heq	P	He<Heq	He>Heq	P	He<Heq	He>Heq	P
Athieme	3	4	0.47	4	3	0.95	4	3	0.98
Kpinnou	5	2	0.96	6	1	0.99	7	0	1
Okpara	1	6	0.15	3	4	0.66	5	2	0.97
Ouidah	2	5	0.34	5	2	0.96	7	0	1
Gogounou	2	5	0.23	6	1	0.98	6	1	1
Kimini1	5	2	0.77	6	1	0.99	7	0	1
Kimini2	3	4	0.29	3	4	0.77	6	1	1

Chapitre 5 : Discussion générale, perspectives & conclusions

L'Afrique de l'ouest est pourvue d'un cheptel assez fourni (66 662 751 de têtes de bovins en 2013) et qui lui permet de satisfaire une grande partie des besoins en protéines de sa population (plus de 330 millions d'habitants en 2013), quoique des efforts restent encore à faire. Malheureusement, dans cette sous-région, la santé du bétail est depuis toujours menacée par les tiques dans un milieu où 95% du système d'élevage est à faibles intrants. Ceci dit, les tiques ont fait l'objet de travaux de recherche portant notamment sur leurs abondances et les agents pathogènes qu'elles transmettent depuis les années 1980 quoique les plus nombreux et les plus connus ayant été réalisés après les années 2000 (Lafia 1982; Bayer & Maina 1984; Gueye *et al.* 1990; Pangui & Salifou 1992; Koney *et al.* 1994, 1996, 2004, Farougou *et al.* 1998, 2006, 2007a; b; Adakal *et al.* 2004) pour ne citer que ceux là). Jadis, *A. variegatum* était l'espèce la plus abondante et celle associée aux plus fortes pertes économiques locales (Gueye *et al.* 1990; Stachurski *et al.* 1993; Koney *et al.* 1994; Kaboré *et al.* 1998; Farougou *et al.* 2007b). Cette tique est le vecteur de *E. ruminantium*, agent pathogène de la cowdriose, cause de mortalité élevée chez les ruminants de la sous-région notamment chez les ovins (Adakal *et al.* 2004) et dont la prévalence chez *A. variegatum* a été évaluée à 10% au Bénin (Farougou *et al.* 2012). Des essais vaccinaux ont été réalisés au Burkina Faso afin de pouvoir lutter contre les souches d'*E. ruminantium* qui circulaient (Adakal *et al.* 2010b). Par la suite une étude moléculaire a permis la caractérisation de souches d'*E. ruminantium* circulant dans la sous-région et mis en évidence l'existence de deux grandes populations de souches qui co-circulaient au sein de trois villages voisins (distances < 20km) au Burkina Faso (Adakal *et al.* 2010a).

Mis à part *A. variegatum*, trois autres espèces de tiques autochtones appartenant au sous-genre *Boophilus* (*R. (B.) annulatus*, *R. (B.) decoloratus*, *R. (B.) geigy*) représentaient aussi une menace pour la santé du bétail en tant que vecteur de *B. bigemina* et *A. marginale*. A ce lot s'ajoutaient trois espèces du genre *Hyalomma* (*H. impressum*, *H. marginatum rufipes*, *H. truncatum*) et quatre autres espèces du genre *Rhipicephalus* (non *Boophilus*) (*R. muhsamae*, *R. sanguineus*, *R. senegalensis*, *R. sulcatus*) sans fort impact vétérinaire chez les ruminants mais collectées sur bovins au Bénin et au Burkina Faso (Kaboré *et al.* 1998; Farougou *et al.* 2006).



Une espèce invasive du sous-genre *Boophilus*, *R. (B.) microplus*, a ensuite été doublement introduite en Afrique de l'ouest via des importations de bovins girolando en provenance du Brésil dans le cadre de l'amélioration de la production laitière des races locales au Bénin et en Côte d'Ivoire (Madder *et al.* 2007, 2012). Il s'agit de l'espèce de tique associée aux plus fortes pertes économiques dans le monde entier (Frisch 1999). Sa présence en Afrique de l'ouest a très tôt été associée à une expansion rapide, à des cas de résistances aux traitements acaricides courants et à une suspicion de remplacements d'espèces locales de tiques (Madder *et al.* 2012; De Clercq *et al.* 2012; Boka *et al.* 2014).

C'est dans ce contexte d'invasion qu'ont pris forme nos travaux de thèse qui démarrèrent en 2012 et qui visaient principalement à appréhender les conséquences de cette invasion sur les communautés de tiques et agents pathogènes associés et les mécanismes populationnels mis en jeu dans l'invasion de l'Afrique de l'ouest par cette tique.

Deux pays de l'Afrique de l'ouest ont été retenus pour nos échantillonnages. Il s'agit du Bénin et du Burkina Faso où les méthodes de lutte traditionnelles contre les tiques et les maladies transmises se basent principalement sur des pratiques traditionnelles (couvertures du bétail par des bains d'huile, de boue ou d'extraits de plantes), des opérations manuelles de détiquage voire sur le recyclage de produits phytosanitaires (Dossou-Gbete *et al.* 2006; Adakal *et al.* 2013b). L'introduction de *R. (B.) microplus* a eu lieu au Bénin en 2004 alors que sa présence au Burkina Faso fut mise en évidence fin 2011, presque à la veille du démarrage de nos travaux. Nous avons dans un premier temps évalué l'ampleur de l'invasion en cours à travers des collectes ponctuelles au Burkina Faso, au Mali et au Togo, lesquelles collectes ont permis de mettre en évidence la présence de *R. (B.) microplus* dans chacun de ces pays. Par la suite, étant donné qu'aucun des travaux antérieurs ne s'était focalisé sur les interactions qui pouvaient exister entre les différents taxons de tiques co-circulant dans la sous-région, nous avons comblé ce vide au cours des travaux de cette thèse en utilisant des collectes de tiques de 12 mois sur 144 vaches issues de 12 sites au Bénin (cinq sites) et au Burkina Faso (sept sites). Grâce à ces missions de collecte, le sang des animaux détiqués a également été prélevé, nous permettant de vérifier si le schéma d'interaction observé chez les tiques se répercutait sur certaines maladies transmises. En ce qui concerne les maladies transmises, nous nous sommes par la suite particulièrement intéressés à la cowdriose, responsable de fortes mortalités chez les animaux sensibles, en particulier les moutons. Dans un premier



temps nous avons réalisé une étude de diversité génétique de l'agent pathogène de la cowdriose, *E. ruminantium*, en utilisant des souches de l'Afrique de l'ouest, du sud et de l'est. Etant donné, d'une part les fortes prévalences connues de cette maladie dans la sous-région et d'autre part des fortes abondances de la tique invasive dans de nombreux sites de l'Afrique de l'ouest, nous nous sommes intéressés à la possibilité d'une transmission d'*E. ruminantium* par *R. (B.) microplus*. Enfin, afin de pouvoir contribuer à la lutte efficiente contre *R. (B.) microplus* en pleine expansion en Afrique de l'ouest nous avons analysé les mécanismes populationnels impliqués dans cette invasion en cours.

5.1 Dynamique spatio-temporelle et interactions complexes des tiques du bétail en Afrique de l'ouest

5.1.1 Variations des abondances et de la richesse spécifique de tiques

Nos analyses de beta-diversité révèlent que la composition des communautés de tiques varie en fonction des zones d'échantillonnage et du pays. Les abondances de tiques sont toutes aussi variables (**Encart N°2**). Ces variations pourraient notamment être dues à la susceptibilité différentielle des animaux suivis, d'autant qu'il existe des animaux pouvant résister naturellement plus que d'autres à l'infestation des tiques (Frisch 1999). De fait, nous avons réalisé nos suivis sur différentes races bovines, l'Afrique de l'Ouest étant dotée d'une grande diversité génétique de bovins (Hanotte *et al.* 2002) dont certaines seraient plus résistantes que d'autres aux tiques. Cette différence de susceptibilités des bovins vis-à-vis des tiques s'observe aussi à l'égard des Trypanosomes en Afrique de l'Ouest (Murray *et al.* 1981; Courtin *et al.* 2008). Toutefois, la différence des climats des zones d'études et même des microclimats au sein de chaque zone, étant donné les différences d'abondances au sein des zones d'étude, pourrait conduire à de telles variations. Les pratiques culturelles et de pâturages n'étant pas toujours les mêmes, elles peuvent également avoir influencé ces résultats. Par exemple dans chacune des zones d'échantillonnage du Bénin il existe une ferme d'Etat où les animaux sont mieux suivis que dans les autres fermes. De plus au Nord du Bénin et au Burkina Faso pendant la saison sèche, les éleveurs amènent leurs troupeaux loin de leurs sites habituels à la recherche de l'eau et de pâturage, c'est la transhumance qui est transfrontalière en ce qui concerne les troupeaux relevant des sites du sud-ouest du Burkina



Faso. Ces troupeaux vont en effet séjourner au nord de la Côte d'Ivoire jusqu'au début de la saison pluvieuse au Burkina avant de revenir. Certains animaux suivis au cours de nos travaux de terrain étaient parfois impliqués dans la transhumance et il fallut des ententes particulières avec les éleveurs pour qu'une partie des troupeaux comprenant ces animaux soit conduite au Burkina Faso, proche de la frontière ivoirienne lors de certaines missions de collectes. De plus étant donné la variabilité climatique des zones d'études, les cultures qui s'y pratiquent, constituant une partie de l'alimentation du bétail, sont toutes autant variables. Tous ces éléments peuvent donc avoir influencé ces variations d'abondance et de richesse spécifiques. Pour mieux appréhender la cause de ces variations des études de suivi avec des collectes de tiques s'effectuant à des intervalles de temps réguliers et incluant la prise en compte de ces paramètres pourraient s'avérer utiles.

5.1.2 : Diminution temporelle de la charge parasitaire de tiques au Centre du Burkina Faso en dépit de l'absence de *R. (B.) microplus*

Contrairement au nord du Bénin, le plateau central du Burkina Faso est resté exempt de la présence de *R.(B.) microplus* durant toute la période de notre suivi longitudinal. Au niveau de cette partie du pays, *A. variegatum* et *H. marginatum rufipes* étaient les seules espèces identifiées par Kaboré et al (1998) lors d'un suivi longitudinal de 12 mois en 1996. En considérant ces deux taxons, la comparaison des charges/animal-hôte de cette période à celles que nous avons obtenu (dans des sites proches de ceux de (Kaboré *et al.* 1998) en 2012-2013 indique une diminution non négligeable. En effet, de 7.5 adultes *A. variegatum*/animal-hôte et 7.2 adultes *Hyalomma* spp/animal-hôte en 1996, nous sommes passés respectivement à 0.7 et 1.2 adulte/animal-hôte (**Encart N°2**). Cet écart peut être dû au réchauffement climatique dans cette zone sahélienne à la limite de la distribution géographique de ces taxons (Walker *et al.* 2003). L'hétérogénéité temporelle des hôtes des tiques pourraient aussi conduire à de tels résultats. Autrement dit les animaux actuellement suivis seraient plus résistants aux tiques que ceux impliqués dans les travaux de Kaboré et al (1998). Kaboré et al (1998) auraient donc effectué leur suivi sur des races bovines plus sensibles aux tiques. Des facteurs abiotiques, telles que des interactions interspécifiques entre les espèces de tiques présentes ne sauraient non plus être occultées.



5.1.3 Interactions complexes entre les espèces de tiques du bétail en Afrique de l'ouest

L'infestation simultanée d'un hôte par deux ou plusieurs parasites est fréquemment observée dans la nature. Ceci conduit souvent à différentes interactions au sein des communautés de parasites. Mais la nature et le mécanisme de ces interactions sont souvent difficiles à identifier (Lutermann *et al.* 2015). En Afrique de l'ouest, des travaux de collecte de tiques ont souvent fait ressortir des infestations simultanées de plusieurs espèces (Farougou *et al.* 2006, 2007b; Lorusso *et al.* 2013; Toure *et al.* 2014). Dans notre étude, sept taxons de tique ont ainsi été identifiés : *A. variegatum*, *Hyalomma* spp, *R. (B.) annulatus*, *R. (B.) decoloratus*, *R. (B.) geigy*, *R. (B.) microplus*, *Rhipicephalus* spp (**Encart N°2**). De plus, nos analyses des interactions de ces tiques entre elles indiquent que loin de s'exclure mutuellement sur leurs hôtes, elles s'agrègent plutôt sur les mêmes hôtes. Ce patron d'agrégation de diverses espèces ectoparasites sur les mêmes hôtes a déjà été observé chez des tiques infestant des rats à trompes (*Elephantulus myurus*) (Lutermann *et al.* 2015), des puces de rongeurs (Krasnov *et al.* 2005b) et des ectoparasites de chauves-souris incluant 17 505 individus appartenant à 104 espèces et 39 genres (Presley 2011).

La facilitation apparente à travers une déficience du système immunitaire des hôtes peut conduire à un tel résultat. Le gorgement des tiques provoquant une cascade complexe de réactions immunitaires innées et adaptatives de l'hôte (Brossard & Wikel 2004), une augmentation du nombre de tiques infestant l'hôte faciliterait l'infestation d'un nombre encore plus élevé de tiques (Lutermann *et al.* 2015). Cependant, si l'immunodéficiences déterminait cette agrégation de tiques, étant donné que l'androgène (hormone mâle) affecte la fonction immunitaire et se retrouve plus élevée chez les mâles que chez les femelles (Folstad & Karter 1992) les animaux mâles devraient alors être plus infestés que les femelles (Presley 2011). Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée chez des rongeurs : la charge de puces était plus forte chez les mâles que chez les femelles (Krasnov *et al.* 2005a). Dans l'avenir, il serait bon de tester l'importance du sexe de l'hôte sur les charges parasitaires des tiques du bétail sur les bovins ouest-africains ; ce que nous n'avons malheureusement pas fait dans l'article présenté en encart n°2.

Une autre hypothèse tient en la composition de salive des tiques. Les compositions de salives des ectoparasites seraient d'autant plus similaires qu'ils sont phylogénétiquement proches et



affaibliraient plus facilement l'immunité de l'hôte selon Presley (2011). Or nous avons récolté au cours de notre étude quatre genres de tiques, génétiquement assez éloignés les uns des autres. Ce qui ne correspond donc pas à cette hypothèse.

Un autre mécanisme qui pourrait aussi conduire à une agrégation de tiques sur les mêmes bovins provient de la fragilité de leur état de santé. En effet la santé des animaux pourrait se trouver être fragilisée, du fait d'une mauvaise alimentation et d'une insuffisance de suivi sanitaire, étant donné que nous avons effectué nos travaux dans des zones où le système d'élevage est en majorité à faibles intrants.

Outre les raisons ci-dessus, des préférences de niches écologiques identiques des tiques pour les stades non parasitaires, (toutes les espèces de tiques se regroupant au même endroit à l'affut des hôtes), peuvent aussi aboutir à une agrégation. Mais ceci paraît peut probable étant donné d'une part que les tiques identifiées dans notre étude sont aussi bien des tiques monoxènes que trixènes, et d'autre part que nos analyses se sont focalisées sur les adultes (**Encart N°2**). Une autre explication serait peut-être un effet stochastique à travers lequel les animaux suivis dans les troupeaux sont ceux qui par hasard sont les plus infestés. Rappelons toutefois qu'il s'agit ici de 144 animaux. Mais des travaux de recherches indiquent que dans la nature seuls certains animaux sont souvent infectés par des parasites, les autres apparaissant (virtuellement) sains (Gourbière *et al.* 2015). Des schémas contraires seraient rares, l'agrégation apparaissant alors comme un aspect fondamental dans la définition du parasitisme (Crofton 1971) ou décrit comme étant la « première loi du parasitisme » (Poulin 2007). Il est tout de même utile de mentionner que contrairement à l'Afrique de l'ouest, des cas de compétitions interspécifiques ont été mis en évidence entre *R. (B.) decoloratus* et *R. (B.) microplus* en Afrique du sud (Norval & Short 1984; Tønnesen *et al.* 2004).

Ainsi, il s'avère nécessaire de poursuivre les travaux afin de déterminer laquelle de ces hypothèses pourrait être à la base de nos résultats, ou s'il s'agit d'une convergence de causes. En attendant, ces résultats nous amènent à suggérer aux éleveurs de la sous-région de traiter très tôt les premiers animaux infestés pour éviter que leur infestation ne s'accroisse avec le temps ou facilite l'infestation d'autres animaux.

Par ailleurs, l'agrégation des tiques semble se limiter seulement à l'installation sur l'hôte et non aux sites d'attachement de préférence. Autrement dit les tiques s'agrègent sur l'hôte certes, mais étant donné que chaque espèce a un site de préférence bien spécifique sur



l'hôte, le schéma de coopération observé à l'échelle « individu-hôte » n'est pas observé à l'échelle « site d'attachement » même en cas de partage du même site d'attachement de préférence par plusieurs espèces de tique. En effet, nos analyses ne mettent pas en évidence une aggrégation des espèces au niveau site d'attachement, y compris les espèces qui ont le même site d'attachement de préférence (e.g. *A. variegatum*, *R. (B.) microplus*). Cependant, nos résultats indiquent que la tique invasive *R. (B.) microplus* ne réussit pas à s'attacher à son site de préférence (i.e. Périnée et flanc) du fait de la présence des tiques natives. Ainsi, malgré sa forte abondance dans de nombreux sites (Madder *et al.* 2012; Toure *et al.* 2014), la fixation de la tique invasive au niveau de son site d'attachement de préférence ne serait pas facilitée par les espèces natives. On comprend alors mal la grande marge des abondances de la tique invasive en comparaison avec celles des espèces natives. Une étude pourrait se focaliser sur ce contraste afin de nous fournir plus de précisions sur les causes.

5.1.4 Utilité des informations d'interactions de tiques : cas des prédictions de distribution géographique

Les prévisions de distributions des tiques sont souvent établies en relation avec les facteurs climatiques et la végétation (Estrada-Peña *et al.* 2006; De Clercq *et al.* 2013). Cependant ces facteurs paraissent parfois insuffisants pour prédire les limites géographiques de la présence d'une espèce de tique donnée. Le cas de la tique invasive *R. (B.) microplus* est caractéristique. D'une part elle s'est installée en Afrique de l'ouest (Madder *et al.* 2011, 2012) contrairement à sa distribution géographique publiée par Estrada de la Pena *et al.* (2006). D'autre part la récente actualisation de sa distribution en Afrique de l'ouest, basée sur sa distribution au Bénin en 2011 (De Clercq *et al.* 2013) est dépassée par des collectes au nord Bénin en 2012-2013 (**Encart N°2**) et au nord du Nigéria dans la zone frontalière avec le Cameroun en 2009 et 2010 (Opara & Ezeh 2011; Musa *et al.* 2014). Mis à part le réchauffement climatique qui favoriserait cette évolution de la limite de distribution de *R. (B.) microplus* (Léger *et al.* 2013), des facteurs biotiques tels que les interactions que la tique établit avec les espèces natives, des sites d'invasion, constituent peut-être des éléments d'analyse négligés jusque-là. Afin de savoir quelle part pourraient jouer les interactions entre espèces de tiques dans les prédictions de distribution géographique de tiques, il s'avère nécessaire dans un premier temps de bien affiner l'étude sur les interactions interspécifiques. Pour ce faire et dans l'optique d'utiliser les résultats dans la prédictions de



la distribution de *R.(B.) microplus* par exemple, il faudra entreprendre une étude élargie à plusieurs pays de la sous-région et incluant aussi bien des zones où la présence de la « nouvelle tique » est avérée, des zones de présence potentielle selon les prévisions de De Clercq et al (2013) et des zones où la tique n'a jamais été récoltée jusque-là (e.g. Plateau central du Burkina Faso). Cette suggestion dans le choix des sites vient notamment du fait que nous avons observé au cours de nos analyses que la composition des communautés de tiques variait d'une zone à l'autre au Bénin et au Burkina Faso tel que cela a été observé avec d'autres parasites (Hutson *et al.* 2011; Vonshak & Gordon 2015).

5.2 Agents pathogènes transmis par les tiques du bétail : interactions interspécifiques, diversité génétique et probable nouveau vecteur

5.2.1 Disparité entre les patrons d'interactions entre agents pathogènes et tiques vectrices

Au sein des communautés de tiques du bétail au Bénin et au Burkina Faso, nous avons mis en évidence l'existence d'interactions agrégatives quelle que soit la zone considérée (Encart N°2), laquelle agrégation serait la première loi du parasitisme selon Poulin (Poulin 2007). Mais contrairement aux tiques, l'analyse des interactions entre les agents pathogènes transmis par les tiques du sous-genre *Boophilus* a révélé principalement un évitement entre *A. marginale* et *B. bigemina* d'une part et entre *B. bigemina* et *B. bovis* d'autre part (Encart N°4). En effet la probabilité qu'un animal soit infecté par *B. bovis* diminuait lorsqu'il était déjà infecté par *B. bigemina*, et vice-versa et il en est de même pour *A. marginale* et *B. bigemina* (Encart N°4). Cette compétition, quoique interne, rappelle tout de même celle de *R. (B.) microplus* avec les tiques natives au niveau de son site d'attachement de préférence sur l'hôte (Encart N°2). La gêne que constituent les tiques natives vis-à-vis de l'espèce invasive se refléterait peut-être sur les agents pathogènes transmis. Mais l'impact tout aussi négatif de *B. bovis* sur *B. bigemina* n'a pas de correspondant au sein des tiques, puisque *R. (B.) microplus* n'avait pas d'impact négatif sur les espèces natives au niveau de leur site d'attachement de préférence. Il se peut donc que, naturellement les interactions au sein des agents pathogènes et celles au sein de leurs vecteurs n'obéissent pas aux mêmes règles. En outre, notons que la compétition entre agents pathogènes peut s'avérer bénéfique pour les



animaux infestés, étant donné que les symptômes sont souvent agrégatives lors des co-infections (Thompson *et al.* 2001; Belongia 2002).

Mieux comprendre ce schéma majeur des interactions entre agents pathogènes et les mécanismes qui le sous-tend permettra sans doute d'optimiser les stratégies de lutte. De même, entreprendre une étude sur l'impact des interactions sur la lutte contre les agents pathogènes transmis par les espèces de tiques concernées en Afrique de l'ouest serait très utile pour l'efficacité des luttes et pour la santé des animaux.

5.2.2 Impact de l'invasion de *R. microplus* sur l'épidémiologie des maladies transmises en Afrique de l'ouest : des traces d'une co-introduction de souches de *B. bovis*.

Rappelons que même si *B. bovis*, l'espèce de *Babesia* sp la plus virulente (Coetzer & Tustin, 2004) peut être vectorisée par *R.(B.) annulatus*, *R. (B.) geigyi* et *R.(B.) microplus* (Akinboade & Dipeolu 1981; Uilenberg 1995; Bock *et al.* 2004), *R. (B.) microplus* est plus compétent pour sa transmission que les autres espèces sœurs. *R. (B.) microplus* a été introduite en Afrique de l'ouest au début des années 2000 (Madder *et al.* 2007, 2011, 2012). Mais la mise en évidence de la présence de *B. bovis* chez les bovins en Afrique de l'ouest remonte déjà avant les années 1990 où dans certains cas comme celui du Bénin il a même été rapporté des prévalences nationales supérieures (i.e. 31,11%) à celle de *B. bigemina* (14,40%) (Miller *et al.* 1984; Ajayi & Dipeolu 1986; Pangui & Salifou 1992). Toutefois au début des années 2000, les études de prévalences d'agents pathogènes transmis par les tiques dans des pays de la sous région, tel que le Bénin, ne faisaient plus cas de la présence de cette espèce de *Babesia* sp (Bell-Sakyi *et al.* 2004; Farougou *et al.* 2007c) jusqu'à l'introduction de *R. (B.) microplus*. Suite à cette introduction, des mortalités de bovins dues à des cas suspects de babésiose causée par *B. bovis* furent enregistrées sans que des cas cliniques ne soient observés (Maxime Madder, Communication personnelle). Par la suite en 2011, une étude épidémiologique a déterminé une prévalence de 24.29% de *B. bovis* chez 210 bovins au niveau national avec une variation de 8.7% (Atacora, Nord est Bénin) à 57.69% (Zou, vers le centre du Bénin) (Patsanza 2012). La même étude a mis en évidence une corrélation positive entre la tique invasive et *B. bovis* (Patsanza 2012). Ces résultats suggèrent donc que cette tique invasive aurait été introduite au Bénin avec son agent pathogène, *B. bovis*, tout comme ce fut le cas en Afrique du sud (Tønnesen *et al.* 2006).



5.2.3 Absence de corrélation significative entre *R. (B.) microplus* & *B. bovis* dans les sites d'expansion (récemment envahis) par *R. (B.) microplus* : résultante d'une coévolution hôte-vecteur?

La corrélation positive entre l'abondance de *R. (B.) microplus* et *B. bovis* n'a été mise en évidence que dans la zone 1, laquelle zone héberge le site de Kpinnou qui a accueilli les premiers bovins Girolando importés du Brésil en 2004 (Madder *et al.* 2012). Dans les autres zones, malgré la charge moyenne de tiques >12 tiques/animal, cette corrélation n'est pas significative. De plus au sud ouest du Burkina Faso, quoique non significative, elle est même négative (négativement non significative). L'historique d'invasion de chacune de ces zones pourrait être un élément d'explication de cette variation. Au sud Bénin, où le vecteur a été introduit en 2004, la corrélation est significativement positive. Au nord du Bénin où le vecteur est amené entre 2004 et 2011, la corrélation n'est pas significative mais tout de même positive. Au sud du Burkina Faso où la présence du vecteur a été mise en évidence pour la première fois en 2011 la corrélation est non significativement négative. Il s'agit là d'un gradient qui semble être dépendant du temps de contact entre le vecteur et l'hôte. On pourrait parler d'une co-évolution, dans le temps, de la relation vecteur-hôte-parasite. Etant donné que les résultats du sud Bénin sont obtenus sur la base de collecte de sang huit ans (2004-2012) après le premier contact de *R.(B.) microplus* avec les animaux, pour vérifier cette hypothèse, on pourrait reprendre d'ici quelques années (e.g. 2016 au nord Bénin et 2019 au Burkina Faso) des collectes de sang sur des Bovins, même de façon ponctuelle au nord du Bénin et au sud ouest du Burkina Faso pour réaliser les mêmes analyses. Toutefois, l'implication de la Côte d'Ivoire, qui rappelons-le est le premier pays d'introduction de *R. microplus* dans la sous-région, s'avère indispensable.

5.2.4 E. ruminantium : de la diversité génétique chez le vecteur habituel à la transmission par une espèce invasive en Afrique de l'ouest

5.2.4.1 Diversité génétique d'E. ruminantium en Afrique de l'ouest et développement de vaccin contre la cowdriose

Parmi les agents pathogènes transmis par les tiques du bétail en Afrique de l'ouest *E. ruminantium* a pendant longtemps été indiqué comme responsable de taux de mortalité élevé (>80%) notamment chez les ovins (Adakal *et al.* 2004). Les recherches de cocktails vaccinaux efficaces pour la lutte contre la cowdriose, causée par cette rickettsie, se sont souvent heurtées à la diversité génétique et antigénique de souches de terrain malgré quelques résultats satisfaisants (72% de protection) (Adakal *et al.* 2010b). Dès lors l'emploi



de souches de terrain dans la composition de ces cocktails vaccinaux paraît l'une des pistes de solution par excellence. Des essais vaccinaux réalisés au Burkina Faso ont d'ailleurs démontré l'efficacité des souches de terrain contre des ovins (Adakal *et al.* 2010b). De fait, le cocktail vaccinal composé d'une souche isolée au Burkina Faso (BK242) sur un ovin infesté et mort de la coudriose, et de la souche de référence Gardel a fourni 72% de protection lors de l'infestation par des souches locales (Adakal *et al.* 2010b). Dès lors, une augmentation du nombre de souches locales dans les cocktails pourrait augmenter les chances d'efficacité des vaccins sur un large spectre de souches de terrain étant donné la diversité génétique des souches. C'est-à-dire utiliser par exemple autant de souches qu'il existe de génotypes dans une région donnée. Il faudra débiter une telle étude à une petite échelle, village/ville, avant d'élargir les zones d'échantillonnage. La grande question sera comment choisir les souches. Il faudra sans doute, dans un premier temps, procéder à une caractérisation de l'épidémiologie moléculaire de chaque zone d'étude, mais le choix du gène approprié reste encore hypothétique. En effet, la cible idéale pour une telle étude est un (ou des) gène(s) d'*E. ruminantium* impliqué(s) dans la réponse immunitaire de l'hôte. Or jusque là de tel(s) gène(s) n'a (ont) pas encore été identifié(s). Ceci étant, la grande diversité génétique mise en évidence en Afrique de l'ouest au cours de nos travaux (**Encart N°3**), à partir des gènes de ménage, ne serait utile pour le développement de vaccins, pour le sud, l'est et l'ouest de l'Afrique, que si nos résultats venaient à être confirmés par une étude basée sur des gènes ciblés par le système immunitaire. Etant donnée la diversité génétique des souches d'*E. ruminantium* en Afrique de l'ouest, cette région du continent serait peut-être aussi appropriée pour une investigation de ce gène impliqué dans l'immunité. En attendant, nos résultats constituent tout de même un repère, une importante base de données pour de futurs travaux sur l'épidémiologie moléculaire d'*E. ruminantium* en Afrique et pour le développement de vaccin contre la coudriose.

En outre, l'absence de pic épidémique au Bénin comme celui observé au Burkina Faso, a sans doute été favorisée par l'absence d'échantillonnage à l'image de ce qui fut réalisé au Burkina Faso (**Encart N°3**). Pour s'assurer de la non spécificité de tel phénomène au Burkina Faso, il aurait fallu réaliser un échantillonnage qui reflète exactement ce qui fut fait au Burkina Faso. De plus, pour vérifier l'impact des essais vaccinaux sur la survenance du pic épidémique on pourrait choisir une zone au Bénin par exemple et effectuer des essais vaccinaux puis y



retourner quelques mois plus tard pour échantillonner. La méthode de Multi Locus VNTR (Variable Number Tandem-Repeat) Analysis (MLVA) pouvant permettre d'associer une étude du génotype et du phénotype d'*E. ruminantium* (Nakao *et al.* 2012), elle pourrait être utilisée pour la caractérisation des souches à identifier.

5.2.4.2 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* : un nouveau vecteur de *Ehrlichia ruminantium* en Afrique de l'ouest ?

La mise en évidence de la présence de l'ADN d'*E. ruminantium* dans les œufs et les larves *R. (B.) microplus* indique une transmission transovarienne de la bactérie chez la tique mais ne révèle pas à ce stade des travaux si la descendance des tiques est à même de transmettre cet agent pathogène à leurs hôtes, ni si une fois la bactérie transmise les hôtes pourraient développer la maladie, la cowdriose. Il s'agit là de deux importantes questions de recherches qui méritent d'être prospectées d'autant plus que leurs résultats pourraient influencer l'épidémiologie de la cowdriose dans la sous-région. De fait, étant données les abondances élevées actuelles de la tique en question, une transmission transovarienne couplée avec une compétence vectorielle de *R. (B.) microplus* conduiraient sans doute à une épizootie en Afrique de l'ouest. Le Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES, Burkina Faso) disposant d'un cadre adéquat pour de tels travaux et où des expériences du genre ont déjà été réalisées sur la transmission transovarienne du même agent pathogène chez *A. variegatum* (Hassane Adakal, communication personnelle), pourrait héberger les travaux sur la transmission de *E. ruminantium* par *R. (B.) microplus* aux hôtes (ovins ou bovins) et sa compétence vectorielle.

De plus, même en cas de transmission à l'hôte par *R. (B.) microplus*, une tique monoxène, sa compétence vectorielle pourrait être différente de celle de *A. variegatum*, une tique trixène. De fait, cette tique invasive vectorise *B. bovis* au même titre que *R. (B.) annulatus* et *R. (B.) geigy* (Akinboade & Dipeolu 1981; Uilenberg 1995; Bock *et al.* 2004), mais s'est révélée être plus compétente que ses deux espèces sœurs. Ce nouveau vecteur pourrait donc se montrer aussi plus compétent que *A. variegatum* en ce qui concerne *E. ruminantium*. La vérification d'une telle différence de compétence pourrait toute aussi être faite dans la même foulée que celle de la compétence vectorielle.



Cependant, la lignée de la tique *R. (B.) microplus* utilisée au cours de nos expérimentations, la souche KIMINI, pourrait être particulièrement disposée à la transmission transovarienne d'*E. ruminantium*. Autrement dit, les présents résultats auraient pu ne pas être obtenus si d'autres souches de la tique invasive avaient été utilisées. Pour s'assurer de la non spécificité de cette souche KIMINI, d'autres souches d'origines diverses devraient être impliquées dans une étude de transmission voire de compétence vectorielle.

Enfin, étant donnés ces résultats, il s'avère important de savoir quelles sont les interactions entre *E. ruminantium* et *A. marginale*, *B. bigemina* et *B. bovis* qui sont connus comme étant vectorisés par *R. (B.) microplus* à travers différents modes de transmission. L'agent pathogène de la cowdriose, *E. ruminantium*, n'a pas été inclus dans nos travaux d'interactions entre agents pathogènes mais il est à présent crucial de savoir quels liens existent entre tous ces agents pathogènes. De plus une telle étude devrait également prospecter la relation qui existe entre *E. ruminantium* et *R. (B.) microplus*, aussi bien son abondance que son incidence, dans différents sites et/ou zones.

5.3 Génétique des populations de *R. (B.) microplus* et intérêts pour la lutte en Afrique de l'ouest

Notre thèse a permis de développer des marqueurs microsatellites adaptés à l'étude des populations de *R. (B.) microplus* de l'Afrique de l'ouest. Seulement cinq de ces marqueurs ont été validés et utilisés au cours de nos travaux. Etant donné que l'augmentation du nombre de marqueurs microsatellites au cours d'étude de génétique des populations renforce les résultats obtenus (De Meeûs 2012), et que deux des cinq nouveaux marqueurs présentent des déficits d'hétérozygotes et des déséquilibres de liaison, il serait souhaitable que la validation d'autres marqueurs du lot des dix prometteurs soit effectuée (**Encart N°6**). De plus, il sera tout aussi utile de reprendre le processus de validation pour d'autres marqueurs parmi la cinquantaine identifiée au départ (**Encart N°6**). Ceci permettra de disposer de plus de marqueurs pour des études de populations de la tique en Afrique de l'ouest, voire ailleurs. On pourrait par exemple commencer par étudier les populations impliquées dans la présente étude afin de vérifier les résultats obtenus avec nos sept marqueurs (cinq nouveaux +deux anciens), avant d'étendre l'étude à d'autres pays, voire d'autres régions. De fait, le développement *in silico* de nos marqueurs pourrait bien palier à la nécessité du renouvellement (constant) de ces outils pour des études de génétique des



populations à chaque invasion d'une région donnée par *R. (B.) microplus* (Koffi *et al.* 2006b; a; Boucher 2013).

Par ailleurs, l'étude de la génétique des populations de *R. (B.) microplus* du Bénin et du Burkina Faso a révélé une structuration au niveau « troupeau » et une différenciation génétique des tiques des deux pays. L'introduction de la tique invasive en Afrique de l'ouest s'étant effectuée dans deux pays : le Bénin et la Côte d'Ivoire (Madder *et al.* 2007, 2012), il s'avère donc important d'étudier les populations de *R. (B.) microplus* de la Côte d'Ivoire en relation avec celles du Bénin et du Burkina Faso. Ceci permettra de vérifier si la structuration identifiée au cours de nos travaux est généralisée et non dépendante des événements d'invasion. Il faudra cependant tenir compte du fait que l'invasion de la Côte d'Ivoire s'est réalisée en deux étapes (Louise Achi, communication personnelle). L'invasion la plus connue et datée à ce jour est celle identifiée par Madder *et al.* (2007) à Azaguié, au sud de la Côte d'Ivoire, se rapportant à des importations de bovins Girolando en 2002-2004. Cependant des collectes de tiques au nord de la Côte d'Ivoire en 1996, pour lesquelles les identifications ont été reprises après les alertes d'invasions au sud ont révélé la présence de *R. (B.) microplus* (Louise Achi, communication personnelle). Ceci dit, ces deux introductions peuvent ne pas présenter les mêmes caractéristiques, et donc ne pas avoir les mêmes impacts sur les animaux, notamment les bovins plus prépondérants au nord du pays. De fait, certaines substances acaricides seraient efficaces sur des tiques *R. (B.) microplus* au nord de la Côte d'Ivoire mais pas au sud. Toutefois, il n'y a pas encore eu d'étude précise pour identifier la cause d'une telle différenciation, pas plus que de celle de l'inefficacité de tels produits sur les populations de la tique au sud du Burkina Faso. Eu égard à cette double invasion (nord-sud) en Côte d'Ivoire, il sera peut-être plus difficile de pouvoir identifier les fronts d'invasion comme c'est le cas au Bénin (**Encart N°6**). L'invasion ayant à présent couvert toutes les régions du pays du nord au sud et de l'est à l'ouest (Toure *et al.* 2014) il serait d'autant plus nécessaire, quoique difficile, de déterminer les différents fronts d'invasion.

En outre, étant donné que nous avons mis en évidence une structuration des populations de *R. (B.) microplus* au Bénin, on pourrait envisager une étude (la plus exhaustive possible) de la diversité des molécules utilisables pour lutter contre la tique au Bénin. Une telle étude a été entamée au cours du projet WECATIC (Contrôle intégré des tiques et des maladies transmises émergentes en Afrique de l'Ouest et du Centre) et continue actuellement avec le



projet PRT (Projet de lutte contre la Tique *R. (B.) microplus* en Afrique de l'Ouest), couvrant plusieurs pays de l'Afrique de l'ouest dont le Bénin et le Burkina Faso. Les résultats de tels travaux seront très utiles pour des luttes efficaces. Ils seront renforcés par les résultats d'efficacité d'extraits végétaux en milieux réels, lesquels extraits fournissent jusqu'à 100% d'efficacité sur des larves de *R. (B.) microplus* récoltées au Bénin (Safiou Adehan, communication personnelle). La combinaison de ces différents résultats favorisera l'application de la « stratégie de zone stables » qui a été développée chez le moustique *Culex pipiens* dans le sud de la France (Guillemaud *et al.* 1998; Chevillon *et al.* 1999) puis adaptée aux ravageurs des cultivars transgéniques biocides (Vacher *et al.* 2003, 2004). Une telle stratégie pourra ensuite être appliquée à d'autres pays de la sous-région en fonction des résultats de l'étude de la structuration génétique.

En somme, cette thèse a permis de mieux appréhender d'une part les communautés de tiques du bétail et des agents pathogènes transmis par les tiques en Afrique de l'ouest et d'autre part des mécanismes populationnels impliqués dans son invasion. Nous avons démontré que la tique invasive ne s'est pas limitée à ses deux pays d'introduction (i.e. Bénin et la Côte d'Ivoire) mais qu'elle se retrouve désormais également au Burkina Faso, au Mali et au Togo à la faveur des transhumances de bétail. Nos analyses révèlent également une variation spatiale des assemblages de tiques et une variation temporelle d'abondance de tiques au niveau du plateau central du Burkina Faso. L'agrégation des communautés de tiques sur leurs hôtes mise en évidence dans cette thèse est généralisée au niveau de tous les sites. De plus nous avons observé que loin de diminuer la menace que constituaient les tiques natives du bétail avant son invasion, *R. (B.) microplus*, vient rajouter d'autres menaces à celles engendrées par ces tiques natives. Et au titre des menaces, la mise en évidence de la transmission d'*E. ruminantium* par des femelles *R.(B.) microplus* à leurs descendances en constitue une des non moins importantes. En ce qui concerne les agents pathogènes transmis par les tiques du sous genre *Boophilus*, leurs assemblages varient en fonction des sites et le schéma d'interactions est principalement un évitement. Par ailleurs, nos analyses suggèrent que *R. (B.) microplus* aurait été introduite au Bénin ensemble avec son agent pathogène, *B. bovis*. D'autre part, il ressort de l'étude de la diversité génétique de souches d'*E. ruminantium* de différentes zones d'Afrique que l'Afrique de l'ouest présente une plus grande diversité de souches que le sud et l'est du continent. Ceci pourrait s'avérer être utile



dans le cadre de développement de vaccins contre la cowdriose. L'étude de la génétique des populations de *R. (B.) microplus* a quant à elle permis de développer de nouveaux marqueurs microsatellites, révélé une forte structuration des populations et indiqué une différenciation entre les populations de la tique du Bénin et du Burkina Faso. Nous avons de plus déterminé au sein des populations de *R.(B.) microplus* du Bénin l'isolement par la distance, la variation des tailles de populations (entre front d'invasion et populations initiales) et le fait que le niveau troupeau se trouve être la limite d'une population. L'apport de ces résultats à la lutte contre la tique invasive a été discuté dans cette thèse.



Références bibliographiques

- Adakal H (2009) Etude intégrative de la structuration des populations d'Ehrlichia ruminantium dans la zone de Békuy, Burkina Faso : application à la formulation d'un vaccin efficace contre la cowdriose. Doctorate Thesis. University Montpellier II, Montpellier, France.
- Adakal H, Bada-Alambéji R, Stachurski F (2004) Etude de la variabilité antigénique d'Ehrlichia ruminantium dans la région sud-ouest du Burkina Faso en vue de l'application d'une vaccination. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*, **2**, 132–137.
- Adakal H, Biguezoton A, Zoungrana S *et al.* (2013a) Alarming spread of the Asian cattle tick Rhipicephalus microplus in West Africa—another three countries are affected: Burkina Faso, Mali and Togo. *Experimental and Applied Acarology*, **61**, 383–386.
- Adakal H, Gavotte L, Stachurski F *et al.* (2010a) Clonal origin of emerging populations of Ehrlichia ruminantium in Burkina Faso. *Infection, Genetics and Evolution*, **10**, 903–912.
- Adakal H, Meyer DF, Carasco-Lacombe C *et al.* (2009) MLST scheme of Ehrlichia ruminantium: Genomic stasis and recombination in strains from Burkina-Faso. *Infection, Genetics and Evolution*, **9**, 1320–1328.
- Adakal H, Stachurski F, Chevillon C (2013b) Tick control practices in Burkina Faso and acaricide resistance survey in Rhipicephalus (Boophilus) geigyi (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, **59**, 483–491.
- Adakal H, Stachurski F, Konkobo M *et al.* (2010b) Efficiency of inactivated vaccines against heartwater in Burkina Faso: Impact of Ehrlichia ruminantium genetic diversity. *Vaccine*, **28**, 4573–4580.
- Ajayi SA, Dipeolu OO (1986) Prevalence of Anaplasma marginale, Babesia bigemina and B. bovis in Nigerian cattle using serological methods. *Veterinary Parasitology*, **22**, 147–149.
- Akinboade O., Dipeolu O. (1981) Detection of Babesia bovis infections in Boophilus geigyi with egg crushings, larval smears, and haemolymph puncture. *Vet Q*, **3**, 143 – 147.
- Allsopp B. (2009) Trends in the control of heartwater. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **76**, 81–88.



- van Amstel S., Reyers F, Oberem P., Matthee O (1987) Further studies of the clinical pathology of sweating sickness in cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **54**, 45 – 48.
- Angelo IC, Fernandes ÉKK, Bahiense TC *et al.* (2012) Virulence of *Isaria* sp. and *Purpureocillium lilacinum* to *Rhipicephalus microplus* tick under laboratory conditions. *Parasitology Research*, **111**, 1473–1480.
- Angus B. (1996) The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *International Journal for Parasitology*, **26**, 1341–1355.
- ANOPER (2014) *La situation actuelle de l'élevage et des éleveurs de ruminants au Bénin: Analyse et perspectives. Association nationale des organisations professionnelles d'éleveurs de ruminants du Bénin (ANOPER)*. Cotonou, Bénin.
- Aubry P, Geale D. (2011) A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, **58**, 1–30.
- Awa D (1997) Serological survey of heart- water relative to the distribution of the vector *Amblyomma variegatum* and other tick species in north cameroon. *Veterinary Parasitology*, **68**, 165–173.
- Baffi M., de Souza G., de Sousa C., Ceron C., Bonetti A. (2008) Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephallus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari, Ixodidae). *Molecular and Biochemical Parasitology*, **160**, 70–73.
- Barbosa C da S, Borges LMF, Nicácio J *et al.* (2013) In vitro activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, **60**, 421–430.
- Barré N, Morel P. (1983) Ticks (Acarina, Ixodoidea) of the Mascarene Islands (Indian Ocean) and diseases transmitted by them. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **36**, 371–377.
- Barré N, Uilenberg G (2010) Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, **29**, 149–160, 135–147.



- Bayer W, Maina J. (1984) Seasonal pattern of tick load in Bunaji cattle in the subhumid zone of Nigeria. *Veterinary Parasitology*, **15**, 301–317.
- Beati L, Keirans JE (2001) 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. *Journal of Parasitology*, **87**, 32–48.
- Beati L, Patel J, Lucas-Williams H *et al.* (2012) Phylogeography and Demographic History of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the Tropical Bont Tick. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, **12**, 514–525.
- Bell-Sakyi L, Koney EBM, Dogbey O, Walker AR (2004) Incidence and prevalence of tick-borne haemoparasites in domestic ruminants in Ghana. *Veterinary Parasitology*, **124**, 25–42.
- Belongia EA (2002) Epidemiology and Impact of Coinfections Acquired from Ixodes Ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **2**, 265–273.
- Bennett J. (2004) Pests and disease in the Pacific War: crossing the line. In: *Natural enemy, natural ally: toward an environmental history of warfare*, pp. 217–252. Corvallis, Oregon State University Press, Oregon, USA.
- Beugnet F, Costa R, Chardonnet L (1994) Adaptations des méthodes de lutte contre les tiques à l'extension du phénomène de chimiorésistance: exemple de *Boophilus microplus* en Nouvelle-Calédonie. *Revue de Medecine Veterinaire*, **145**, 931–940.
- Biguezoton A, Adehan S, Adakal H *et al.* (2016) Community structure, seasonal variations and interactions between native and invasive cattle tick species in Benin and Burkina Faso. *Parasites & Vectors*, **9**, 43.
- Blouin EF, van Rensburg L (1988) An ultrastructural study of the development of *Babesia occultans* in the salivary glands of adult *Hyalomma marginatum rufipes*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **55**, 93 – 100.
- Bock R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W (2004) Babesiosis of cattle. *Parasitology*, **129**, S247–S269.



- Boka M, Maddler M, Achi L, Yalacé Y, Berkvens D (2014) Modélisation du remplacement de *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* par *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, une tique émergente en Côte d’Ivoire. *European Scientific Journal*, **10**.
- Borges LMF, Sousa LAD de, Barbosa C da S (2011) Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **20**, 89–96.
- Boucher F (2013) *Génétique des populations de la tique invasive du bétail Rhipicephalus (Boophilus) microplus en Afrique du Sud*. Master 1 Thesis. Montpellier, France.
- Bram R., Gray J. (1979) Eradication – an alternative to tick and tick-borne disease control. *FAO world animal review*, **30**, 30–35.
- Brito LG, Rocha RB, Barbieri F da S *et al.* (2013) *Babesia bovis* infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. *Ticks and Tick-borne Diseases*, **4**, 78–82.
- Brossard M, Wikel SK (2004) Tick immunobiology. *Parasitology*, **129 Suppl**, S161-176.
- Burger TD, Shao R, Barker SC (2014) Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **76**, 241–253.
- Busch JD, Stone NE, Nottingham R *et al.* (2014) Widespread movement of invasive cattle fever ticks (*Rhipicephalus microplus*) in southern Texas leads to shared local infestations on cattle and deer. *Parasites & Vectors*, **7**, 188.
- Camicas J-L, Hervy J-E, Adam F, Morel P. (1998) *The Ticks of the World (Acarida, Ixodida). Nomenclature, Described Stages, Hosts, Distribution*. Paris.
- CAPES (2003) *Exportations, croissance et lutte contre la pauvreté au Burkina Faso*. Ouagadougou, Burkina Faso.
- de Castro JJ (1997) Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology*, **71**, 77–97.

- CEDEAO, CSAO/OCDE (2008) *Élevage et marché régional au Sahel et en Afrique de l'Ouest*
Potentialités et défis. CSAO-OCDE / CEDEAO, Paris, France.
- Centurier C (1982) Contribution to the biology of *Hyalomma impressum* (Koch, 1844): feeding of
Hyalomma impressum larvae on jirds (*Meriones unguiculatus*). *Wiadomości*
parazytologiczne, **28**, 21–25.
- Chartier C, Itard J, Morel P., Troncy P. (2000) *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale*. Paris,
France.
- Chevillon C, Ducornez S, de Meeûs T *et al.* (2007a) Accumulation of acaricide resistance mechanisms
in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations from New Caledonia
Island. *Veterinary Parasitology*, **147**, 276–288.
- Chevillon C, Huber K (2016) Les tiques invasives. In: *Tiques et maladies à tique: une introduction*
multidisciplinaire, p. 348. Karen D. McCoy et Nathalie Boulanger, France.
- Chevillon C, Koffi BB, Barré N *et al.* (2007b) Direct and indirect inferences on parasite mating and
gene transmission patterns: Pangamy in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
Infection, Genetics and Evolution, **7**, 298–304.
- Chevillon C, Pasteur N, Marquine M, Heyse D, Raymond M (1995) Population Structure and Dynamics
of Selected Genes in the Mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*, **49**, 997–1007.
- Chevillon C, Raymond M, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N (1999) Population genetics of
insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Biological Journal of the Linnean Society*,
68, 147–157.
- Collins NE, Pretorius A, Van Kleef M *et al.* (2003) Development of Improved Vaccines for Heartwater.
Annals of the New York Academy of Sciences, **990**, 474–484.
- CORAF/WECARD (2010) *Priorités de recherche pour le développement de l'élevage, de la pêche et de*
l'aquaculture en Afrique de l'ouest. Dakar, Sénégal.
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for
learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, **9**, 539.

- Corn J., Barré N, Thiebot B *et al.* (1993) Potential role of cattle egrets, *Bubulcus ibis* (Ciconiiformes: Ardeidae), in the dissemination of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in the eastern Caribbean. *Journal of Medical Entomology*, **30**, 1029–1037.
- Corson MS, Teel PD, Grant WE (2003) Simulating detection of cattle-fever tick (*Boophilus* spp.) infestations in rotational grazing systems. *Ecological Modelling*, **167**, 277–286.
- Courtin D, Berthier D, Thevenon S *et al.* (2008) Host genetics in African trypanosomiasis. *Infection, Genetics and Evolution*, **8**, 229–238.
- Crofton HD (1971) A quantitative approach to parasitism. *Parasitology*, **62**, 179–193.
- Cruz AC, Zwegarth E, Ribeiro MFB *et al.* (2012) New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. *Parasites & Vectors*, **5**, 291.
- De Clercq EM, Estrada-Peña A, Adehan S, Madder M, Vanwambeke SO (2013) An update on distribution models for *Rhipicephalus microplus* in West Africa. *Geospatial Health*, **8**, 301–308.
- De Clercq EM, Vanwambeke SO, Sungirai M *et al.* (2012) Geographic distribution of the invasive cattle tick *Rhipicephalus microplus*, a country-wide survey in Benin. *Experimental and Applied Acarology*, **58**, 441–452.
- De Meeûs T (2012) *Initiation à la génétique des populations naturelles : applications aux parasites et à leurs vecteurs*. IRD, Marseille.
- De Meeûs T, Koffi BB, Barré N, de Garine-Wichatitsky M, Chevillon C (2010) Swift sympatric adaptation of a species of cattle tick to a new deer host in New Caledonia. *Infection, Genetics and Evolution*, **10**, 976–983.
- De Vos S, Zeinstra L, Taoufik A, Willadsen P, Jongejan F (2001) Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Experimental & applied acarology*, **25**, 245–261.

- Demessie Y, Derso S (2015) Tick Borne Hemoparasitic Diseases of Ruminants: A Review. *Advances in Biological Research*, **9**, 210–224.
- Diop A., Cesaro J, Touré I, Ickowicz A, Toutain B (2012) Évolution des transhumances. In: *Atlas des évolutions des systèmes pastoraux au Sahel*, pp. 14–15. Touré I., Ickowicz A., Wane A., Garba I., Gerber P.
- Djakaridja B, Kouassi YP, Biego GG *et al.* (2014) Situation épidémiologique des hémoparasites des bovins dans deux zones d'élevage de la Cote d'Ivoire : cas des anciennes régions des Savanes et de la vallée du Bandama. *Revue de Medecine Veterinaire*, **165**, 297–303.
- Dogo GA, Kwaga KPJ, Umoh UJ, Agbede SR, Jongejan F (2015) Molecular Detection and Characterization of Bm86 Gene Homologues from *Hyalomma truncatum*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* and *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus* for the Development of an Anti-Tick Vaccine in Nigeria. *International Journal of Livestock Research*, **5**, 34–41.
- Dold A., Cocks M. (2001) Traditional veterinary medicine in the Alice district of the Eastern Cape Province, South Africa. *SOURCE South African Journal of Science*, **97**, 375–379.
- Dossou-Gbete G, Salifou S, Aboh A, Dossa S (2006) Evaluation Participative de l'importance des Tiques et méthodes endogènes de lutte au nord Bénin : Perspectives et valorisation. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*, **4**, 61–68.
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas J-L *et al.* (2006) The known distribution of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology*, **38**, 219–235.
- Estrada-Peña A, Pegram R., Barre N, Venzal JM (2007) Using invaded range data to model the climate suitability for *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in the New World. *Experimental and Applied Acarology*, **41**, 203–214.
- Estrada-Peña A, Venzal JM, Nava S *et al.* (2012) Reinstatement of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *australis* (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. *Journal of Medical Entomology*, **49**, 794–802.



- Faburay B, Münstermann S, Geysen D, Jongejan F (2004) *A contribution to the epidemiology of Ehrlichia ruminantium infection (heartwater) in small ruminants in the Gambia*. ITC (International Trypanotolerance Centre), Banjul, Gambia.
- FAO (2012) *La transhumance transfrontalière en Afrique de l'Ouest Proposition de plan d'action*.
- FAOSTAT (2015) FAO Statistics Division.
- Farougou S, Adakal H, Biguezoton A., Boko C (2012) Prévalence de l'infection d'Amblyomma variegatum par Ehrlichia ruminantium dans les élevages extensifs du Bénin. *Revue de Medecine Veterinaire*, **163**, 261–266.
- Farougou S, Kpodekon M, Adakal H, Sagbo P, Boko C (2007a) Abondance saisonniere des tiques (Acari: Ixodidae) parasites des ovins dans la region meridionale du Benin. *Revue de Medecine Veterinaire*, **158**, 627–632.
- Farougou S, Kpodekon M, Tassou A (2007b) Abondance saisonnière des tiques (Acari: Ixodidae) parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin: cas des départements du Borgou et de l'Alibori. *Rev. Afr. Santé Prod. Anim*, **5**, 61–67.
- Farougou S, Kpodekon M, Tchabode D., Youssao AK., Boko C (2006) Abondance saisonnière des tiques (acari: Ixodidae) parasites des bovines dans la zone soudanienne du Bénin: cas des départements de l'Atacora et de la Donga. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **150**, 145–152.
- Farougou S, Tassou A, Tchabode D. et al. (2007c) Tiques et hémoparasites du bétail dans le nord-Bénin. *Revue de Medecine Veterinaire*, **158**, 463–467.
- Farougou S, Toguebaye B., Tounkara K, Sy D, Akakpo A (1998) Epidémiologie de la cowdriose au Bénin. 1-Etude préliminaire sur la présence du germe chez les tiques vectrices. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **149**, 953–958.
- Folstad I, Karter AJ (1992) Parasites, Bright Males, and the Immunocompetence Handicap. *The American Naturalist*, **139**, 603–622.

- Frisch JE (1999) Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *International Journal for Parasitology*, **29**, 57–71.
- Frisch JE, O'Neill CJ (1998) Comparative evaluation of beef cattle breeds of African, European and Indian origins. 2. Resistance to cattle ticks and gastrointestinal nematodes. *Animal Science*, **67**, 39–48.
- de la Fuente J, Contreras M (2015) Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Rev Vaccines*, **Aug 6**, 1–10.
- de la Fuente J, Rodríguez M, García-Garí JC (2000) Immunological Control of Ticks through Vaccination with *Boophilus microplus* Gut Antigens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **916**, 617–621.
- de la Fuente J, Villar M, Contreras M *et al.* (2015) Prospects for vaccination against the ticks of pets and the potential impact on pathogen transmission. *Veterinary Parasitology*, **208**, 26–29.
- Futse JE, Ueti MW, Knowles DP, Palmer GH (2003) Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: Retention of Vector Competence in the Absence of Vector-Pathogen Interaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**, 3829–3834.
- Gachohi J, Skilton R, Hansen F, Ngumi P, Kitale P (2012) Epidemiology of East Coast fever (*Theileria parva* infection) in Kenya: past, present and the future. *Parasites & Vectors*, **5**, 194.
- George JE (1987) Cattle fever tick eradication programme in the USA: history, achievements, problems and implications for other countries. In: *The eradication of ticks*, pp. 1–7.
- Ghosh S, Sharma AK, Kumar S *et al.* (2011) In vitro and in vivo efficacy of *Acorus calamus* extract against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Parasitology Research*, **108**, 361–370.
- Ghosh S, Tiwari SS, Srivastava S *et al.* (2013) Acaricidal properties of *Ricinus communis* leaf extracts against organophosphate and pyrethroids resistant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Veterinary Parasitology*, **192**, 259–267.
- Goudet J (1994) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.



- Goudet J (2005) hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 184–186.
- Gourbière S, Morand S, Waxman D (2015) Fundamental Factors Determining the Nature of Parasite Aggregation in Hosts. *PLoS ONE*, **10**, e0116893.
- Grisi L, Massard C., Moya BG., Pereira (2002) Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, **21**, 8–10.
- Guerrero FD, Lovis L, Martins JR (2012) Acaricide resistance mechanisms in Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **21**, 1–6.
- Gueye A, Mbengue M, Diouf A (1990) Ticks and hemoparasitic diseases in cattle in Senegal. iv. the southern Sudan area. *Revue d'Élevage et de Médecine Tropicale*, **42**, 517–528.
- Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA *et al.* (2010) The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, **2528**, 1–28.
- Guillemaud T, Lenormand T, Bourguet D *et al.* (1998) Evolution of Resistance in Culex pipiens: Allele Replacement and Changing Environment. *Evolution*, **52**, 443–453.
- Hanotte O, Bradley DG, Ochieng J. *et al.* (2002) African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science*, **296**, 336–339.
- Hutson KS, Brock EL, Steer MA (2011) Spatial variation in parasite abundance: evidence of geographical population structuring in southern garfish Hyporhamphus melanochir. *Journal of Fish Biology*, **78**, 166–182.
- Ijaz M, Rehman A, Ali M. *et al.* (2013) Clinico-epidemiology and therapeutical trials on babesiosis in sheep and goats in Lahore, Pakistan. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, **23**, 666–669.
- INSAE (2015) Statistiques économiques : Produit intérieur brut. <http://www.insae-bj.org/produit-interieur.html>.
- Jongejan F (1991) Protective immunity to heartwater (Cowdria ruminantium infection) is acquired after vaccination with in vitro-attenuated rickettsiae. *Infection and Immunity*, **59**, 729–731.



- Jongejan F, Morzaria S., Mustafa O., Latif A. (1983) Infection rates of *Theileria annulata* in the salivary glands of the tick *Hyalomma marginatum rufipes*. *Veterinary Parasitology*, **13**, 121 – 126.
- Jongejan F, Uilenberg G (2004) The global importance of ticks. *Parasitology*, **129**, 1–12.
- Kaboré H, Salembere M., Tamboura H. (1998) Seasonal Variation of Ticks on Cattle in Burkina Faso. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **849**, 398–401.
- Kimaro E., Opdebeeck J. (1994) Tick infestations on cattle vaccinated with extracts from the eggs and the gut of *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, **52**, 61–70.
- Koffi BB, De Meeûs T, Barré N *et al.* (2006a) Founder effects, inbreeding and effective sizes in the Southern cattle tick: the effect of transmission dynamics and implications for pest management. *Molecular Ecology*, **15**, 4603–4611.
- Koffi BB, Risterucci AM, Joulia D *et al.* (2006b) Characterization of polymorphic microsatellite loci within a young *Boophilus microplus* metapopulation. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 502–504.
- Koney EBM, Dogbey O, Walker AR, Bell-Sakyi L (2004) Ehrlichia ruminantium seroprevalence in domestic ruminants in Ghana. II. Point prevalence survey. *Veterinary Microbiology*, **103**, 183–193.
- Koney E., Morrow A., Heron I. (1996) The association between *Amblyomma variegatum* and dermatophilosis: epidemiology and immunology. *Tropical Animal Health and Production*, **28**(Suppl 2), 18S – 25S. discussion 74S–86S.
- Koney EB., Walker A., Heron I., Morrow A., Ambrose M. (1994) Seasonal prevalence of ticks and their association with dermatophilosis in cattle on the Accra plains of Ghana. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **47**, 163–167.
- Krasnov BR, Morand S, Hawlena H, Khokhlova IS, Shenbrot GI (2005a) Sex-biased parasitism, seasonality and sexual size dimorphism in desert rodents. *Oecologia*, **146**, 209–217.
- Krasnov BR, Mouillot D, Shenbrot GI, Khokhlova IS, Poulin R (2005b) Abundance patterns and coexistence processes in communities of fleas parasitic on small mammals. *Ecography*, **28**, 453–464.



- Labruna MB, Naranjo V, Mangold A. *et al.* (2009) Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Bmc Evolutionary Biology*, **9**, 1–12.
- Lafia S (1982) Les tiques (Amblyomidae) parasites des bovins en république Populaire du Bénin. Mémoire de médecine vétérinaire Thesis. Université de Dakar, Dakar.
- Lefevre P., Blancous J, Chermitte R, Uilenberg G (2010) *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. Lavoisier, France.
- Léger E, Vourc'h G, Vial L, Chevillon C, McCoy KD (2013) Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology*, **59**, 219–244.
- Lempereur L, Geysen D, Madder M (2010) Development and validation of a PCR–RFLP test to identify African *Rhipicephalus (Boophilus)* ticks. *Acta Tropica*, **114**, 55–58.
- Lorusso V, Picozzi K, de Bronsvort BM *et al.* (2013) Ixodid ticks of traditionally managed cattle in central Nigeria: where *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* does not dare (yet?). *Parasit Vectors*, **6**, 171.
- Low VL, Tay ST, Kho KL *et al.* (2015) Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. *Parasites & Vectors*, **8**.
- Lutermann H, Fagir DM, Bennett NC (2015) Complex interactions within the ectoparasite community of the eastern rock sengi (*Elephantulus myurus*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **4**, 148–158.
- Lynen G, Zeman P, Bakunam C *et al.* (2008) Shifts in the distributional ranges of *Boophilus* ticks in Tanzania: evidence that a parapatric boundary between *Boophilus microplus* and *B. decoloratus* follows climate gradients. *Experimental and Applied Acarology*, **44**, 147–164.
- Madder M, Adehan S, De Deken R, Adehan R, Lokossou R (2012) New foci of *Rhipicephalus microplus* in West Africa. *Experimental and Applied Acarology*, **56**, 385–390.



- Madder M, Thys E, Achi L, Touré A, De Deken R (2011) Rhipicephalus (Boophilus) microplus: a most successful invasive tick species in West-Africa. *Experimental and Applied Acarology*, **53**, 139–145.
- Madder M, Thys E, Geysen D, Baudoux C, Horak I (2007) Boophilus microplus ticks found in West Africa. *Experimental and Applied Acarology*, **43**, 233–234.
- MAEP (2004) *Annuaire statistique du Ministère de l’Agriculture de l’Elevage et de la Pêche*. DPP/MAEP.
- Mahan SM, Kumbula D, Burridge MJ, Barbet AF (1998) The inactivated Cowdria ruminantium vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against laboratory and field tick challenge. *Vaccine*, **16**, 1203–1211.
- Mahan SM, Simbi BH, Burridge MJ (2004) The pCS20 PCR assay for Ehrlichia ruminantium does not cross-react with the novel deer ehrlichial agent found in white-tailed deer in the United States of America. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **71**, p–99.
- Mandal S. (2012) Veterinary Parasitology. In: *Veterinary Parasitology*, pp. 355–365. Panacea Computer, India.
- Mapholi NO, Marufu MC, Maiwashe A *et al.* (2014) Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: A review. *Ticks and Tick-borne Diseases*, **5**, 475–483.
- Martinez D, Maillard JC, Coisne S, Sheikboudou C, Bensaid A (1994) Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of Cowdria ruminantium. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **41**, 153–163.
- Martinez D, Vachiéry N, Stachurski F *et al.* (2004) Nested PCR for Detection and Genotyping of Ehrlichia ruminantium: Use in Genetic Diversity Analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1026**, 106–113.
- Martins WS, Lucas DCS, de Souza Neves KF, Bertoli DJ (2009) WebSat-A web software for microsatellite marker development. *Bioinformation*, **3**, 282.



- Mbengue M, Gueye A, Faye O, Toguebaye B., Konte M (2007) Etude séro-épidémiologique de la cowdriose chez le zébu maure au Sénégal. *Parasite*, **14**, 169–171.
- McCosker P. (1979) Global Aspects of the Management and Control of Ticks of Veterinary Importance. *Recent Advances in Acarology*, **2**, 45–53.
- Miller DK, Diall O, Craig TM, Wagner GG (1984) Serological prevalence of bovine babesiosis in Mali. *Tropical Animal Health and Production*, **16**, 71–77.
- Missohou A, Adakal H (2004) Situation actuelle et perspectives d'une gestion durable des ressources génétiques bovines d'Afrique de l'Ouest. In: *Colloque international sur les ressources génétiques*, pp. 167–173. Ouagadougou, Burkina Faso.
- Monteiro CM., Araujo L., Matos R. *et al.* (2013) Association between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, **112**, 3645–3651.
- Morisson W, Mc Keever D (2006) Current status of vaccine development against *Theileria* parasites. *Parasitology*, **133**, 169–187.
- MRA (2005) *Plan d'actions et programme d'investissements du secteur de l'élevage du Burkina Faso, version révisée à l'horizon 2015*. Ministère des Ressources animales. Ouagadougou, Burkina Faso.
- MRA (2006) *Diagnostic des filières bétail-viande et petits ruminants au Burkina Faso : rapport provisoire*. Ministère des Ressources animales. Ouagadougou, Burkina Faso.
- Murray M, Clifford DJ, Gettinby G, Snow WF, McIntyre WI (1981) Susceptibility to African trypanosomiasis of N'Dama and Zebu cattle in an area of *Glossina morsitans submorsitans* challenge. *The Veterinary Record*, **109**, 503–510.
- Murrell A, Barker SC (2003) Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic parasitology*, **56**, 169–172.

- Murrell A, Campbell NJH, Barker SC (2000) Phylogenetic Analyses of the Rhipicephaline Ticks Indicate That the Genus *Rhipicephalus* Is Paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **16**, 1–7.
- Murrell A, Campbell NJH, Barker SC (2001) A Total-Evidence Phylogeny of Ticks Provides Insights into the Evolution of Life Cycles and Biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **21**, 244–258.
- Musa HI, Jajere SM, Adamu NB *et al.* (2014) Prevalence of Tick Infestation in Different Breeds of Cattle in Maiduguri, Northeastern Nigeria. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, **12**, 161–166.
- Nakao R, Magona JW, Zhou L, Jongejan F, Sugimoto C (2011) Multi-locus sequence typing of *Ehrlichia ruminantium* strains from geographically diverse origins and collected in *Amblyomma variegatum* from Uganda. *Parasites & Vectors*, **4**, 137.
- Nakao R, Morrison LJ, Zhou L *et al.* (2012) Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid genotyping of *Ehrlichia ruminantium* and its application to infected *Amblyomma variegatum* collected in heartwater endemic areas in Uganda. *Parasitology*, **139**, 69–82.
- Nambota A, Samui K, Sugimoto C, Kakuta T, Onuma M (1994) Theileriosis in Zambia: Epidemiology and, etiology, control measures. *Japanese Journal of Veterinary Research*, **42**, 1–18.
- Newson R. (1991) *Revised project document. Tick and tick-borne disease prevention and control in Ethiopia*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy.
- Norimine J, Suarez C., Mc Elwain T., Florin-Christensen M, Brown W. (2002) Immunodominant epitopes in *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 that elicit memory CD4(+)-T-lymphocyte responses in *B. bovis*-immune individuals are located in the amino-terminal domain. *Infection and Immunity*, **70**, 2039–2048.
- Norval R, Short N (1984) Interspecific competition between *Boophilus decoloratus* and *Boophilus microplus* in southern Africa. In: *Acarology*, pp. 1242 – 1246. Griffiths DA, Bowman CE.



- Nwoha RI., Onyeabor A, Igwe K. *et al.* (2013) Prevalence of Haemoparasites in Livestock in Ikwuano Local Government Area of Abia State. *Journal of Fisheries & Livestock Production*, **2**, 109–111.
- Nyika, Mahan, Burridge *et al.* (1998) A DNA vaccine protects mice against the rickettsial agent *Cowdria ruminantium*. *Parasite Immunology*, **20**, 111–119.
- Oliveira MCS, Oliveira-Sequeira TCG, Araujo Jr. JP, Amarante AFT, Oliveira HN (2005) *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **130**, 61–67.
- Oliveira-Sequeira TCG, Oliveira MCS, Araujo JP, Amarante AFT (2005) PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *International Journal for Parasitology*, **35**, 105–111.
- Opara MN, Ezeh NO (2011) Ixodid ticks of cattle in Borno and Yobe states of northeastern Nigeria: breed and coat colour preference. *Animal Research International*, **8**, 1359–1365.
- Pangui L, Salifou S (1992) Enquêtes parasitologiques sur les hémoparasites des bovins transmis par les tiques au Bénin. *FAO world animal review*, **73**.
- Patsanza G (2012) Molecular epidemiology of bovine babesiosis in Benin. Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerpen (Antwerp), Belgium.
- Pipano E, Alekceev E, Galker F *et al.* (2003) Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. *Experimental & Applied Acarology*, **29**, 141–149.
- Piry S, Luikart G, Cornuet J-M (1999) Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502–503.
- Potgieter F. (1979) Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, **504**, 367 – 372.
- Poulin R (2007) Are there general laws in parasite ecology? *Parasitology*, **134**, 763–776.
- Presley SJ (2011) Interspecific aggregation of ectoparasites on bats: importance of hosts as habitats supersedes interspecific interactions. *Oikos*, **120**, 832–841.



- Pudney M (1992) Cultivation of Babesia. In: *Recent Developments in the Control of Anaplasmosis, Babesiosis and Cowdriosis*, pp. 129–140. Dolan, T. T., Nairobi, ILRAD.
- Radostits O., Gay G., Hinchiff K., Constable P. (2007) *Veterinary Medicine: A text book of the disease of cattle, sheep, goat, pigs and horses*. Saunders Elsevier, London.
- Rageau J, Vervent G (1959) Les tiques (Acariens Ixodoidea) des îles françaises du Pacifique. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, **52**, 819–835.
- Raliniaina M, Meyer DF, Pinarello V *et al.* (2010) Mining the genetic diversity of Ehrlichia ruminantium using map genes family. *Veterinary Parasitology*, **167**, 187–195.
- Ravindran R, Juliet S, Sunil AR *et al.* (2012) Acaricidal activity of Cassia alata against Rhipicephalus (Boophilus) annulatus. *Experimental and Applied Acarology*, **56**, 69–74.
- Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N (1998) An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito Culex pipiens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353**, 1707–1711.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Rege JE. (1999) The state of African cattle genetic resources I. Classification framework and identification of threatened and extinct breeds. *Animal Genetic Resources Information*, **25**, 1–26.
- Rio N, A O, Kc I *et al.* (2013) Prevalence of Haemoparasites in Livestock in Ikwuano Local Government Area of Abia State. *Journal of Fisheries & Livestock Production*, **2014**.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **132**, 365–86.
- Saidu S., Abdulkadir I, Akerejola O. (1984) Theileria mutans infection in Nigerian. *Tropical Animal Health and Production*, **16**, 149 – 152.
- Samish M, Ginsberg H, Glazer I (2004) Biological control of ticks. *Parasitology*, **129**, S389–S403.



- Schuijt T., Hovius J., van Der Poll T, van Dam A., Fikrig E (2011) Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge, the future. *Trends in Parasitology*, **27**, 40–47.
- Simbi BH, Bowie MV, McGUIRE TC, Barbet AF, Mahan SM (2006) Evaluation of *E. ruminantium* Genes in DBA/2 Mice as Potential DNA Vaccine Candidates for Control of Heartwater. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1078**, 424–437.
- Stachurski F, Adakal H (2010) Exploiting the heterogeneous drop-off rhythm of *Amblyomma variegatum* nymphs to reduce pasture infestation by adult ticks. *Parasitology*, **137**, 1129–1137.
- Stachurski F, Lancelot R (2006) Foot-bath acaricide treatment to control cattle infestation by the tick *Amblyomma variegatum*. *Medical and Veterinary Entomology*, **20**, 402–412.
- Stachurski F, Musonge E., Achu-kwi M., Saliki J. (1993) Impact of natural infestation of *Amblyomma variegatum* on the liveweight gain of male Gudali cattle in Adamawa (Cameroon). *Veterinary Parasitology*, **49**, 299–311.
- Stachurski F, Tortosa P, Rahajarison P *et al.* (2013) New data regarding distribution of cattle ticks in the south-western Indian Ocean islands. *Veterinary Research*, **44**, 79.
- Sungirai M (2012) Identification of the four Rhipicephalus (Boophilus) tick species and their hybrids from Benin: morphology versus genetics. Thesis of Master of Science in Tropical Animal Health Thesis. Prince Leopold Institute of Tropical Medicine (ITMA), Antwerpen (Antwerp), Belgium.
- Sy O (2010) La transhumance transfrontalière, source de conflits au Ferlo (Sénégal). *Mappemonde*.
- Taylor M., Coop R., Wall R. (2007) *Veterinary Parasitology*. Blackwell Publishing, USA.
- Theiler G (1962) *The Ixodidae parasites of vertebrates in Africa south of the Sahara. Project S 9958. Report to the Director of Veterinary Services*. Veterinary Services, Onderstepoort pretoria south africa.
- Thompson C, Spielman A, Krause PJ (2001) Coinfecting Deer-Associated Zoonoses: Lyme Disease, Babesiosis, and Ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases*, **33**, 676–685.



- Tønnesen MH, Penzhorn BL, Bryson NR, Stoltz WH, Masibigiri T (2004) Displacement of *Boophilus decoloratus* by *Boophilus microplus* in the Soutpansberg region, Limpopo Province, South Africa. *Experimental & Applied Acarology*, **32**, 199–208.
- Tønnesen MH, Penzhorn BL, Bryson NR, Stoltz WH, Masibigiri T (2006) Seroprevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in the Soutpansberg region, Limpopo Province, South Africa, associated with changes in vector-tick populations. *Journal of the South African Veterinary Association*, **77**, 61–65.
- Totté P, McKeever D, Martinez D, Bensaid A (1997) Analysis of T-cell responses in cattle immunized against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Infection and Immunity*, **65**, 236–241.
- Toure A, Diaha C, Sylla I, Kouakou K (2014) Récente reconstitution des populations de tiques prévalant en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **8**, 566–578.
- Turkson PK, Botchey M (1999) Acaricide resistance in the cattle tick, *Amblyomma variegatum*, in the coastal savanna zone of Ghana. *Ghana Journal of Agricultural Science*, **32**, 199–204.
- Uilenberg G (1970) Notes sur les babesioses et l'anaplasmose des bovins à Madagascar. IV. Note additionnelle sur la transmission. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **23**, 309–312.
- Uilenberg G (1981) Theilerial species of domestic livestock. In: *Advances in the Control of Theileriosis.*, pp. 4–37. Irvin AD, Cunningham MP, Young AS.
- Uilenberg G (1983) Heartwater (*Cowdria ruminantium* infection): current status. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, **27**, 427–480.
- Uilenberg G (1995) International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Veterinary Parasitology*, **57**, 19–41.
- Uilenberg G, Hoogstraal H, Klein J. (1979) *Les tiques (Ixodoidea) de Madagascar et leur rôle vecteur*. Tananarive, Madagascar.

- Uilenberg G, Robson J, Pederson V (1974) Some experiments on the transmission of *Theileria mutans* and *Theileria parva* by the ticks *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* in Uganda. *Tropenmed Parasitol. Tropenmedizin Und Parasitologie*, **25**, 207 – 216.
- Vacher C, Bourguet D, Rousset F, Chevillon C, Hochberg ME (2003) Modelling the spatial configuration of refuges for a sustainable control of pests: a case study of Bt cotton. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 378–387.
- Vacher C, Bourguet D, Rousset F, Chevillon C, Hochberg ME (2004) High dose refuge strategies and genetically modified crops – reply to Tabashnik et al. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 913–918.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Vonshak M, Gordon DM (2015) Intermediate disturbance promotes invasive ant abundance. *Biological Conservation*, **186**, 359–367.
- Walker A, Bouattour A, Camicas J-L et al. (2003) *Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species*. Bioscience Reports, Edinburgh.
- Walker J., Olwage A (1987) The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (Ixodoidea, Ixodidae, genus *Amblyomma*) and their distribution. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **54**, 353–379.
- Whalon M., Mota-Sanchez D, Hollingworth R. (2008) *Global pesticide resistance in arthropods*. London, United Kingdom.
- Wilkowsky S., Farber M, Echaide I et al. (2003) *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **127**, 133–141.
- Willadsen P (2006) Vaccination against ectoparasites. *Parasitology*, **133**, S9–S25.



- Young A., Grocock C., Kariuki D. (1988) Integrated control of ticks and tick-borne diseases of Cattle in Africa. *Parasitology*, **96**, 403–432.
- Zeman P, Lynen G (2010) Conditions for stable parapatric coexistence between *Boophilus decoloratus* and *B. microplus* ticks: a simulation study using the competitive Lotka-Volterra model. *Experimental and Applied Acarology*, **52**, 409–426.
- Zonon A (2004) Les déterminants de la pauvreté régionale au Burkina Faso. MIMAP- Burkina Faso. In: *3rd PEP General Meeting*, p. 10 p. Dakar, Sénégal.
- Zweygarth E, Josemans AI, Steyn HC (2008) Experimental use of the attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden) vaccine in Merino sheep and Angora goats. *Vaccine*, **26**, **Supplement 6**, G34–G39.
- Zweygarth E, Josemans AI, Van Strijp MF *et al.* (2005) An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. *Vaccine*, **23**, 1695–1702.



Résumé

L'élevage bovin représente un secteur économique clé en Afrique de l'ouest dont le développement est fortement contraint par les tiques et les agents pathogènes qu'elles transmettent. Cet état des lieux s'est aggravé depuis 2002 du fait de l'invasion de cette région par l'espèce de tique associée aux plus fortes pertes économiques au niveau mondial : *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Certains auteurs avaient même annoncé (sans véritablement le tester) que *R. microplus* était en train de remplacer les tiques natives du même sous-genre *Boophilus* au sud du Bénin et en Côte d'Ivoire. Nos travaux ont consisté à (i) tester les possibles effets de l'installation de *R. microplus* au Bénin et au Burkina Faso sur les communautés tant de tiques que des agents pathogènes qu'elles transmettent au bétail et (ii) à comprendre les mécanismes populationnels impliqués dans l'invasion de *R. microplus* en cours. Des collectes mensuelles de tiques et de sang ont été réalisées pendant 12 mois sur 144 vaches de ces deux pays. Nos analyses démontrent, que loin du remplacement d'espèces suspecté, l'installation de *R. microplus* s'est accompagnée d'une augmentation de la charge parasitaire réalisée par différentes espèces natives sur des bovins dans certaines régions. Le centre Burkina Faso fait exception : l'espèce invasive n'a pas réussi à s'installer dans cette région où les rares espèces natives ont vu leur abondance diminuer au cours de la dernière décennie. Les impacts de l'installation de l'espèce invasive sur les communautés d'agents pathogènes transmis par les tiques du bétail font appel à des processus plus complexes. Ainsi, nous avons mis en évidence principalement des interactions négatives entre les espèces d'agents pathogènes transmis au bétail par les tiques du sous-genre *Boophilus*. Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'existence de transmission transovarienne de l'agent de la cowdriose (*Ehrlichia ruminantium*) chez *R. microplus* qui n'était pas censé être compétente pour cet agent pathogène dont les vecteurs appartiennent au genre *Amblyomma*. Ces analyses des conséquences de l'installation de l'espèce de tique invasive sont complétées par une première étude de génétique des populations de *R. microplus*. Les échantillonnages se sont effectués le long d'un transect nord-sud au Bénin ainsi qu'au sein de deux troupeaux burkinabés conduits par des éleveurs Peulh pratiquant une transhumance saisonnière à longue distance en saison sèche. Ceci nous a permis de montrer que, huit ans après l'importation accidentelle de *R. microplus* au sud Bénin, les populations installées avaient atteint des équilibres mutation/dérive et migration/dérive et que la transhumance saisonnière s'accompagnait bien de dispersion à longue distance de *R. microplus*. Ces résultats sont discutés tant vis-à-vis de la compréhension de la nouvelle situation vétérinaire des troupeaux bovins béninois et burkinabés que dans une perspective de protection de la santé des troupeaux.

Mots clés : *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, invasion, interactions, génétique des populations, Afrique de l'ouest.

Summary

The current invasion of West Africa by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* has reinforced the constraints imposed on the development of cattle production by ticks and tick-borne pathogens. Our studies were aimed at investigating the underlined processes by (i) testing the consequences of the settlement of this invasive tick on diversity and structure of the communities formed by the cattle ticks and tick-borne pathogens in Benin and Burkina Faso, and by (ii) understanding the population mechanisms involved in the *R. microplus* invasion in progress. Monthly collections of ticks and blood had been carried out for 12 months on 144 sentinel-steers in both countries. Our analyses revealed that far from the suspected species replacement, *R. microplus* installation came along with an increase in the burden realized by native tick species. We also highlighted the existence of transovarial transmission of heartwater agent (*E. ruminantium*) in *R. microplus* which was not supposed to be competent for this pathogen whose vectors belong to the genus *Amblyomma*. We also shown the negative interactions between pathogens transmitted to cattle by ticks (native & invasive) belonging to the subgenus *Boophilus*. Finally, we initiated a genetic study of *R. microplus* populations along a north-south transect conducted in Benin and within two Burkinabe Fulani herds, led by farmers who practice long-distance seasonal transhumance during dry season. Hence, we demonstrated that eight years after the accidental introduction of *R. microplus* in south Benin, installed populations had reached equilibrium mutation/drift and migration/drift and that seasonal transhumance was accompanied by *R. microplus* long distance dispersion. These results have been discussed related to the understanding of the new veterinary situation of Beninese's and Burkinabe's cattle herd as well as to the protecting perspective of the cattle herds health.

Key Words: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, invasion, interactions, population genetics, West Africa..

